

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 530 971**

51 Int. Cl.:

C07K 14/705 (2006.01)

C07K 7/06 (2006.01)

C07K 7/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.04.2004 E 04725135 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.01.2015 EP 1613651**

54 Título: **Procedimientos y composiciones para la inhibición de la modulación de la ruta coestimulante de linfocitos T por un agente patógeno**

30 Prioridad:

03.04.2003 WO PCT/IL03/00278

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

09.03.2015

73 Titular/es:

**YISSUM RESEARCH DEVELOPMENT COMPANY
OF THE HEBREW UNIVERSITY OF JERUSALEM
(100.0%)
HI TECH PARK, EDMOND J. SAFRA CAMPUS,
THE HEBREW UNIVERSITY OF JERUSALEM,
GIVAT RAM, P.O. BOX 39135
91390 JERUSALEM, IL**

72 Inventor/es:

**KAEMPFER, RAYMOND y
ARAD, GILA**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 530 971 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

Procedimientos y composiciones para la inhibición de la modulación de la ruta coestimulante de linfocitos T por un agente patógeno

5

Campo de la invención

La invención se refiere a péptidos inmunomoduladores antagonistas específicos, composiciones de los mismos y también a tales péptidos y composiciones para su uso en procedimientos para el tratamiento de trastornos inmunorrelacionados.

10

Antecedentes de la invención

Una familia de exotoxinas pirógenas, también conocidas como toxinas superantigénicas, se produce por *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pyogenes*. Las exotoxinas comprendidas de enterotoxinas de *S. aureus* (SE) producen la mayoría de los casos de intoxicación alimentaria humana manifestada por vómitos y diarrea después de la ingestión [Schlievert, J. Infect. Dis. 167: 997 (1993)]. *S. aureus* se encuentra diseminado en la naturaleza, frecuentemente en asociación con los seres humanos. Entre los 5 tipos serológicos principales dentro de la familia de SE (marcados SEA a SEE y SEG), SEB es el más importante [Marrack y Kappler, Science 248: 705 (1990)]. También se ha reconocido SEB como causa principal de casos humanos de síndrome de choque tóxico no menstrual que puede acompañar a infecciones de heridas quirúrgicas o perjudiciales, además de a infecciones víricas de las vías respiratorias de pacientes con gripe a la que los niños son especialmente vulnerables [Schlievert (1993) arriba; Tseng y col., Infect. Immun. 63:2880 (1995)]. El síndrome de choque tóxico, en su forma más grave, produce choque y muerte [Murray y col., ASM News 61:229 (1995); Schlievert (1993) arriba]. Más generalmente, los miembros de la familia de las exotoxinas estafilocócicas, que incluyen SEA a SEE y la toxina 1 del síndrome de choque tóxico (TSST-1), participan en el síndrome de choque tóxico, en dermatitis atópica [Schlievert (1993) arriba] y en el síndrome de Kawasaki [Bohach y col., Crit. Rev. Microbiol. 17:251 (1990)].

15

20

25

Evitando la presentación limitada de antígenos convencionales, los superantígenos producidos por *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pyogenes* se unen directamente a la mayoría de las moléculas de clase II del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) y activan prácticamente todos los linfocitos T que llevan dominios particulares en la porción variable de la cadena β del receptor de linfocitos T (TCR), sin necesidad de procesamiento por células presentadoras de antígeno [Scholl, P. y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:4210-4214 (1989); Fraser, J.D. Nature 339(6221):221-3 (1989); Choi, Y.W. y col., Nature 346(6283):471-3 (1990); Janeway, C.A. Jr. y col., Immunol. Rev. 107:61-88 (1989)]. Esto produce una inducción excesiva de las citocinas T colaboradoras 1 (Th1) interleucina-2 (IL2), interferón- γ (IFN- γ) y factor de necrosis tumoral β , mediadores de choque tóxico [Marrack, P. y Kappler, J. Science 248:705-711 (1990a); Marrack, P. y col., J. Exp. Med. 171(2):455-64 (1990b); Miethke, T. y col., J. Exp. Med. 175(1):91-8 (1992); Hackett, S.P. y Stevens, D.L. J. Infect. Dis. 168:232-235 (1993); Arad, G. y col., Nat. Med. 6(4):414-21 (2000)]. Así, los superantígenos usan los mismos ligandos que antígenos convencionales, pero lo hacen de una manera distinta [Sundberg, E.J. y col., Structure (Camb) 10:687-699 (2002a); Sundberg, E.J. y col., Curr. Opin. Immunol. 14:36-44 (2002b)]. La inducción de la expresión génica de citocinas Th1 humanas por superantígenos divergentes se inhibe por un peptidomimético de superantígenos que protege los ratones del efecto letal de estas toxinas [Arad (2000) arriba]. El péptido muestra homología con un dominio de la hélice α de la bisagra de la cadena β que está estructuralmente conservado entre los superantígenos todavía remotos de sus sitios de unión para las moléculas de clase II del MHC y TCR. La actividad antagonista de este péptido identificó un dominio de superantígeno novedoso que es crítico para su acción [Arad (2000) arriba]. Este hallazgo elevó la posibilidad de que los superantígenos puedan usar este dominio para unirse a un tercer receptor.

30

35

40

45

CD28 y B7-2 sirven de ligandos coestimulantes principales para antígenos convencionales [revisado por Lenschow, D.J. y col., Annu. Rev. Immunol. 14:233-58 (1996); Salomon, B. y Bluestone, J.A. Annu. Rev. Immunol. 19:225-52 (2001); Acuto, O. y Michel, F. Nat. Rev. Immunol. 3(12):939-51 (2003)]. Los presentes inventores han mostrado que para proporcionar la señal para la activación de Th1, un superantígeno debe unirse directamente a CD28 [documento WO 03/084995]. La señalización se bloquea por peptidomiméticos de la región de contacto en cada ligando: el dominio de la hélice α de la bisagra de la cadena β en superantígenos [Arad (2000) arriba] y dos dominios no contiguos en CD28 que forman la interfase de homodimerización predicha.

50

55

CD28 pertenece a una tríada de ligandos coestimulantes cuyos genes están fuertemente ligados: CD28, proteína 4 asociada a linfocitos T citotóxicos (CTLA4) (CD152) y coestimulante inducible (ICOS) [revisado por Sharpe, A.H. y Freeman, G.J., Nat. Rev. Immunol. 2(2):116-26 (2002); Carreno, B.M. y Collins, M. Annu. Rev. Immunol. 20:29-53 (2002)]. Mediante sus co-ligandos de la familia de B7, estas proteínas sirven de receptores coestimulantes que regulan la señalización por antígenos normales. CD28 actúa de transductor de señales tempranas críticas para la respuesta inmunitaria innata, equilibrado por ICOS y CTLA4 [revisado por Rudd, C.E. y Schneider H. Nat. Rev. Immunol. 3(7):544-56 (2003)]. La presente invención muestra ahora que mediante su dominio de la hélice α de la bisagra de la cadena β , la principal enterotoxina B estafilocócica (SEB) de superantígeno se une con alta afinidad a cada miembro de esta familia de receptores conservada. Los péptidos que se derivan de cualquier borde de la

60

65

interfase del dímero bipartito en CTLA4 [Schwartz, J. C. y col., Nature 410:604-608 (2001); Stamper, C. C. y col., Nature 410(6828):608-11 (2001)] o en CD28 e ICOS como se predice por el alineamiento de secuencias, aunque único para cada receptor coestimulante, son potentes antagonistas que bloquean la inducción mediada por superantígenos de la expresión génica de citocinas Th1 humanas y protegen ratones de la exposición letal a SEB. Aparentemente, el modo de acción de estos péptidos es competir con CD28 por su sitio de unión en superantígenos. SEB induce una expresión vigorosa de genes de citocinas Th1 y Th2, pero solo la inducción de la respuesta de Th1 depende de la señalización de CD28.

La unión directa a CD28 subyace a la toxicidad de los superantígenos. Los hallazgos de la presente invención revelan un mecanismo de subversión de la respuesta inmunitaria innata en la que el superantígeno nombra a un ligando coestimulante del huésped para uso como su receptor forzoso. Esta estrategia puede usarse más ampliamente por patógenos.

Por tanto, es un objetivo de la invención proporcionar composiciones para inhibir la activación de una ruta coestimulante de linfocitos T, concretamente la ruta de CD28/B7, por un agente patógeno, en un sujeto en necesidad de las mismas. Tales composiciones se basan en una sustancia que inhibe la interacción directa de un componente derivado de dicho agente patógeno y un sitio de unión dentro de una molécula miembro de la ruta coestimulante de linfocitos T, sitio que se deriva de la interfase del dímero de dicho miembro de la ruta coestimulante de linfocitos T.

Es otro objetivo de la invención proporcionar péptidos que inhiben la interacción directa de un componente derivado de dicho agente patógeno y un sitio de unión dentro de la interfase del dímero de un miembro de la ruta coestimulante de linfocitos T, preferentemente, CD28, CTLA4 e ICOS. Tales péptidos se proporcionan por la invención y son péptidos que comprenden una secuencia de aminoácidos derivada de una interfase del dímero de un miembro de la ruta coestimulante de linfocitos T, por ejemplo, los péptidos de SEC ID N.º: 9, 11, 12, 14, 15, 16,17, 57 y 58.

Es otro objetivo de la invención proporcionar composiciones para su uso en el tratamiento de trastornos inmunorrelacionados producidos por un agente patógeno, particularmente, una exotoxina de superantígeno.

Estos y otros objetivos de la invención serán evidentes a medida que avanza la descripción.

Sumario de la invención

En un primer aspecto, la invención se refiere a un péptido aislado y purificado que consiste en:

(a) un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es una interfase del dímero de un miembro de la ruta coestimulante de linfocitos T seleccionada de la interfase del dímero dentro de CD28 humano, CTLA4 humano, ICOS humano y PD-1 humano, estando dicha secuencia de aminoácido seleccionada de los residuos de aminoácidos 10-15 o 116-121 de SEC ID N.º: 19, residuos de aminoácidos 10-15 o 115-120 de SEC ID N.º: 20, residuos de aminoácidos 10-15 o 119-124 de SEC ID N.º: 21, y residuos de aminoácidos 8-13 o 110-116 de SEC ID N.º: 59, en el que el péptido:

(i) es un péptido de la interfase del dímero de CD28 humano que consiste en la secuencia de aminoácidos HVKGKHLCP como se indica por SEC ID N.º: 9 o la secuencia de aminoácidos SPMLVAYD como se indica por SEC ID N.º: 12;

(ii) es un péptido de la interfase del dímero de CTLA4 humano que consiste en la secuencia de aminoácidos YVIDPEPCP como se indica por SEC ID N.º: 14 o la secuencia de aminoácidos PAWLASS como se indica por SEC ID N.º: 15;

(iii) es un péptido de la interfase del dímero de ICOS humano que consiste en la secuencia de aminoácidos YESQLCCQL como se indica por SEC ID N.º: 16 o la secuencia de aminoácidos GEINGSAN como se indica por SEC ID N.º: 17; o

(iv) es un péptido de la interfase del dímero de PD-1 humano que consiste en la secuencia de aminoácidos RVTERRAEV como se indica por SEC ID N.º: 57 o la secuencia de aminoácidos PALLWTE como se indica por SEC ID N.º: 58;

(b) un péptido que es al menos el 80 % homólogo al péptido de CD28 humano de SEC ID N.º: 9 o 12, en el que el péptido resultante de (b) mantiene la capacidad de inhibir la interacción entre un miembro de la ruta coestimulante de linfocitos T y un superantígeno;

(c) un péptido de (a) que tiene una inserción de un residuo de aminoácido, en el que el péptido resultante de (c) mantiene la capacidad de inhibir la interacción entre un miembro de la ruta coestimulante de linfocitos T y un superantígeno;

(d) un péptido de (a), (b) o (c) que está prolongado en el extremo N y/o el extremo C:

(i) por una lauril-cisteína en el extremo N y una cisteína en el extremo C; o

(ii) por un resto orgánico que no es un residuo de aminoácido que se produce naturalmente o sintético; o

(iii) por residuo(s) de aminoácido(s) hidrófobo(s) idéntico(s) que puede(n) ser residuos de aminoácidos que se producen naturalmente o sintéticos; o

(iv) por una cola de lisil-palmitoílo, en el que dicha cola está en el extremo N, en el que el péptido resultante de (c) mantiene la capacidad de inhibir la interacción entre un miembro de la ruta coestimulante de linfocitos T y un superantígeno;

(e) un dímero o multímero de (a), (b), (c) o (d) en el que el péptido resultante de (e) mantiene la capacidad de inhibir la interacción entre un miembro de la ruta coestimulante de linfocitos T y un superantígeno.

Por tanto, el péptido de la invención es un péptido inmunomodulador que puede modular una ruta coestimulante de linfocitos T.

En una realización preferida, el péptido de la invención puede consistir en una secuencia de aminoácidos de la interfase del dímero de un miembro de la ruta coestimulante de linfocitos T, seleccionado de un miembro de la familia de CD28/B7 que es uno cualquiera de CD28, CTLA4 e ICOS y los dominios correspondientes en PD-1.

Según un segundo aspecto, la invención se refiere a una composición que comprende como principio activo un péptido purificado de la invención o cualquier combinación del mismo y opcionalmente comprende además vehículo, diluyente, adyuvante y/ o excipiente farmacéuticamente aceptable.

La invención proporciona además una composición de la invención para su uso en un procedimiento de tratamiento de un trastorno inmunitario relacionado con un desequilibrio en la respuesta de Th1-Th2 en un sujeto en necesidad del mismo, en el que dicho trastorno inmunitario es uno cualquiera de una enfermedad autoinmunitaria, trastorno proliferativo maligno o no maligno, patología de rechazo del injerto, y un trastorno inducido por una exotoxina pirógena o por una mezcla de al menos dos exotoxinas pirógenas seleccionadas de choque tóxico e incapacitación o para su uso en un procedimiento de prevención de muerte inducida por una exotoxina pirógena o por una mezcla de al menos dos exotoxinas pirógenas.

En otra realización más, la invención se refiere al uso de un péptido de la invención para la preparación de una composición para su uso en el tratamiento de trastornos inmunitarios relacionados con un desequilibrio en la respuesta de Th1-Th2 en un sujeto en necesidad del mismo, en el que dicho trastorno inmunitario es uno cualquiera de una enfermedad autoinmunitaria, trastorno proliferativo maligno o no maligno, patología de rechazo del injerto, y un trastorno inducido por una exotoxina pirógena o por una mezcla de al menos dos exotoxinas pirógenas seleccionadas de choque tóxico e incapacitación o para su uso en un procedimiento de prevención y muerte, inducido por una exotoxina pirógena o por una mezcla de al menos dos exotoxinas pirógenas.

Todavía además, la invención se refiere a un procedimiento de cribado para una sustancia de prueba que se une específicamente a un miembro de la ruta coestimulante de linfocitos T y así inhibe la activación de linfocitos T mediada por un agente patógeno, procedimiento de cribado que comprende las etapas de:

(a) obtener sustancias antagonistas candidatas que se unen a un miembro de la ruta coestimulante de linfocitos T;

(b) seleccionar de las sustancias obtenidas en la etapa (a) una sustancia que inhibe la interacción directa entre dicho miembro de la ruta coestimulante de linfocitos T y dicho agente patógeno o un componente derivado de dicho agente, preferentemente dicho componente es un superantígeno; y

(c) determinar el efecto inhibitorio de la sustancia obtenida en la etapa (b) sobre la activación mediada por superantígenos de linfocitos T, preferentemente linfocitos Th1, en el que dicha sustancia antagonista candidata se obtiene por las etapas de: (i) proporcionar una mezcla que comprende un péptido aislado de la invención; (ii) poner en contacto dicha mezcla con dicha sustancia de prueba bajo condiciones adecuadas para dicha unión; y (iii) determinar el efecto de la sustancia de prueba basándose en una indicación del punto final, por lo que la modulación de dicho punto final es indicativa de la unión de dicha sustancia de prueba a dicho péptido.

La invención se describirá adicionalmente mediante las siguientes figuras, que son ilustrativas solo y no limitan el alcance de la invención que se define por las reivindicaciones adjuntas.

Breve descripción de las figuras

Figura 1A-1F *Inhibición selectiva de la activación de Th1 por peptidomimético de superantígenos*. Fig. 1A Inhibición de la expresión génica de IL2 inducida por SEB por inducción concomitante de IL4 e IL10. Se incubaron CMSP humanas con Ab neutralizante de rata 1:10⁴ veces diluido contra IL4 humana (α IL4; Genzyme) (\square) o IL210 (α IL10; Pharmingen) (Δ), con SEB (\circ), o con SEB y anti-IgG humana del mismo isotipo (\bullet), α IL4 (\blacksquare) o α IL10 (\blacktriangle). Se cuantificó ARNm de IL2 como se describe en Procedimientos experimentales por

hibridación con sonda de ARN antisentido de IL2; se leyó el ennegrecimiento de películas a 630 nm. Se muestran datos de autorradiograma durante 6 h.

Figs. 1B, 1C Inhibición de la expresión génica de IFN- γ inducida por SEB por inducción concomitante de IL4 e IL10. Se incubaron CMSP con SEB o sin SEB (-), y con α IL4 o α IL10 como se muestra; se cuantificó ARNm de IFN- γ por análisis de protección de RNasa como se describe en Procedimientos experimentales, con ARNr como control de carga. (B) y (C) representan experimentos separados.

Fig. 1D *p12B* inhibe la inducción de IL2 mediada por ARNm de SEB y de IFN- γ , pero no de IL4 e IL10. Se indujeron CMSP con SEB en ausencia (\circ) o presencia de 10 μ g/ml de *p12B* (\bullet). Se cuantificaron ARNm de IL2 y ARNm de IFN- γ por análisis de protección de RNasa, con ARNm de actina como control de carga. Se determinaron IL4 e IL10 en el medio de cultivo por el kit de ELISA Quantikine (R&D Systems).

Fig. 1E El dominio antagonista en SEB. En la estructura de SEB (pdb3seb.ent), generada con RasMol, el dominio 160-161 se muestra como cinta magenta. Las cadenas laterales de aminoácidos que se ponen en contacto con MHC II se muestran en rojo y aquellas que se ponen en contacto con el TCR en verde [Papageorgiou, A.C. y col., J. Mol. Biol. 277:61-79 (1998)].

Fig. 1F Hipótesis de trabajo: se usa un receptor novedoso selectivamente para la activación de células Th1 por superantígeno. Para activar células Th1, un superantígeno debe implicar no solo MHC II y TCR, sino también un receptor novedoso disponible para la activación de células Th2. La unión de péptido antagonista a este receptor produce un bloque selectivo de activación de células Th1, para dar supervivencia, además de inmunidad protectora mediada por Th2. Por claridad, se omitieron la célula presentadora de antígeno (APC) y MHC II. Abreviaturas: T (tiempo), h (hora), pg/ml (picogramos/mililitro), sAg (superantígeno), Rec. nov. (receptor novedoso), Muer. (Muerte), Sup. (supervivencia), Inm. prot. (inmunidad protectora), Anta. (antagonista).

Figura 2A-2K Señales de SEB mediante CD28

Fig. 2A-2C El mAb anti-B7-2 inhibe la expresión inducida por SEB de ARNm de IL2 e IFN- γ , pero no de IL10. Se incubaron CMSP sin SEB (\square , Δ) o con 100 ng/ml de SEB (\circ , \blacksquare , \blacktriangle), tanto sin mAb (0) como con anti-B7-1 diluido 1:10⁴ (\square , \blacksquare) o anti-B7-2 (Δ , \blacktriangle) (R&D Systems). Se analizaron ARNm de IL2 y ARNm de IFN- γ como en la Figura 1A (los puntos muestran valores de 8 h). Se ensayó IL10 en medio de cultivo por ELISA.

Fig. 2D-2K Efecto de sCD28, sB7-2 y sCTLA4 sobre la inducción de ARNm de IL2, ARNm de IFN- γ e IL10 por SEB.

Fig. 2D-2E Se indujeron CMSP con SEB (\circ), 1 μ g/ml de sCD28 (R&D Systems) (Δ) o ambos (\bullet); se determinó ARNm de IL2 y de IFN- γ por análisis de protección de RNasa con ARNm de actina como control de carga, e IL10 por ELISA. (Fig. 2F) Se incubaron CMSP con 1 ng/ml de SEB sola o con sCD28 (en μ g/ml); se determinó ARNm de IL2. Fig. 2G-2I Se incubaron CMSP con 1 ng/ml de SEB sola (\circ) o con 100 ng/ml de sCD28 (\blacktriangle) o sB7-2 (\blacksquare); se cuantificó ARNm de IL2 en (Fig. 2G) (Fig. 2H) y se determinó IL10.

Fig. 2J-2K Se indujeron CMSP con SEB sola (\circ) o con 10 ng/ml de sCD28 (A) o 1 μ g/ml de sCTLA4 (\blacksquare); se determinaron ARNm de IL2, ARNm de IFN- γ e IL10. Abreviaturas: T (tiempo), h (hora), Un. (unidades), pg/ml (picogramos/mililitro).

Figura 3A-3G El peptidomimético de superantígeno *p12B* inhibe la señalización mediante CD28

Fig. 3A SEB induce un cambio en la presentación de la superficie celular de CD28. Se enriquecieron células CD4 al 90 % a partir de CMSP por el uso de RosetteSep (Stem Cell Technologies), se incubaron a una densidad de 4x10⁵ células/ml con SEB y a veces se mostraron teñidas con mAb para α CD28 (R&D Systems) (Ab secundario: Cy-2, verde; Jackson Laboratories) o Ab CD28 policlonal (Ab secundario: Cy-3, rojo; Jackson Laboratories). Se muestra microscopía de fluorescencia confocal. Mez. (mezcla), tinción doble con ambos Ab.

Fig. 3B-3E *p12B* inhibe la inducción de ARNm de citocinas Th1 por mAb α CD28.

Fig. 3B Se incubaron CMSP con 2,5 μ g/ml de α CD28 en ausencia o presencia de 10 μ g/ml de *p12B*; se determinó ARNm de IL2 e IFN- γ ; el ARNm de actina (no mostrado) sirvió de control de carga. Fig. 3C-3E Se incubaron CMSP con 2,6 μ g/ml de α CD28 (\circ) o 0,1 μ g/ml de mAb α CD3 (R&D Systems) (\square) o ambos (A, \bullet), en ausencia (\blacktriangle) o presencia de 10 μ g/ml de *p12B* (\bullet). Se determinaron ARNm de IL2, ARNm de IFN- γ e IL10; el ARNm de actina (no mostrado) sirvió de control de carga. Para mostrar que α CD28 no se une a *p12B*, se inmovilizó sCD28 o *p12B* y la unión de α CD28 se ensayó por ELISA usando anti-IgG de ratón acoplada a fosfatasa alcalina (Jackson Laboratories) (Fig. 3E).

Figs. 3F, 3G *p12B* inhibe la inducción de ARNm de IFN- γ por sB7-2/ α CD3. Se incubaron CMSP con 0,1 μ g/ml de α CD3 (\square , \blacksquare), 1 μ g/ml de sB7-2 (\circ , \bullet) o ambos (Δ , \blacktriangle), en ausencia (\square , \circ , Δ) o presencia de 10 μ g/ml de *p12B* (\square , \circ , Δ). Se determinaron ARNm de IFN- γ , ARNm de actina e IL10. Abreviaturas: T (tiempo), h (hora), pg/ml (picogramos/mililitro), mAb (anticuerpo monoclonal), Ab (anticuerpo), Un. (unido).

Figura 4A-4I SEB se une a CD28, CTLA4 e ICOS mediante su dominio antagonista

Figs. 4A-4C Se determinaron perfiles representativos de las respuestas relativas de resonancia de plasmones superficiales para la unión de CD28, CTLA4 e ICOS solubles en concentraciones que oscilan de 0,25 μ M en incrementos de dos veces a SEB inmovilizada (695 UR) como se describe en Procedimientos experimentales.

Figs. 4D-4F Perfiles representativos de las respuestas relativas de resonancia de plasmones superficiales para la unión de CD28, CTLA4 e ICOS solubles en concentraciones que oscilan de 0,126, 0,063 y 0,063 μ M, respectivamente, en incrementos de dos veces a *p12CC* inmovilizado (1.950 UR).

Fig. 4G Ab policlonal de conejo anti-*p12B* (α p12B; Genemed Synthesis) protege ratones de la exposición letal a SEB. Se expusieron grupos de 5 ratones a 20 μ g de SEB directamente (\circ) o 30 min después de la inyección intraperitoneal de 200 μ l de α p12B no diluido (\bullet). Se muestra la supervivencia.

Fig. 4H Perfiles representativos de las respuestas relativas de resonancia de plasmones superficiales para la unión de sB7-2 en concentraciones que oscilan de 0,25 μM en incrementos de dos veces a SEB inmovilizada (696 UR).

Fig. 4I Perfiles representativos de las respuestas relativas de resonancia de plasmones superficiales para la unión de sB7-2 en concentraciones que oscilan de 31,25 nM en incrementos de dos veces a sCD28 inmovilizado (3.400 UR). Abreviaturas: T (tiempo), h (hora), s (segundos), Dif. resp. (diferencia de respuesta), Sup. (supervivencia).

Figura 5A-5F *Péptidos antagonistas de SEB novedosos están seleccionados por afinidad por CD28*

Fig. 5A Ensayo de cribado para fagos que se unen fuertemente a sCD28. Después de 4 rondas de inmunopurificación una biblioteca de expresión en fago 12-mera aleatoria sobre sCD28 y desplazamiento por SEB, se inmovilizaron fagos sobre membranas ECL-plus y se detectó la unión de sCD28 con sCD28 conjugado con HRP (R&D Systems). Control positivo, mAb αCD28 (h12). Control negativo, inserto que carece de fago (h5-h7).

Figs. 5B, 5C Actividad antagonista de *pe12*. Se indujeron CMSP con 100 ng/ml de SEB (\circ), 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de *pe12* (véase A) o ambos (\bullet). Se determinaron ARNm de IL2, IFN- γ y de actina e IL10.

Fig. 5D *pe12* y *pc3* protegen ratones de la muerte por SEB. Se expusieron grupos de 10 ratones a 7,5 μg de SEB sola (\square) o con 0,2 μg de *pe12* (\bullet) o 0,5 μg de *pc3* (\blacktriangle) (de otro ensayo de ECL). Los controles recibieron 1 μg de *pe12* (\circ) o *pc3* (Δ) 30 min antes de la inyección de D-galactosamina sin SEB. Se monitorizó la supervivencia.

Fig. 5E Actividad antagonista de *pd7*. Se indujeron CMSP con 100 ng/ml de SEB, *pd7* a las concentraciones indicadas en ng/ml, o ambos. Se determinaron ARNm de IL2 e IFN- γ .

Fig. 5F Actividad antagonista de *pc3*. Se indujeron CMSP con 100 ng/ml de SEB, *pc3* a las concentraciones indicadas en ng/ml, o ambos. Se determinó ARNm de IL2.

Fig. 5G *pd7* protege ratones de la muerte por SEB. Se expusieron grupos de 10 ratones con 6 μg de SEB sola (\square) o con 0,5 μg de *pd7* (\blacktriangle). Los controles recibieron 2,6 μg de *pd7* (Δ) 30 min antes de la inyección de D-galactosamina sin SEB. Se monitorizó la supervivencia.

Abreviaturas: T (tiempo), h (hora), $\mu\text{g}/\text{ml}$ (picogramos/mililitro), Sup. (supervivencia).

Figura 6A-6I *Los peptidomiméticos de la interfase del dímero predichos para CD28 son antagonistas de superantígeno*

Fig. 6A Complejo de CTLA4/B7-2 y la interfase del dímero en CTLA4. En el diagrama de cintas del complejo de CTLA4/B7-2 (1185.pdb; [Schwartz (2001) arriba], generado con RasMol, un monómero de B7-2 se muestra en magenta, el otro en gris y CTLA4 en azul, con MYPPPY (SEC ID N.º: 22) en amarillo, YVIDPE (SEC ID N.º: 18) (HVKGKH en CD28, SEC ID N.º: 10) en rojo y VVLASS (SEC ID N.º: 23) (MLVAYD (SEC ID N.º: 24) en CD28) en verde, como en el alineamiento de secuencias de CD28 y CTLA4 humanos (h) y murinos (m) mostrados más adelante; los residuos conservados aparecen en negrita.

Fig. 6B Efecto de sCD28 y pTA sobre la inducción de ARNm de IFN- γ por αCD28 . Se indujeron CMSP humanos con 260 ng/ml de mAb αCD28 solo o con sCD28 o pTA, en $\mu\text{g}/\text{ml}$. Se determinó ARNm de IFN- γ y de actina.

Figs. 6C-6F pTA antagoniza la inducción de ARNm de citocinas Th1 por SEB. Se indujeron CMSP por SEB sola (\circ) o con 0,1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de sCD28 (\bullet) o 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de pTA (\blacktriangle). Se determinaron ARNm de IL2, ITN- γ y actina, se determinaron IL10 e IL4. En un experimento separado (F), pTA se añadió en concentraciones crecientes ($\mu\text{g}/\text{ml}$); se determinó ARNm de IFN- γ y de actina.

Figs. 6G, 6H p1TA y p2TA antagonizan la inducción de ARNm de IL2 y de IFN- γ por SEB o TSST-1. (G) Se indujeron CMSP con 100 ng/ml de SEB sola o con 0,1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de p1TA, p2TA o ambos. (H) Se indujeron CMSP con 100 ng/ml de TSST-1 (Sigma) solo o con p1TA o p2TA como se muestra, en $\mu\text{g}/\text{ml}$. Se determinó ARNm de IL2 y de IFN- γ ; el ARNm de actina (no mostrado) sirvió de control de carga.

Fig. 6I Alineamiento de secuencias de ICOS con CD28 y CTLA4. Se muestran secuencias de aminoácidos de los dominios extracelulares de ICOS humano (h) (número de acceso AAH28006), ICOS murino (m) (número de acceso NP_059508), CD28 y CTLA4. La secuencia de CD28 está numerada. Se muestrean residuos conservados entre hICOS y hCD28 en azul verdoso oscuro; el amarillo marca el sitio de unión de B7. Residuos conservados aparecen en negrita. Un hueco en CD28 usado para el alineamiento con ICOS se muestra en magenta. Secuencias en ICOS coloreadas de cian se solapan con las dos secuencias de la interfase del dímero (rojas y verdes) en CD28 y CTLA4; el péptido de ICOS correspondiente p1TC se alinea con el péptido de CD28 p1TA y el péptido de CTLA4 p1TB, y el péptido de ICOS correspondiente p2TC se alinea con el péptido de CD28 p2TA y el péptido de CTLA4 p2TB. Abreviaturas: T (tiempo), h (hora), $\mu\text{g}/\text{ml}$ (picogramos/mililitro).

Figura 7A-7J *Péptidos miméticos de CD28, CTLA4 e ICOS protegen ratones del choque letal*

Fig. 7A La actividad antagonista de p1TA es específica de secuencia. Se indujeron CMSP con SEB sola o con 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de p1TA o su forma desordenada de p1TAsc (CHGHLVPHK; también indicada por SEC ID N.º: 4). Se determinó ARNm de IFN- γ y de actina.

Fig. 7B, 7C Péptidos miméticos de CD28 protegen ratones de la exposición letal con SEB. Se expusieron grupos de 10 ratones a 6 μg de SEB sola (Δ) o con p1TA (1 μg) (\blacktriangle), p12B (5 μg) (\circ) o p1TAsc (1 μg) (\bullet) (Fig. 7B), o con 0,2 μg de p2TA (\blacktriangle) o su forma desordenada de p2TAsc (ASMDYPVL; también indicada por SEC ID N.º: 5) (\bullet) (Fig. 7C). Los controles recibieron 25 μg de p1TA (Fig. 7B) o p2TA (Fig. 7C) 30 min antes la inyección de D-galactosamina sin SEB (Δ).

Fig. 7D-7F Actividad antagonista de péptidos miméticos de CTLA. Se indujeron CMSP con 100 ng/ml de SEB sola (○) o con 1 µg/ml de *p1TB*(A) o *p2TB* (■). Se determinaron ARNm de IL2, IFN-γ y de actina e IL10.

Se expusieron grupos de 10 ratones a 6 µg de SEB sola (□) o a 0,5 µg de *p1TB* (▲) o *p2TB* (■).

Fig. 7G-7I Actividad antagonista de péptidos miméticos de ICOS. CMSP se indujeron con 100 ng/ml de SEB sola (○) o con 1 µg/ml de *p1TC* (▲) o 0,1 µg/ml de *p2TC* (■). Se determinaron ARNm de IL2, IFN-γ y de actina e IL10. Se expusieron grupos de 10 ratones a 5 µg de SEB sola (○) o con 2,6 µg de *p1TC* (●) y con 6 µg de SEB sola (Δ) o con 0,2 µg de *p2TC* (▲).

Fig. 7J Modelo para la activación de células Th1 por superantígenos. Se requiere la unión directa del superantígeno a CD28 para la activación y puede bloquearse por peptidomiméticos de la región de contacto en cada ligando: el dominio antagonista en superantígenos y los dos bordes (rojo y verde) de la interfase del dímero en CD28 predicha. Abreviaturas: T (tiempo), h (hora), pg/ml (picogramos/mililitro), Sup. (supervivencia), sAg (superantígeno), Pep. mim. (peptidomimético), Ce. (célula), APC (célula presentadora de antígeno).

Descripción detallada de la invención

Se sabe que CD28 actúa de ligando coestimulante para antígenos convencionales. En el presente estudio, los inventores muestran que, con el fin de proporcionar la señal para la activación de Th1, un superantígeno debe unirse directamente a CD28. Así, como se demuestra por los siguientes ejemplos, CD28 sirve del tercer receptor de superantígeno, además de la molécula de clase II del MHC y TOR.

La Figura 6A muestra que el sitio de unión para superantígenos en CD28 es la interfase del dímero bipartita predicha del alineamiento con CTLA4. El dominio de superantígeno que involucra CD28 está alejado de los sitios de unión para tanto la molécula de clase II del MHC como TCR, dejándola accesible para la interacción con las moléculas de la familia de CD28 (Figura 1E). Este dominio contiene al menos parte de un motivo de la hélice α de la bisagra de la cadena β, que está conservado entre los superantígenos bacterianos [Arad (2000) arriba].

Como se muestra por los inventores, SEB induce una expresión vigorosa y concomitante de genes de citocina Th1 y Th2, pero solo la inducción de la respuesta de Th1 depende de la señalización de CD28. Así, parece que los superantígenos nombran a un ligando coestimulante del huésped para su uso como su receptor forzoso, uniéndolo directamente. Esta estrategia puede emplearse más ampliamente por patógenos. Receptores similares a Toll reconocen componentes microbianos y así activan la respuesta inmunitaria innata [revisado por Akira, S. y col. Nat. Immunol. 2:675-680 (2001); Janeway, C.A. Jr. y Medzhitov, R. Annu. Rev. Immunol. 20:197-216 (2002)]. En el presente estudio, los inventores muestran que CD28 actúa no solo como ligando coestimulante, sino también como sensor de superantígenos bacterianos.

La presente invención proporciona líneas de evidencia independientes para soportar el concepto de que hay unión directa de superantígenos a CD28. El análisis de la unión en equilibrio de SPR (resonancia de plasmones superficiales) mostró que CD28 se une directamente a SEB, con una afinidad de 28 nM (Figura 4A). CD28 soluble bloqueó la inducción del ARN de citocinas Th1 por SEB (Figura 2D). El peptidomimético de superantígenos *p12B*, homólogo al 'dominio antagonista' de la hélice α de la bisagra de la cadena β en SEB, y los péptidos miméticos de CD28 *p1TA* y *p2TA* (SEC ID N.º: 9 y 12, respectivamente), correspondientes a dos secuencias no contiguas que forman la interfase de homodimerización predicha en CD28, bloquearon cada uno la inducción mediada por superantígeno de ARNm de IL2 y de IFN-γ en CMSP humanas (Figuras 1D, 6G y 6H) y protegieron los ratones de la exposición letal con SEB (Figuras 7B y 7C).

Se seleccionaron antagonistas de péptidos novedosos de SEB, eficaces *in vivo*, de una biblioteca de expresión en fago al azar únicamente por su afinidad por el sitio de unión del superantígeno en CD28 (Figura 5). Además, *p12B* bloqueó la inducción de ARNm de citocinas Th1 por αCD28, solo o en combinación con αCD3 (Figuras 3B y 3C). Así, el péptido bloqueó la activación de Th1 mediada por CD28 incluso en ausencia de superantígeno, sugiriendo que se une a CD28. De hecho, en la cinética de SPR, CD28 se unió al péptido *p12* con una afinidad similar a la de para SEB (Figura 4D). Así, SEB usa su dominio antagonista para unirse a CD28.

Así, en un primer aspecto, la presente invención se refiere a un péptido aislado y purificado que comprende una secuencia de aminoácidos derivada de una interfase del dímero de un miembro de la ruta coestimulante de linfocitos T. Por tanto, la invención proporciona un péptido aislado y purificado que consiste en:

(a) un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es una interfase del dímero de un miembro de la ruta coestimulante de linfocitos T seleccionada de la interfase del dímero dentro de CD28 humano, CTLA4 humano, ICOS humano y PD-1 humano, estando dicha secuencia de aminoácido seleccionada de los residuos de aminoácidos 10-15 o 116-121 de SEC ID N.º: 19, residuos de aminoácidos 10-15 o 115-120 de SEC ID N.º: 20, residuos de aminoácidos 10-15 o 119-124 de SEC ID N.º: 21, y residuos de aminoácidos 8-13 o 110-116 de SEC ID N.º: 59, en el que el péptido:

(i) es un péptido de la interfase del dímero de CD28 humano que consiste en la secuencia de aminoácidos HVKGKHLCP como se indica por SEC ID N.º: 9 o la secuencia de aminoácidos SPMLVAYD como se indica por SEC ID N.º: 12;

5 (ii) es un péptido de la interfase del dímero de CTLA4 humano que consiste en la secuencia de aminoácidos YVIDPEPCP como se indica por SEC ID N.º: 14 o la secuencia de aminoácidos PAWLASS como se indica por SEC ID N.º: 15;

(iii) es un péptido de la interfase del dímero de ICOS humano que consiste en la secuencia de aminoácidos YESQLCCQL como se indica por SEC ID N.º: 16 o la secuencia de aminoácidos GEINGSAN como se indica por SEC ID N.º: 17; o

10 (iv) es un péptido de la interfase del dímero de PD-1 humano que consiste en la secuencia de aminoácidos RVTERRAEV como se indica por SEC ID N.º: 57 o la secuencia de aminoácidos PALLWTE como se indica por SEC ID N.º: 58;

15 (b) un péptido que es al menos el 80 % homólogo al péptido de CD28 humano de SEC ID N.º: 9 o 12, en el que el péptido resultante de (b) mantiene la capacidad de inhibir la interacción entre un miembro de la ruta coestimulante de linfocitos T y un superantígeno;

(c) un péptido de (a) que tiene una inserción de un residuo de aminoácido, en el que el péptido resultante de (c) mantiene la capacidad de inhibir la interacción entre un miembro de la ruta coestimulante de linfocitos T y un superantígeno;

20 (d) un péptido de (a), (b) o (c) que está prolongado en el extremo N y/o el extremo C:

(i) por una lauril-cisteína en el extremo N y una cisteína en el extremo C; o

25 (ii) por un resto orgánico que no es un residuo de aminoácido que se produce naturalmente o sintético; o

(iii) por residuo(s) de aminoácido(s) hidrófobo(s) idéntico(s) que puede(n) ser residuos de aminoácidos que se producen naturalmente o sintéticos; o

30 (iv) por una cola de lisil-palmitoilo, en el que dicha cola está en el extremo N, en el que el péptido resultante de (c) mantiene la capacidad de inhibir la interacción entre un miembro de la ruta coestimulante de linfocitos T y un superantígeno;

(e) un dímero o multímero de (a), (b), (c) o (d) en el que el péptido resultante de (e) mantiene la capacidad de inhibir la interacción entre un miembro de la ruta coestimulante de linfocitos T y un superantígeno.

35 La ruta coestimulante de linfocitos T es la ruta de CD28/B7. Por consiguiente, el miembro de la ruta de CD28/B7 puede ser uno cualquiera de CD28, CTLA-4, ICOS y PD-1.

40 Según una realización específicamente preferida, el miembro de la ruta puede ser la molécula de CD28, y la interfase del dímero dentro de CD28 comprende los residuos de aminoácidos 10-15 o 116-121 de la secuencia de aminoácidos de CD28 humano, como se indica por SEC ID N.º: 19, en el que el péptido aislado y purificado consiste en:

(a) un péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos que está seleccionada de la secuencia de aminoácidos HVKGKHLCP como se indica por SEC ID N.º: 9 y la secuencia de aminoácidos SPMLVAYD como se indica por SEC ID N.º: 12;

45 (b) un péptido que es al menos el 80 % homólogo al péptido de (a), en el que el péptido resultante de (b) mantiene la capacidad de inhibir la interacción entre un miembro de la ruta coestimulante de linfocitos T y un superantígeno;

(c) un péptido de (a) que tiene una inserción de un residuo de aminoácido, en el que el péptido resultante de (c) mantiene la capacidad de inhibir la interacción entre un miembro de la ruta coestimulante de linfocitos T y un superantígeno;

50 (d) un péptido de (a), (b) o (c) que está prolongado en el extremo N y/o el extremo C:

(v) por una lauril-cisteína en el extremo N y una cisteína en el extremo C; o

55 (vi) por un resto orgánico que no es un residuo de aminoácido que se produce naturalmente o sintético; o

(vii) por residuo(s) de aminoácido(s) hidrófobo(s) idéntico(s) que puede(n) ser residuos de aminoácidos que se producen naturalmente o sintéticos; o

60 (viii) por una cola de lisil-palmitoilo, en el que dicha cola está en el extremo N, en el que el péptido resultante de (c) mantiene la capacidad de inhibir la interacción entre un miembro de la ruta coestimulante de linfocitos T y un superantígeno; o

(e) un dímero o multímero de (a), (b), (c) o (d), en el que el péptido resultante de (e) mantiene la capacidad de inhibir la interacción entre un miembro de la ruta coestimulante de linfocitos T y un superantígeno.

65 Según otra realización preferida, el miembro de la ruta puede ser la molécula de CTLA-4, y la interfase del dímero dentro de CTLA-4 comprende los residuos de aminoácidos 10-15 o 115-120 de la secuencia de aminoácidos de

CTLA-4 humana, como se indica por SEC ID N.º: 20, en el que el péptido aislado y purificado de la invención consiste en:

- 5 (a) un péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos que está seleccionada de una de la secuencia de aminoácidos YVIDPEPCP como se indica por SEC ID N.º: 14 y la secuencia de aminoácidos PAWLASS como se indica por SEC ID N.º: 15;
- (b) un péptido de (a) que está prolongado en el extremo N y/o el extremo C:
- 10 (i) por lauril-cisteína en el extremo N y una cisteína en el extremo C; o
- (ii) por un resto orgánico que no es un residuo de aminoácido que se produce naturalmente o sintético; o
- (iii) por residuo(s) de aminoácido(s) hidrófobo(s) idéntico(s) que puede(n) ser residuos de aminoácidos que se producen naturalmente o sintéticos; o
- 15 (iv) por una cola de lisil-palmitoílo, en el que dicha cola está en el extremo N, en el que el péptido resultante de (b) mantiene la capacidad de inhibir la interacción entre un miembro de la ruta coestimulante de linfocitos T y un superantígeno;
- (c) un péptido de (a) que tiene una inserción de un residuo de aminoácido, en el que el péptido resultante de (c) mantiene la capacidad de inhibir la interacción entre un miembro de la ruta coestimulante de linfocitos T y un superantígeno;
- 20 (d) un dímero o multímero de (a), (b) o (c), en el que el péptido resultante de (e) mantiene la capacidad de inhibir la interacción entre un miembro de la ruta coestimulante de linfocitos T y un superantígeno.

25 En otra realización más, el miembro de la ruta puede ser la molécula de ICOS y la interfase del dímero dentro de ICOS comprende todos o parte de los residuos de aminoácidos 10-15 o 119-124 de secuencia de aminoácidos de ICOS humano como se indica por SEC ID N.º: 21, en el que el péptido aislado y purificado de la invención consiste en:

- 30 (a) péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos que está seleccionada de la secuencia de aminoácidos YESQLCCQL como se indica por SEC ID N.º: 16 y la secuencia de aminoácidos GEINGSAN como se indica por SEC ID N.º: 17;
- (b) un péptido de (a) o (b) que está prolongado en el extremo N y/o el extremo C:
- 35 (i) por lauril-cisteína en el extremo N y una cisteína en el extremo C; o
- (ii) por un resto orgánico que no es un residuo de aminoácido que se produce naturalmente o sintético; o
- (iii) por residuo(s) de aminoácido(s) hidrófobo(s) idéntico(s) que puede(n) ser residuos de aminoácidos que se producen naturalmente o sintéticos; o
- 40 (iv) por una cola de lisil-palmitoílo, en el que dicha cola está en el extremo N, en el que el péptido resultante de (b) mantiene la capacidad de inhibir la interacción entre un miembro de la ruta coestimulante de linfocitos T y un superantígeno;
- (c) un péptido de (a) que tiene una inserción de un residuo de aminoácido, en el que el péptido resultante de (c) mantiene la capacidad de inhibir la interacción entre un miembro de la ruta coestimulante de linfocitos T y un superantígeno;
- 45 (d) un dímero o multímero de (a), (b) o (c), en el que el péptido resultante de (d) mantiene la capacidad de inhibir la interacción entre un miembro de la ruta coestimulante de linfocitos T y un superantígeno.

50 Todavía además, el miembro de la ruta puede ser la molécula de PD-1. Aunque PD-1 se conoce como un monómero, los dominios en PD-1 que se solapan con la interfase del dímero de CTLA4 están similarmente plegados.

55 El péptido de la invención es un péptido inmunomodulador que puede modular una ruta coestimulante de linfocitos T.

El péptido de la invención puede comprender una secuencia de aminoácidos de la interfase del dímero de un miembro de la ruta coestimulante de linfocitos T, que es un miembro de la familia de CD28/B7.

60 Más específicamente, el péptido de la invención comprende una secuencia de aminoácidos de la interfase del dímero de uno cualquiera de CD28, CTLA-4, ICOS y PD-1.

65 La estructura de CD28 no se ha resuelto, pero probablemente es similar a la de CTLA4 (Figura 6A) [Schwartz (2001) arriba; Luhder (2003) arriba]. CD28 y CTLA4 muestran homología de secuencias global, con identidad en sus dominios de unión B7, aunque se diferencian completamente en dos secuencias que crean la interfase del dímero en CTLA4, lo más probablemente para prevenir la formación de heterodímeros [Schwartz (2001) arriba; Collins (2002) arriba]. En la proteína CTLA4 plegada, estas secuencias remotas están yuxtapuestas (Figura 6A).

- Sorprendentemente, como se muestra por los ejemplos, los péptidos miméticos de CD28 correspondientes *p1TA* y *p2TA* fueron protectores *in vivo* cuando están presentes en relación aproximadamente equimolar a SEB. Estos resultados proporcionan una poderosa evidencia de que los inventores han identificado el sitio de unión del superantígeno correcto en CD28 y que este sitio está compuesto, formado a partir de secuencias encontradas en *p1TA* y *p2TA* (SEC ID N.º: 9 y 12, respectivamente). Los péptidos que se derivan de cada borde de la interfase del dímero, predicho para CD28 únicamente basándose en su alineamiento con CTLA4, bloquearon la acción de superantígenos tan ampliamente diferentes como SEB y TSST-1, que muestran que ambos usan CD28 como receptor.
- CD28 pertenece a una tríada de ligandos coestimulantes: CD28, CTLA4 e ICOS. Estas proteínas muestran hasta el 33 % de identidad y están codificadas por genes fuertemente agrupados [Carreno y Collins (2002) arriba]. Los inventores han mostrado que SEB se une directamente a cada uno de ellos, con una afinidad similar (Figuras 4A, 4B y 4C). La unión se produce en la interfase del dímero de cada receptor coestimulante, que es única. Los péptidos que se derivan de cualquier borde de la interfase del dímero bipartita en CTLA4 o que se predijeron para ICOS por alineamiento (Fig. 6I) son antagonistas de superantígenos fuertes que, al igual que los péptidos miméticos de CD28 *p1TA* y *p2TA*, protegen a los ratones de exposición letal a SEB a una relación molar muy baja con respecto a la toxina (Figura 7). Evidentemente, el modo de acción de estos antagonistas es competir con CD28 por su sitio de unión en superantígenos, el dominio antagonista, ya que CD28, CTLA4 e ICOS se unen cada uno directamente a este dominio, con afinidad sustancial (Figuras 4D, 4E y 4F).
- Las secuencias de aminoácidos de la interfase del dímero bipartita en CTLA4 y aquellas predichas para CD28 [Schwartz (2001) arriba] e ICOS (presente estudio) carecen de cualquier homología, probablemente para prevenir la formación de heterodímeros. Los análisis funcionales de la presente invención muestran que cada uno usa esta interfase para unirse al superantígeno. Evidentemente, aunque son distintas en secuencias, las tres interfases del dímero están plegadas similarmente. El dominio antagonista en superantígenos muestra asimismo conservación espacial a pesar de la heterogeneidad de secuencias [Arad (2000) arriba]. Así, en ambos conjuntos de ligandos, la tríada de receptores y superantígenos, características estructurales generan la superficie de contacto.
- Se ha resuelto la estructura del receptor coestimulante muerte-1 programada (PD-1) y puede superponerse a la estructura de CTLA4, permitiendo el alineamiento de sus secuencias de aminoácidos [Zhang (2004) arriba]. Las secuencias YVIDPEPCP (*p1TB*, SEC ID N.º: 14) y PAVVLASS (*p2TB*, SEC ID N.º: 15), relacionadas con la interfase del dímero en CTLA4, están alineadas con las secuencias de PD-1 RVTERRAEV (*p1TD*, SEC ID N.º: 57) y PALLVTE (*p2TD*, SEC ID N.º: 58), respectivamente. Aunque PD-1 es un monómero, los dominios en PD-1 que se solapan con *p1TD* y *p2TD* están plegados similarmente a aquellos en CTLA4 que se solapan con *p1TB* y *p2TB* [Zhang (2004) arriba]. Por tanto, los péptidos *p1TD* y *p2TD* derivados de estos dos dominios no contiguos en PD-1 son posibles competidores para el sitio de unión para CD28 en un superantígeno, que producirá la inhibición de la acción del superantígeno.
- En una realización específicamente preferida, el péptido de la invención se deriva de una interfase del dímero dentro de la molécula de CD28 que comprende los residuos 10-15 o 116-121 de la secuencia de aminoácidos de CD28 humano como se indica por SEC ID N.º: 12. Debe observarse que la secuencia de aminoácidos de CD28 humano mostrada por Fig. 6A e indicada por SEC ID N.º: 19 representa solo la parte extracelular de la secuencia de CD28 humano según N.º de acceso de GenBank P10747. Como se muestra por la Fig. 6A, la interfase del dímero de CD28 predicha se corresponde con la interfase del dímero de CTLA-4, en posición pero no en secuencia (posiciones 10-15 y 115-120 de CTLA-4). Debe observarse adicionalmente que la secuencia de aminoácidos de CTLA-4 humana mostrada por la Fig. 6A representa solo la parte extracelular de la secuencia de CTLA-4 humano según N.º de acceso de GenBank AAO17066.
- Un péptido preferido específico de la invención se designa *p1TA* y tiene la secuencia de aminoácidos HVK GKHLCP como se indica por SEC ID N.º: 9.
- Otro péptido preferido específico de la invención se designa *p2TA* y tiene la secuencia de aminoácidos SPMLVAYD, como se indica por SEC ID N.º: 12.
- Alternativamente, el péptido de la invención puede comprender una secuencia de aminoácidos de la interfase del dímero dentro de la molécula de CTLA-4, cuya interfase del dímero comprende los residuos de aminoácidos 10-15 o 115-120 de la secuencia de aminoácidos de CTLA-4 humana como se indica por SEC ID N.º: 20, en el que el péptido consiste en:
- (a) un péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos que está seleccionada de una de la secuencia de aminoácidos YVIDPEPCP como se indica por SEC ID N.º: 14 y la secuencia de aminoácidos PAVVLASS como se indica por SEC ID N.º: 15;
 - (b) un péptido de (a) que está prolongado en el extremo N y/o el extremo C:
 - (i) por lauril-cisteína en el extremo N y una cisteína en el extremo C; o

- (ii) por un resto orgánico que no es un residuo de aminoácido que se produce naturalmente o sintético;
o
(iii) por residuo(s) de aminoácido(s) hidrófobo(s) idéntico(s) que puede(n) ser residuos de aminoácidos que se producen naturalmente o sintéticos; o
5 (iv) por una cola de lisil-palmitoílo, en el que dicha cola está en el extremo N, en el que el péptido resultante de (b) mantiene la capacidad de inhibir la interacción entre un miembro de la ruta coestimulante de linfocitos T y un superantígeno;
- (c) un péptido de (a) que tiene una inserción de un residuo de aminoácido, en el que el péptido resultante de (c) mantiene la capacidad de inhibir la interacción entre un miembro de la ruta coestimulante de linfocitos T y un superantígeno;
10 (d) un dímero o multímero de (a), (b) o (c), en el que el péptido resultante de (e) mantiene la capacidad de inhibir la interacción entre un miembro de la ruta coestimulante de linfocitos T y un superantígeno.
- 15 Más específicamente, tal péptido consiste en la secuencia de aminoácidos YVIDPEPCP como se indica por SEC ID N.º: 14 o la secuencia de aminoácidos PVVLASS, como se indica por SEC ID N.º: 15.
- Por consiguiente, un péptido preferido específico se designa *p1TB* y tiene la secuencia de aminoácidos YVIDPEPCP, como se indica por SEC ID N.º: 14.
20
- Otro péptido específico preferido se designa *p2TB* y tiene la secuencia de aminoácidos PAWASS como se indica por SEC ID N.º: 15.
- En otra alternativa más, el péptido de la invención puede comprender una secuencia de aminoácidos de la interfase del dímero dentro de la molécula de ICOS, interfase del dímero que comprende los residuos de aminoácidos 10-15 o 119-124 de secuencia de aminoácidos de ICOS humano como se indica por SEC ID N.º: 21, en el que el péptido consiste en:
25
- (a) péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos que está seleccionada de la secuencia de aminoácidos YESQLCCQL como se indica por SEC ID N.º: 16 y la secuencia de aminoácidos GEINGSAN como se indica por SEC ID N.º: 17;
30 (b) un péptido de (a) o (b) que está prolongado en el extremo N y/o el extremo C:
- (i) por lauril-cisteína en el extremo N y una cisteína en el extremo C; o
35 (ii) por un resto orgánico que no es un residuo de aminoácido que se produce naturalmente o sintético;
o
(iii) por residuo(s) de aminoácido(s) hidrófobo(s) idéntico(s) que puede(n) ser residuos de aminoácidos que se producen naturalmente o sintéticos; o
40 (iv) por una cola de lisil-palmitoílo, en el que dicha cola está en el extremo N, en el que el péptido resultante de (b) mantiene la capacidad de inhibir la interacción entre un miembro de la ruta coestimulante de linfocitos T y un superantígeno;
- (c) un péptido de (a) que tiene una inserción de un residuo de aminoácido, en el que el péptido resultante de (c) mantiene la capacidad de inhibir la interacción entre un miembro de la ruta coestimulante de linfocitos T y un superantígeno;
45 (d) un dímero o multímero de (a), (b) o (c), en el que el péptido resultante de (d) mantiene la capacidad de inhibir la interacción entre un miembro de la ruta coestimulante de linfocitos T y un superantígeno.
- Más específicamente, el péptido de la invención puede consistir en la secuencia de aminoácidos YESQLCCQL como se indica por SEC ID N.º: 16 o la secuencia de aminoácidos GEINGSAN, como se indica por SEC ID N.º: 17.
50
- Un péptido de ejemplo específico se designa *p1TC* y tiene la secuencia de aminoácidos YESQLCCQL, como se indica por SEC ID N.º: 16.
- 55 Otro ejemplo específico es un péptido designado *p2TC* que tiene la secuencia de aminoácidos GEINGSAN, como se indica por SEC ID N.º: 17.
- Según otra realización preferida, el péptido de la invención comprende una secuencia de aminoácidos derivada de dominios en la molécula de PD-1 que se corresponden con la interfase del dímero en CTLA4, que comprende residuos de aminoácidos 8-13 o 110-116 [Zhang (2004) arriba] de la secuencia de PD-1 humano como se indica por SEC ID N.º: 59, en el que el péptido consiste en:
60
- (a) un péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos que está seleccionada de la secuencia de aminoácidos RVTERRAEV como se indica por SEC ID N.º: 57 y la secuencia de aminoácidos PALLVVTE como se indica por SEC ID N.º: 58;
65 (b) un péptido de (a) que está prolongado en el extremo N y/o el extremo C:

(i) por lauril-cisteína en el extremo N y una cisteína en el extremo C; o
 (ii) por un resto orgánico que no es un residuo de aminoácido que se produce naturalmente o sintético;
 o
 (iii) por residuo(s) de aminoácido(s) hidrófobo(s) idéntico(s) que puede(n) ser residuos de aminoácidos que se producen naturalmente o sintéticos; o
 (iv) por una cola de lisil-palmitoílo, en el que dicha cola está en el extremo N, en el que el péptido resultante de (b) mantiene la capacidad de inhibir la interacción entre un miembro de la ruta coestimulante de linfocitos T y un superantígeno;

5
 10 (c) un péptido de (a) que tiene una inserción de un residuo de aminoácido, en el que el péptido resultante de (c) mantiene la capacidad de inhibir la interacción entre un miembro de la ruta coestimulante de linfocitos T y un superantígeno;
 (d) un dímero o multímero de (a), (b) o (c), en el que el péptido resultante de (c) mantiene la capacidad de inhibir la interacción entre un miembro de la ruta coestimulante de linfocitos T y un superantígeno.

15 Más específicamente, el péptido de la invención puede consistir en una secuencia de aminoácidos derivada de una cualquiera de las secuencias de aminoácidos RVTERRAEV (como se indica por SEC ID N.º: 57) y PALLVVTE (como se indica por SEC ID N.º: 58).

20 Un péptido preferido específico de la invención se designa *p1TD* y tiene la secuencia de aminoácidos RVTERRAEV, como se indica por SEC ID N.º: 57.

Otro péptido preferido específico de la invención se designa *p2TD* y tiene la secuencia de aminoácidos PALLWTE, como se indica por SEC ID N.º: 58.

25 La homología o similitud entre cualquier péptido de la presente invención y la interfase del dímero correspondiente dentro de la molécula de CD28 puede oscilar entre el 80 % y el 100 % de homología, preferentemente, 80 % al 90 % de homología.

30 Un péptido derivado del dominio espacialmente conservado de un exotoxina pirógena que forma en ella un giro central que empieza dentro de una hebra β 7 y que conecta la hebra β 7, mediante la hebra β corta 8, con una hélice α 4, y que termina dentro de la hélice α 4, basada en la numeración de dominios de SEB, por ejemplo, *p12A* y *p12B* (SEC ID N.º: 1 y 3, respectivamente) se une específicamente a la interfase del dímero de las moléculas de la familia de CD28, tales péptidos están fuera del ámbito de la solicitud.

35 Por tanto, según una realización preferida, la invención se refiere a péptidos que se unen a la interfase del dímero de los tres miembros de la familia de CD28, CD28, CTLA-4 e ICOS, además de a PD-1, a condición de que dicho péptido no se derive del dominio espacialmente conservado de una exotoxina pirógena que forma en ella un giro central que empieza dentro de una hebra β 7 y que conecta la hebra β 7, mediante la hebra β corta 8, con una hélice α 4, y que termina dentro de la hélice α 4, basada en la numeración de dominios de SEB [Arad (2000) arriba].

40 Como se describe para el Ejemplo 8 y la Figura 5A, los inventores han realizado el cribado de la biblioteca de expresión en fago sobre sCD28 inmovilizado, que comprende la interfase del dímero de CD28 y fagos unidos desplazados con SEB. En este cribado, se aislaron diferentes péptidos y se analizaron adicionalmente para su actividad antagonista. Por tanto, también se refiere a péptidos que comprenden una secuencia de aminoácidos como se indica por una cualquiera de SEC ID N.º: 6, 7 y 8, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55 y 56.

50 También se refiere al péptido designado *pe12* que tiene la secuencia de aminoácidos SHFTHNRHGHST, como se indica por SEC ID N.º: 6.

Otro péptido específico citado se designa *pd7*. Este péptido tiene la secuencia de aminoácidos WHAHPHKPVVA, como se indica por SEC ID N.º: 7.

55 También se cita el péptido designado *pc3* que y tiene la secuencia de aminoácidos FHKHKNPSPGPII, como se indica por SEC ID N.º: 8.

60 Los péptidos de la invención inhiben la interacción directa entre un miembro de la ruta coestimulante de linfocitos T, preferentemente la molécula de CD28 y una exotoxina pirógena. Por tanto, estos péptidos sirven de antagonistas de la activación de linfocitos T mediada por toxinas, y protegen del choque tóxico inducido por una exotoxina pirógena o por una mezcla de exotoxinas pirógenas.

65 Debe apreciarse que, por el término "inserciones", como se usa en el presente documento, se indica cualquier adición de residuos de aminoácidos a los péptidos de la invención, de 1 residuo de aminoácido.

También se refiere a péptidos más largos que comprenden parte o toda la secuencia de aminoácidos de los péptidos citados, o en los que la secuencia peptídica básica de cualquiera de los péptidos citados se repite de aproximadamente 2 a aproximadamente 100 veces.

5 La ausencia de estructura de péptidos lineales les hace vulnerables a proteasas en suero humano y actúa reduciendo su afinidad por sitios diana, debido a que solo algunas de las posibles conformaciones pueden ser activas. Por tanto, se desea optimizar la estructura de péptidos antagonistas, por ejemplo, creando diferentes derivados de los diversos péptidos.

10 Con el fin de mejorar la estructura del péptido, los péptidos de la invención pueden acoplarse mediante su extremo N a un residuo de lauril-cisteína (LC) y/o mediante su extremo C a un residuo de cisteína (C), o a otro/s residuo/s adecuados para ligar el péptido a adyuvante/s para la inmunización, como se describirá en más detalle más adelante.

15 Los péptidos de la invención pueden todos estar positivamente cargados, negativamente cargados o ser neutros. Además, pueden estar en forma de un dímero, un multímero o en una conformación limitada, que puede obtenerse por puentes internos, ciclaciones de corto intervalo, prolongación u otras modificaciones químicas.

20 Además, los péptidos de la invención pueden prolongarse en el extremo N y/o extremo C de los mismos con residuo/s de aminoácidos hidrófobo/s idéntico/s o diferente/s que pueden ser residuo/s de aminoácidos que se produce/n naturalmente o sintético/s. Un residuo de aminoácido sintético preferido es D-alanina.

25 Un ejemplo adicional de una prolongación tal puede proporcionarse por péptidos prolongados tanto en el extremo N y/o extremo C de los mismos con un residuo de cisteína. Naturalmente, una prolongación tal puede conducir a una conformación limitada debido a la ciclación Cys-Cys resultante de la formación de un enlace disulfuro.

Otro ejemplo puede ser la incorporación de una cola de lisil-palmitoílo del extremo N, sirviendo la lisina de conector y el ácido palmítico de anclaje hidrófobo.

30 Además, los péptidos pueden prolongarse por residuo/s de aminoácido aromático/s, que puede/n ser residuo/s de aminoácidos que se produce/n naturalmente o sintético/s. Un residuo de aminoácido aromático preferido puede ser triptófano.

35 Sin embargo, según la invención, los péptidos de la invención pueden prolongarse en el extremo N y/o extremo C de los mismos con diversos restos orgánicos idénticos o diferentes que no son aminoácidos que se producen naturalmente o sintéticos. Como ejemplo de tal prolongación, el péptido puede prolongarse en el extremo N y/o extremo C del mismo con un grupo N-acetilo.

40 Para cada secuencia de péptidos individual usada por la invención y desvelada en el presente documento, la presente invención incluye la secuencia retro-inversa correspondiente en la que la dirección de la cadena del péptido se ha invertido y en la que todos los aminoácidos pertenecen a la serie D.

45 Según un segundo aspecto, la invención se refiere a una composición que comprende como principio activo un péptido purificado de la invención o cualquier combinación de los mismos y opcionalmente comprende además vehículo, diluyente, adyuvante y/o excipiente farmacéuticamente aceptable.

50 La invención proporciona además una composición según la invención, para su uso en un procedimiento de tratamiento de un trastorno inmunitario relacionado con un desequilibrio en la respuesta de Th1-Th2 en un sujeto en necesidad del mismo, en el que dicho trastorno inmunitario es uno cualquiera de una enfermedad autoinmunitaria, trastorno proliferativo maligno o no maligno, patología de rechazo del injerto, y un trastorno inducido por una exotoxina pirógena o por una mezcla de al menos dos exotoxinas pirógenas seleccionadas de choque tóxico e incapacitación o para su uso en un procedimiento de prevención de muerte inducida por una exotoxina pirógena o por una mezcla de al menos dos exotoxinas pirógenas.

55 Las composiciones de la invención también pueden comprender agentes activos adicionales, por ejemplo, inhibidores de la proteasa.

60 Más específicamente, trastornos inmunitarios relacionados con un desequilibrio en la respuesta de Th1-Th2 trastorno inmunorrelacionado puede ser, por ejemplo, una enfermedad autoinmunitaria (por ejemplo, esclerosis múltiple (EM), diabetes tipo 1, lupus, enfermedad de Graves y tiroiditis), trastornos proliferativos malignos y no malignos, patología de rechazo del injerto y enfermedad de injerto contra huésped, y trastornos inducidos por una exotoxina pirógena o por una mezcla de al menos dos exotoxinas pirógenas seleccionadas de choque tóxico, incapacitación y muerte, choque séptico y septicemia grave.

65 Según una realización preferida, la composición de la invención protege contra choque tóxico inducido por una exotoxina pirógena o por una mezcla de exotoxinas pirógenas. La composición de la invención comprende como

principio activo cualquiera de los péptidos inmunomoduladores purificados de la invención o cualquier combinación de los mismos en una cantidad eficaz para inhibir la expresión inducida por exotoxinas de un ARN codificado por los genes de IL2 y/o IFN- γ , y opcionalmente comprende además vehículo, diluyente, adyuvante y/o excipiente farmacéuticamente aceptable.

5 En una realización específicamente preferida, tal composición puede comprender como principio activo un péptido seleccionado del grupo que consiste en p1TA (como se indica por SEC ID N.º: 9), p2TA (como se indica por SEC ID N.º: 12), p1TB (como se indica por SEC ID N.º: 14), p2TB (como se indica por SEC ID N.º: 15), p1TC (como se indica por SEC ID N.º: 16), p2TC (como se indica por SEC ID N.º: 17), p1TD (como se indica por SEC ID N.º: 57), p2TD (como se indica por SEC ID N.º: 58) y cualquier combinación de los mismos.

10 Todavía además, la invención se refiere a una composición para inhibir la interacción directa entre un superantígeno y un sitio de unión del superantígeno en uno cualquiera de CD28, CTLA4, ICOS y PD-1. Esta composición comprende como principio activo un péptido aislado y purificado, en una cantidad eficaz para inhibir dicha interacción.

15 La composición farmacéutica de la invención puede administrarse y dosificarse según la buena práctica médica. La administración puede llevarse a cabo de diversas formas, que incluyen inyección intravenosa, intramuscular o subcutánea. Sin embargo, también son posibles otros procedimientos de administración tales como administración oral, rectal e intranasal.

20 La composición de la invención puede comprender la sustancia activa en forma libre y administrarse directamente al sujeto que va a tratarse. Alternativamente, dependiendo del tamaño de la molécula activa, puede ser deseable conjugarla con un vehículo antes de la administración. Las formulaciones terapéuticas pueden administrarse en cualquier formulación de dosificación convencional. Las formulaciones normalmente comprenden al menos un principio activo, como se ha definido anteriormente, junto con uno o más vehículos aceptables del mismo.

25 Cada vehículo debe ser tanto farmacéuticamente como fisiológicamente aceptable en el sentido de ser compatible con los otros componentes y no perjudicial para el paciente. Las formulaciones incluyen aquellas adecuadas para administración oral, rectal, nasal o parenteral (incluyendo subcutánea, intramuscular, intraperitoneal (IP), intravenosa (IV) e intradérmica). Las formulaciones pueden presentarse convenientemente en forma de dosificación unitaria y pueden prepararse por cualesquiera procedimientos bien conocidos en la técnica de la farmacia. La naturaleza, disponibilidad y fuentes, y la administración de todos aquellos compuestos que incluyen las cantidades eficaces necesarias para producir efectos deseables en un sujeto, son bien conocidos en la técnica y no necesitan describirse adicionalmente en el presente documento.

30 Las formas farmacéuticas adecuadas para uso en inyección incluyen disoluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de disoluciones o dispersiones inyectables estériles. En todos los casos, la forma debe ser estéril y debe ser fluida hasta el punto de que exista fácil jeringabilidad. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y debe preservarse frente la acción contaminante de microorganismos, tales como bacterias y hongos.

35 La prevención de la acción de microorganismos puede provocarse por diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares o cloruro sódico. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede provocarse por el uso en las composiciones de agentes que retrasan la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

40 Las disoluciones inyectables estériles se preparan incorporando los compuestos activos en la cantidad requerida en el disolvente apropiado con diversos de los otros componentes enumerados anteriormente, según se requiera, seguido de esterilización por filtración. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando los diversos principios activos esterilizados en un vehículo estéril que contiene el medio de dispersión básico y los otros componentes requeridos de aquellos enumerados anteriormente.

45 En el caso de polvos estériles para la preparación de las disoluciones inyectables estériles, el procedimiento preferido de preparación son técnicas de secado al vacío y liofilización que dan un polvo del principio activo más cualquier componente deseado adicional de una disolución previamente esterilizada por filtración de los mismos.

50 Las composiciones farmacéuticas de la invención generalmente comprenden un agente de tamponamiento, un agente que ajusta la osmolaridad de la misma, y opcionalmente, uno o más vehículos, excipientes y/o aditivos farmacéuticamente aceptables como se conocen en la técnica. También pueden incorporarse principios activos suplementarios en las composiciones. El vehículo puede ser disolvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido, y similares), mezclas adecuadas de los mismos y aceites vegetales. Puede mantenerse la fluidez apropiada, por ejemplo, por el uso de un recubrimiento, tal como lecitina, por el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersión y por el uso de tensioactivos.

Como se usa en el presente documento, "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos y similares. El uso de tales medios y agentes para sustancias activas farmacéuticas es bien conocido en la técnica. Excepto que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con el principio activo, se contempla su uso en la composición terapéutica.

La preparación de composiciones farmacéuticas es bien conocida en la técnica y se ha descrito en muchos artículos y libros de texto, véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, Gennaro A. R. ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, 1990, y especialmente las págs. 1521-1712 en él. La capacidad de discriminar entre propia y no propia es quizás el aspecto más fundamentalmente importante de la regulación inmunitaria. Esta propiedad se traduce en el reconocimiento inmunitario y destrucción de invasores infecciosos mientras que los tejidos huésped normales se quedan intactos. Esta respuesta altamente selectiva se caracteriza por un conjunto complicado de mecanismos reguladores de linfocitos T que se han descrito durante las últimas décadas. Un mecanismo tal diseñado para mantener la fidelidad de la respuesta inmunitaria es el requisito de dos señales distintas para la activación eficaz de linfocitos T específicos de antígeno: una señal específica de antígeno mediante el receptor de linfocitos T (Señal 1) y una señal coestimulante no relacionada (Señal 2) que se proporciona por factores solubles o moléculas de la superficie celular sobre la célula presentadora de antígeno (APC). La integración de estas dos señales desencadena la división y diferenciación celular de efectores y reguladores de la respuesta inmunitaria. Aparte de las implicaciones biológicas críticas de la coestimulación, la identificación de una señal coestimulante tiene importantes implicaciones para la intervención clínica, ya que los efectos del bloqueo de la coestimulación estarían limitados a solo aquellos linfocitos T cuyos receptores específicos de antígeno ya se han comprometido, es decir, linfocitos T que ya reciben la señal 1. Así, en principio, el bloqueo selectivo de la coestimulación de linfocitos T ofrece un modo específico de antígeno de elegir como diana respuestas inmunitarias sin conocimiento actual del antígeno específico implicado. En realidad, en algunos casos, los antagonistas de la ruta coestimulante pueden inducir la tolerancia específica de antígenos que previene la progresión de enfermedades autoinmunitarias y rechazo del injerto de órgano.

La importancia crítica de la coestimulación de CD28/B7 en la activación de linfocitos T ha conducido a múltiples estudios que examinan la función de la coestimulación en modelos experimentales de enfermedades autoinmunitarias. Estudios tempranos mostraron que la alteración de la coestimulación de CD28/B7 en el momento de la inmunización se asoció invariablemente con la reducción de la gravedad de la patología y, en algunos casos, con la prevención completa de la enfermedad. Por ejemplo, el bloqueo de CD28/B7 por CTLA-4Ig o, en algunos casos, mAbs anti-B7, redujo la gravedad de la enfermedad en modelos de ratón de esclerosis múltiple, miocarditis, artritis, tiroiditis y miastenia grave.

La 'cantidad terapéuticamente eficaz' para los fines en el presente documento es aquella determinada por consideraciones tales como se conocen en la técnica. La cantidad debe ser suficiente para inhibir la interacción directa entre un miembro de la ruta coestimulante de linfocitos T, que son las moléculas de CD28, CTLA-4, ICOS y PD-1, y un componente de un agente patógeno, tal como la exotoxina pirógena y para antagonizar la activación mediada por toxinas de linfocitos T.

Según una realización, la invención se refiere a los péptidos y composiciones de la invención para su uso en un procedimiento para el tratamiento de trastornos inmunitarios relacionados con un desequilibrio en la respuesta de Th1-Th2. Ejemplos de dichos trastornos son enfermedades autoinmunitarias (por ejemplo, esclerosis múltiple (EM), diabetes tipo 1, lupus, enfermedad de Graves y tiroiditis), trastornos proliferativos malignos y no malignos, patología de rechazo del injerto y enfermedad de injerto contra huésped.

Como se usa en el presente documento para describir la presente invención, los términos "trastorno proliferativo maligno", "cáncer", "tumor" y "neoplasia maligna" se refieren todos equivalentemente a una hiperplasia de un tejido u órgano. Si el tejido es una parte de los sistemas linfático o inmunitario, células malignas pueden incluir tumores no sólidos de células circulantes. Neoplasias malignas de otros tejidos u órganos pueden producir tumores sólidos. En general, la composición, además de los péptidos de la presente invención, puede usarse en el tratamiento de tumores no sólidos y sólidos, por ejemplo, carcinoma, melanoma, leucemia y linfoma.

Por tanto, según una realización preferida, el péptido inmunomodulador de la invención o una composición que comprende el mismo, puede usarse para el tratamiento o la inhibición de cánceres no sólidos, por ejemplo, neoplasias malignas hematopoyéticas tales como todos los tipos de leucemia, por ejemplo, leucemia linfocítica aguda (LLA), leucemia mielógena aguda (LMA), leucemia linfocítica crónica (LLC), leucemia mielógena crónica (LMC), síndrome mielodisplásico (SMD), leucemia por mastocitos, leucemia de células pilosas, enfermedad de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, linfoma de Burkitt y mieloma múltiple, además de para el tratamiento o inhibición de tumores sólidos tales como tumores en la boca y la cavidad bucal, faringe, laringe, senos paranasales, glándulas salivales mayores, glándula tiroidea, esófago, estómago, intestino delgado, colon, colorrecto, canal anal, hígado, vesícula biliar, conductos biliares extrahepáticos, ampolla de Vater, páncreas exocrino, pulmón, mesotelioma pleural, hueso, sarcoma de tejido blando, carcinoma y melanoma maligno de la piel, mama, vulva, vagina, cuello uterino, cuerpo uterino, ovario, trompa de Falopio, tumores trofoblásticos gestacionales, pene, próstata, testículos, riñón, pelvis renal, uréter, vejiga urinaria, uretra, carcinoma de párpado, carcinoma de la conjuntiva, melanoma maligno de

la conjuntiva, melanoma maligno de la úvea, retinoblastoma, carcinoma de la glándula lacrimal, sarcoma de la órbita, cerebro, médula espinal, sistema vascular, hemangiosarcoma y sarcoma de Kaposi.

5 Según una realización específicamente preferida, cualquiera de los péptidos definidos por la invención, o cualquier combinación de conjugados y composición de los mismos, puede usarse para tales procedimientos.

Debe observarse que los péptidos derivados del "dominio de antagonistas" (tales como p12A y p12B) también pueden usarse mediante el procedimiento de la invención.

10 Más específicamente, el procedimiento de la invención puede usar un péptido, que puede seleccionarse del grupo que consiste en p17A (como se indica por SEC ID N.º: 9), p27A (como se indica por SEC ID N.º: 12), p17B (como se indica por SEC ID N.º: 14), p27B (como se indica por SEC ID N.º: 15), p17C (como se indica por SEC ID N.º: 16), p27C (como se indica por SEC ID N.º: 17), p17D (como se indica por SEC ID N.º: 57), p27D (como se indica por SEC ID N.º: 58) y cualquier combinación, y composición de los mismos.

15 En otra realización más, la invención se refiere al uso de un péptido de la invención para la preparación de una composición para su uso en el tratamiento de trastornos inmunitarios relacionados con un desequilibrio en la respuesta de Th1-Th2 en un sujeto en necesidad del mismo, en el que dicho trastorno inmunitario es uno cualquiera de una enfermedad autoinmunitaria, trastorno proliferativo maligno o no maligno, patología de rechazo del injerto, y un trastorno inducido por una exotoxina pirógena o por una mezcla de al menos dos exotoxinas pirógenas seleccionadas de choque tóxico e incapacidad o para su uso en un procedimiento de prevención de muerte inducida por una exotoxina pirógena o por una mezcla de al menos dos exotoxinas pirógenas.

20 En el caso de polvos estériles para la preparación de las disoluciones inyectables estériles, el procedimiento preferido de preparación son técnicas de secado al vacío y liofilización que dan un polvo del principio activo más cualquier componente deseado adicional de una disolución previamente esterilizada por filtración de los mismos.

25 Las composiciones farmacéuticas de la invención generalmente comprenden un agente de tamponamiento, un agente que ajusta la osmolaridad de los mismos, y opcionalmente, uno o más vehículos, excipientes y/o aditivos farmacéuticamente aceptables como se conocen en la técnica. También pueden incorporarse principios activos suplementarios en las composiciones. El vehículo puede ser disolvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido, y similares), mezclas adecuadas de los mismos, y aceites vegetales. La fluidez apropiada puede mantenerse, por ejemplo, por el uso de un recubrimiento, tal como lecitina, por el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de la dispersión y por el uso de tensioactivos.

30 Como se usa en el presente documento "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye todos y cada uno de disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos y similares. El uso de tales medios y agentes para sustancias activas farmacéuticas es bien conocido en la técnica. Excepto que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con el principio activo, se contempla su uso en la composición terapéutica.

35 La preparación de composiciones farmacéuticas es bien conocida en la técnica y se ha descrito en muchos artículos y libros de texto, véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, Gennaro A. R, ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, 1990, y especialmente las pág. 1521-1712 en él. p17D (como se indica por SEC ID N.º: 57), p27D (como se indica por SEC ID N.º: 58) y cualquier combinación de los mismos.

40 La interacción de la molécula de clase II del MHC y TCR por un superantígeno es insuficiente para la inducción de citocinas Th1 que median en choque tóxico letal. Los estudios de afinidad de SPR mostraron que, en términos absolutos, la interacción de superantígenos con tanto MHC II como TOR es muy débil [Seth (1994) arriba; Redpath (1999) arriba]. Por el contrario, la afinidad de SEB por CD28 es mucho mayor, dando esta interacción una función esencial en la formación de una sinapsis inmunológica estable. Interaccionando los tres ligandos simultáneamente, el superantígeno puede proporcionar una señal de activación a la célula Th1. Peptidomiméticos que interfieren con la unión de superantígeno a CD28 alterarán la formación de sinapsis, previniendo la inducción de una respuesta de Th1 (Figura 7J). Los hallazgos de la presente invención explican por qué los peptidomiméticos cortos del dominio antagonista son potentes antagonistas de superantígenos mientras que el mimético de los sitios de unión de TOR y/o MHC II en SEB dejaron de inhibir la respuesta de Th1 [Arad (2000) arriba].

45 CD28 existe como un homodímero sobre la superficie celular, pero no requiere la dimerización de CD28 y de CTLA4 para la unión de B7, ni es suficiente para provocar la señalización por antígenos convencionales [Linsley, P.S. y col., J. Biol. Chem. 270(25):15417-24 (1995)]. Se cree que solo una molécula de B7-2 interacciona con el dímero CD28 [Collins (2002) arriba]. SEB indujo un cambio transitorio en la presentación de la superficie celular de CD28, haciéndolo accesible a un mAb específico α CD28 para un borde de la interfase del dímero de CD28 predicha (Figuras 3A, 6A y 6B). El hallazgo de que α CD28 solo pueden provocar una respuesta de Th1 (Figuras 3B, 3C y 6B) soporta la existencia de un equilibrio entre estados de accesibilidad de CD28 que puede desplazarse por SEB (Figura 3A). Los inventores han mostrado que SEB interacciona con CD28 en ambos bordes de la interfase del

dímero. Cuando interacciona con un monómero de CD28, el superantígeno puede desplazar el otro monómero, que ahora se vuelve accesible a α CD28.

5 Durante su evolución convergente, las toxinas de superantígeno de *S. aureus* y *S. pyogenes* adquirieron estructuras diseñadas para reconocer los receptores del sistema inmunitario humano críticos para su función, entre ellos moléculas de TCR y de clase II del MHC. Incluso, superantígenos individuales presentan amplia diversidad en la forma en la que interaccionan con estos dos ligandos [Sundberg (2002a) arriba; Sundberg (2002b) arriba]. Por el contrario, la unión de un superantígeno al tercer receptor, CD28, no es solo con mayor afinidad, pero implica una estructura conservada en ambas moléculas, haciendo las TSST-1 tan sensibles como SEB a miméticos del dominio antagonista [Arad (2000) arriba] y de la interfase del dímero en CD28 (Figuras 6G y 6H).

10 CD28 tiene una única función como transductor de señales tempranas para inmunidad innata. Mientras que CD28 se expresa constitutivamente y es esencial para una respuesta de Th1 inmediata, ICOS se induce después en dependencia de CD28 y promueve principalmente una respuesta de Th2. La inducción tardía de CTLA4, también dependiente de CD28, actúa cortando estas respuestas más tempranas [revisado por Rudd y Schneider (2003) arriba]. Sin quedar ligado a teoría alguna, los inventores suponen que debido a que SEB tiene el potencial de unirse no solo a CD28, sino también a ICOS y CTLA44, puede usar los últimos ligando para modular la respuesta de Th1 inducida por CD28.

15 El coligando de CD28 B7-2 se expresa constitutivamente y se indujo rápidamente durante la respuesta inmunitaria innata [revisado por Sharpe y Freeman (2002) arriba]. La acción de SEB fue totalmente dependiente de B7-2 (Figuras 2A y 2B). sB7-2 se unió directamente a SEB en el análisis cinético de SPR, con una afinidad que se parece a la de sCD28 pero con menor avidéz (Figura 4). La interacción simultánea de B7-2 y CD28 por el superantígeno puede estabilizar la unión de B7-2 a CD28 y así desencadenar la amplia coestimulación. Los resultados de la presente invención conducen al novedoso concepto de que involucrando directamente CD28 y B7-2, además de la molécula de clase II de MHC y TOR, el superantígeno recluta cuatro ligandos en un modo no convencional, dos de la célula presentadora de antígeno y dos del linfocito T, para crear una sinapsis inusualmente estable que conduce a una respuesta de Th1 excesiva.

20 La señalización mediante TCR se amplifica por CD28 en un modo dependiente de B7-2 [véase Acuto y Michel (2003) arriba]. La inducción de IL2 y la expresión génica de IFN- γ por α CD3 conjuntamente con sB7-2 o con α CD28, que involucran a TCR y CD28 para imitar la formación de sinapsis inmunológicas, se bloqueó por el peptidomimético de superantígenos p12B (Figuras 3C y 3F). Aparentemente, tal señalización se produce principalmente mediante el sitio de unión del superantígeno en CD28, haciéndolo sensible a p12B. Por tanto, este sitio en CD28, la interfase del dímero en vez del sitio de unión B7-2 (Fig. 6A) y DO28₆₀₋₆₅ descrito por Luhder y col. [Luhder (2003) arriba] es crítico para la señalización de TOR.

25 La inducción de genes de citocinas Th1 por SEB se atenuó gravemente por una inducción concomitante de las citocinas de Th2 IL4 e IL10 (Figura 1). A diferencia de la respuesta de Th1, sin embargo, la inducción de una respuesta de citocinas Th2 por superantígeno no requiere la señalización mediante CD28. \square CD28 o sB7-2 dejaron de inducir IL10 (Figuras 3D y 3G). En todos los casos en los que la respuesta de Th1 se bloqueó por ligandos solubles o por peptidomiméticos de superantígeno o de CD28, CTLA4 e ICOS, la respuesta de Th2, medida mediante IL10 o IL4, siguió sin disminuir. La inhibición de la respuesta de Th1 dependiente de CD28 por péptidos antagonistas de superantígeno deja así la respuesta de Th2 intacta, con la inducción concomitante de inmunidad protectora (Figura 1F; [Arad (2000) arriba]). El requisito selectivo para la señalización de CD28 en la expresión génica de citocinas Th1 convierte esta respuesta en más sensible a la regulación. Por el contrario, la activación de la respuesta de Th2 evita el requisito de CD28 y, por tanto, está menos rigurosamente controlada.

30 Según otra realización, la invención se refiere a la inhibición de la activación de una ruta coestimulante de linfocitos T por un agente patógeno. La referencia a agentes patógenos incluye un microorganismo procarionta, un microorganismo eucariota inferior, un organismo eucariota complejo, un virus, hongos, priones, parásito, levadura y venenos.

35 Un microorganismo procarionta incluye bacterias tales como bacterias Gram positivas, Gram negativas y Gram variables y bacterias intracelulares. Ejemplos de bacterias contempladas en el presente documento incluyen las especies de los géneros *Treponema sp.*, *Borrelia sp.*, *Neisseria sp.*, *Legionella sp.*, *Bordetella sp.*, *Escherichia sp.*, *Salmonella sp.*, *Shigella sp.*, *Klebsiella sp.*, *Yersinia sp.*, *Vibrio sp.*, *Hemophilus sp.*, *Rickettsia sp.*, *Chlamydia sp.*, *Mycoplasma sp.*, *Staphylococcus sp.*, *Streptococcus sp.*, *Bacillus sp.*, *Clostridium sp.*, *Corynebacterium sp.*, *Propionibacterium sp.*, *Mycobacterium sp.*, *Ureaplasma sp.* y *Listeria sp.*

40 Especies particularmente preferidas incluyen *Treponema pallidum*, *Borrelia burgdorferi*, *Neisseria gonorrhoea*, *Neisseria meningitidis*, *Legionella pneumophila*, *Bordetella pertussis*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella dysenteriae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Yersinia pestis*, *Vibrio cholera*, *Hemophilus influenzae*, *Rickettsia rickettsii*, *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Bacillus anthracis*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium tetani*, *Clostridium*

perfringens, *Corynebacterium diphtheriae*, *Propionibacterium acnes*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium leprae* y *Listeria monocytogenes*.

5 Un organismo eucariota inferior incluye una levadura u hongo tal como, pero no se limita a, *Pneumocystis carinii*, *Candida albicans*, *Aspergillus*, *Histoplasma capsulatum*, *Blastomyces dermatitidis*, *Cryptococcus neoformans*, *Trichophyton* y *Microsporium*.

10 Un organismo eucariota complejo incluye gusanos, insectos, arácnidos, nematodos, amebas, *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia*, *Trichomonas vaginalis*, *Trypanosoma brucei gambiense*, *Trypanosoma cruzi*, *Balantidium coli*, *Toxoplasma gondii*, *Cryptosporidium* o *Leishmania*.

15 El término "virus" se usa en su sentido más amplio para incluir virus de las familias adenovirus, papovavirus, virus del herpes: simple, varicela-zóster, Epstein-Barr, CMV, virus de la viruela: viruela, variolovacuna, hepatitis B, rinovirus, hepatitis A, virus de la poliomielitis, virus de la rubeola, hepatitis C, arbovirus, virus de la rabia, virus de la gripe A y B, virus del sarampión, virus de las paperas, VIH, HTLV I y II.

El término "hongos" incluye, por ejemplo, hongos que producen enfermedades tales como tiña, histoplasmosis, blastomicosis, aspergilosis, criptococosis, esporotricosis, coccidioidomicosis, paracoccidio-idoicosis y candidiasis.

20 El término parásito incluye, pero no se limita a, infecciones producidas por tenias somáticas, trematodos de la sangre, ascárides de tejido, ameba y especies de *Plasmodium*, *Trypanosoma*, *Leishmania* y *Toxoplasma*.

25 Según una realización preferida, los péptidos y composiciones de la invención son particularmente útiles para inhibir la activación de una ruta coestimulante de linfocitos T por una bacteria patógena seleccionada del grupo que consiste en *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pyogenes*.

30 En todavía otra realización preferida, un componente de dicha bacteria es un superantígeno que es una exotoxina pirógena. Preferentemente, la exotoxina pirógena puede ser una exotoxina bacteriana y, lo más preferentemente, esta exotoxina puede producirse por una cualquiera de *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pyogenes*. El trastorno relacionado con superantígeno tratado puede ser según una realización específica uno cualquiera de choque tóxico, incapacitación y muerte, inducido por una exotoxina pirógena o por una mezcla de al menos dos exotoxinas pirógenas.

35 Por consiguiente, un componente preferido de tal agente patógeno puede ser un superantígeno, preferentemente una exotoxina pirógena.

40 Según otra realización preferida, la invención se basa en el uso de una sustancia que inhibe la unión de tal superantígeno a un sitio específico dentro de una molécula que pertenece a la ruta de CD28/B7 que es CD28, CTLA-4, ICOS o PD-1.

45 Según una realización específica, el sitio de unión del superantígeno puede estar dentro de la interfase del dímero de CD28 que comprende los residuos de aminoácidos 10-15 o 116-121 de la secuencia de aminoácidos de CD28 humano como se indica por SEC ID N.º: 19, en el que el péptido de la invención consiste en:

(a) un péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos que está seleccionada de la secuencia de aminoácidos HVK GKHLCP como se indica por SEC ID N.º: 9 y la secuencia de aminoácidos SPMLVAYD como se indica por SEC ID N.º: 12;

50 (b) un péptido que es al menos el 80 % homólogo al péptido de (a), en el que el péptido resultante de (b) mantiene la capacidad de inhibir la interacción entre un miembro de la ruta coestimulante de linfocitos T y un superantígeno;

(c) un péptido de (a) que tiene una inserción de un residuo de aminoácido, en el que el péptido resultante de (c) mantiene la capacidad de inhibir la interacción entre un miembro de la ruta coestimulante de linfocitos T y un superantígeno;

55 (d) un péptido de (a), (b) o (c) que está prolongado en el extremo N y/o el extremo C:

(v) por una lauril-cisteína en el extremo N y una cisteína en el extremo C; o

(vi) por un resto orgánico que no es un residuo de aminoácido que se produce naturalmente o sintético; o

60 (vii) por residuo(s) de aminoácido(s) hidrófobo(s) idéntico(s) que puede(n) ser residuo(s) de aminoácidos que se producen naturalmente o sintéticos; o

(viii) por una cola de lisil-palmitoilo, en el que dicha cola está en el extremo N, en el que el péptido resultante de (c) mantiene la capacidad de inhibir la interacción entre un miembro de la ruta coestimulante de linfocitos T y un superantígeno; o

65 (e) un dímero o multímero de (a), (b), (c) o (d), en el que el péptido resultante de (e) mantiene la capacidad de inhibir la interacción entre un miembro de la ruta coestimulante de linfocitos T y un superantígeno.

Según otra realización, el sitio de unión del superantígeno puede estar dentro de la interfase del dímero de la molécula de CTLA-4 que comprende los residuos de aminoácidos 10-15 o 115-120 de la secuencia de aminoácidos de CTLA-4 humana como se indica por SEC ID N.º: 20, en el que el péptido de la invención consiste en:

- 5 (a) un péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos que está seleccionada de una de la secuencia de aminoácidos YVIDPEPCP como se indica por SEC ID N.º: 14 y la secuencia de aminoácidos PAVVLASS como se indica por SEC ID N.º: 15;
 (b) un péptido de (a) que está prolongado en el extremo N y/o el extremo C:

- 10 (i) por lauril-cisteína en el extremo N y una cisteína en el extremo C; o
 (ii) por un resto orgánico que no es un residuo de aminoácido que se produce naturalmente o sintético;
 o
 (iii) por residuo(s) de aminoácido(s) hidrófobo(s) idéntico(s) que puede(n) ser residuos de aminoácidos que se producen naturalmente o sintéticos; o
 15 (iv) por una cola de lisil-palmitoílo, en el que dicha cola está en el extremo N, en el que el péptido resultante de (b) mantiene la capacidad de inhibir la interacción entre un miembro de la ruta coestimulante de linfocitos T y un superantígeno;

- 20 (c) un péptido de (a) que tiene una inserción de un residuo de aminoácido, en el que el péptido resultante de (c) mantiene la capacidad de inhibir la interacción entre un miembro de la ruta coestimulante de linfocitos T y un superantígeno;
 (d) un dímero o multímero de (a), (b) o (c), en el que el péptido resultante de (e) mantiene la capacidad de inhibir la interacción entre un miembro de la ruta coestimulante de linfocitos T y un superantígeno.

25 Alternativamente, el sitio de unión del superantígeno puede estar dentro de la interfase del dímero de la molécula de ICOS, que comprende parte o todos de los residuos de aminoácidos 10-15 o 119-124 de la secuencia de aminoácidos de ICOS humano como se indica por SEC ID N.º: 21, en el que el péptido de la invención consiste en:

- 30 (a) péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos que está seleccionada de la secuencia de aminoácidos YESQLCCQL como se indica por SEC ID N.º: 16 y la secuencia de aminoácidos GEINGSAN como se indica por SEC ID N.º: 17;
 (b) un péptido de (a) o (b) que está prolongado en el extremo N y/o el extremo C:

- 35 (i) por lauril-cisteína en el extremo N y una cisteína en el extremo C; o
 (ii) por un resto orgánico que no es un residuo de aminoácido que se produce naturalmente o sintético;
 o
 (iii) por residuo(s) de aminoácido(s) hidrófobo(s) idéntico(s) que puede(n) ser residuos de aminoácidos que se producen naturalmente o sintéticos; o
 40 (iv) por una cola de lisil-palmitoílo, en el que dicha cola está en el extremo N, en el que el péptido resultante de (b) mantiene la capacidad de inhibir la interacción entre un miembro de la ruta coestimulante de linfocitos T y un superantígeno;

- 45 (c) un péptido de (a) que tiene una inserción de un residuo de aminoácido, en el que el péptido resultante de (c) mantiene la capacidad de inhibir la interacción entre un miembro de la ruta coestimulante de linfocitos T y un superantígeno;
 (d) un dímero o multímero de (a), (b) o (c), en el que el péptido resultante de (d) mantiene la capacidad de inhibir la interacción entre un miembro de la ruta coestimulante de linfocitos T y un superantígeno.

50 Alternativamente, el sitio de unión del superantígeno puede estar dentro de los dominios en la molécula de PD-1 que se corresponden con la interfase del dímero en CTLA4, que comprende los residuos de aminoácidos 8-13 y 110-116 de la secuencia de PD-1 humano como se indica por SEC ID N.º: 59, en el que el péptido de la invención consiste en:

- 55 (a) un péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos que está seleccionada de la secuencia de aminoácidos RVTERRAEV como se indica por SEC ID N.º: 57 y la secuencia de aminoácidos PALLVVTE como se indica por SEC ID N.º: 58;
 (b) un péptido de (a) que está prolongado en el extremo N y/o el extremo C:

- 60 (i) por lauril-cisteína en el extremo N y una cisteína en el extremo C; o
 (ii) por un resto orgánico que no es un residuo de aminoácido que se produce naturalmente o sintético;
 o
 (iii) por residuo(s) de aminoácido(s) hidrófobo(s) idéntico(s) que puede(n) ser residuos de aminoácidos que se producen naturalmente o sintéticos; o
 65 (iv) por una cola de lisil-palmitoílo, en el que dicha cola está en el extremo N, en el que el péptido resultante de (b) mantiene la capacidad de inhibir la interacción entre un miembro de la ruta coestimulante de linfocitos T y un superantígeno;

(c) un péptido de (a) que tiene una inserción de un residuo de aminoácido, en el que el péptido resultante de (c) mantiene la capacidad de inhibir la interacción entre un miembro de la ruta coestimulante de linfocitos T y un superantígeno;

5 (d) un dímero o multímero de (a), (b) o (c), en el que el péptido resultante de (c) mantiene la capacidad de inhibir la interacción entre un miembro de la ruta coestimulante de linfocitos T y un superantígeno.

10 Como se muestra por los ejemplos, el superantígeno se une específicamente a su sitio de unión dentro de la interfase del dímero de CD28, CTLA4 e ICOS. La Figura 4 indica adicionalmente que el superantígeno se une a un sitio todavía no definido dentro de la molécula de B7-2.

15 Como se muestra por los inventores, la interfase del dímero de los miembros de la familia de CD28 se une específicamente y directamente a un dominio espacialmente conservado de una exotoxina pirógena. Preferentemente, este dominio espacialmente conservado no participa en la unión de una cualquiera de las moléculas de la clase II del MHC y TCR. Lo más preferentemente, dicho dominio espacialmente conservado de la exotoxina pirógena forma en ella un giro central que empieza dentro de una hebra β 7 y que conecta la hebra β 7, mediante la hebra β corta 8, con una hélice α 4, y que termina dentro de una hélice α 4, basándose en la numeración de dominios de SEB [Arad y col., (2000), (2001) arriba].

20 En una realización preferida, la sustancia se usó para inhibir la interacción directa entre un componente derivado de dicho agente patógeno, que es un superantígeno, y un sitio de unión dentro de una molécula miembro de la ruta coestimulante de linfocitos T, que es un péptido derivado de la interfase del dímero de un miembro de la ruta coestimulante de linfocitos T.

25 Según una realización específica, puede proporcionarse un péptido de la invención de la interfase del dímero de un miembro de la ruta coestimulante de linfocitos T para su uso en inhibir la interacción específica entre el superantígeno y el miembro de la familia de CD28.

30 Según una realización preferida, el péptido usado por la invención inhibe la interacción directa entre las moléculas de la familia de CD28B7 y dicha exotoxina pirógena. Según una realización preferida de este aspecto de la invención, la inhibición de la unión de dicho componente de un agente patógeno. El componente es una exotoxina pirógena para dicho miembro de la ruta coestimulante de linfocitos T, de la familia de CD28B7, por la sustancia de la invención, que conduce a antagonizar la activación de linfocitos Th1 mediada por toxina y puede también conducir a la provocación indirecta de inmunidad protectora contra choque tóxico inducido por dicha exotoxina pirógena o por una mezcla de al menos dos exotoxinas pirógenas. Más particularmente, esta unión está mediada por el sitio de unión del superantígeno en CD28 como se define por la invención.

35 Por tanto, un antagonista de una activación de linfocitos T mediada por toxina protege contra choque tóxico inducido por una exotoxina pirógena o por una mezcla de exotoxinas pirógenas y puede también provocar indirectamente inmunidad protectora contra choque tóxico inducido por una exotoxina pirógena o por una mezcla de exotoxinas pirógenas. Bloqueando la capacidad de la toxina para inducir una respuesta inmunitaria celular que conduce a choque tóxico, los péptidos antagonistas de la invención pueden permitir que el superantígeno induzca una respuesta inmunitaria humoral vigorosa dirigida contra sí mismo. Por tanto, el sujeto tratado puede adquirir inmunidad protectora contra exposiciones a toxina adicionales, y desarrollar anticuerpos anti-toxina protectores. Así, el péptido antagonista de la invención puede usarse para el tratamiento inmediato de choque tóxico agudo y de los efectos perjudiciales que pueden ser debidos a, por ejemplo, intoxicación alimentaria accidental, inducidos por exotoxinas pirógenas. Además, puede conferir indirectamente inmunidad a largo plazo contra tal choque tóxico, como se ha descrito anteriormente.

40 Si el péptido que inhibe la interacción directa entre un miembro de la ruta coestimulante de linfocitos T, por ejemplo, CD28 y un componente de un agente patógeno, preferentemente un superantígeno, es, por ejemplo, un péptido que tiene baja inmunogenicidad y eliminación rápida relativa, pueden no detectarse los anticuerpos contra tal péptido antagonista. Sin embargo, bloqueando la capacidad de la toxina para inducir una respuesta inmunitaria celular que conduce a choque tóxico, el péptido antagonista permite que el superantígeno induzca una respuesta inmunitaria humoral vigorosa dirigida contra él mismo. Bajo estas condiciones, el superantígeno actúa de su propio adyuvante. Así, cuando se previene el choque tóxico letal por péptido antagonista durante la exposición a un superantígeno (que inhibe la interacción del superantígeno de CD28), el sujeto tratado puede adquirir inmunidad protectora contra exposiciones a toxina adicionales, incluso con diferentes toxinas, y desarrollar anticuerpos anti-toxina protectores. Por tanto, el uso del péptido de la invención que inhibe la interacción directa entre la molécula de CD28 y una toxina de superantígeno puede provocar indirectamente inmunidad protectora contra choque tóxico inducido por dicha exotoxina pirógena.

45 En otro aspecto, la invención se refiere al tratamiento de trastornos patológicos relacionados con un desequilibrio en la respuesta de Th1-Th2 producida por un agente patógeno en un sujeto en necesidad del mismo. Se administra una cantidad eficaz inhibidora de péptido de la invención. Según una realización, la invención está prevista para el

tratamiento de patologías tales como trastorno proliferativo maligno o no maligno, y un trastorno inmunorrelacionado, por ejemplo, inflamación, enfermedad autoinmunitaria, y también trastornos relacionados con exotoxinas.

La inflamación incluye cualquier afección inflamatoria en la que dichas afecciones inflamatorias pueden ser una cualquiera de artritis reumatoide, síndrome de dificultad respiratoria aguda (SDRA), asma, rinitis, fibrosis pulmonar idiopática, peritonitis, inflamación cardiovascular, isquemia miocárdica, lesión por reperfusión, aterosclerosis, septicemia, traumatismo, diabetes tipo II, retinopatía, psoriasis, inflamación gastrointestinal, cirrosis y enfermedad inflamatoria del intestino.

La ruta coestimulante de linfocitos T es la de ruta coestimulante de linfocitos T de CD28/B7.

Más específicamente, el miembro de la ruta de CD28/B7 puede ser uno cualquiera de CD28, CTLA-4, ICOS y PD-1.

En una realización, el miembro de la ruta puede ser la molécula de CD28 y la interfase del dímero dentro de CD28 comprende los residuos de aminoácidos 10-15 o 116-121 de la secuencia de aminoácidos de CD28 humano como se indica por SEC ID N.º: 19, en el que el péptido de la invención consiste en:

(a) un péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos que está seleccionada de la secuencia de aminoácidos HVKGGKHLCP como se indica por SEC ID N.º: 9 y la secuencia de aminoácidos SPMLVAYD como se indica por SEC ID N.º: 12;

(b) un péptido que es al menos el 80 % homólogo al péptido de (a), en el que el péptido resultante de (b) mantiene la capacidad de inhibir la interacción entre un miembro de la ruta coestimulante de linfocitos T y un superantígeno;

(c) un péptido de (a) que tiene una inserción de un residuo de aminoácido, en el que el péptido resultante de (c) mantiene la capacidad de inhibir la interacción entre un miembro de la ruta coestimulante de linfocitos T y un superantígeno;

(d) un péptido de (a), (b) o (c) que está prolongado en el extremo N y/o el extremo C:

(v) por una lauril-cisteína en el extremo N y una cisteína en el extremo C; o

(vi) por un resto orgánico que no es un residuo de aminoácido que se produce naturalmente o sintético; o

(vii) por residuo(s) de aminoácido(s) hidrófobo(s) idéntico(s) que puede(n) ser residuos de aminoácidos que se producen naturalmente o sintéticos; o

(viii) por una cola de lisil-palmitoilo, en el que dicha cola está en el extremo N, en el que el péptido resultante de (c) mantiene la capacidad de inhibir la interacción entre un miembro de la ruta coestimulante de linfocitos T y un superantígeno; o

(e) un dímero o multímero de (a), (b), (c) o (d), en el que el péptido resultante de (e) mantiene la capacidad de inhibir la interacción entre un miembro de la ruta coestimulante de linfocitos T y un superantígeno.

En otra realización, el miembro de la ruta puede ser la molécula de CTLA-4 y la interfase del dímero dentro de CTLA-4 comprende los residuos de aminoácidos 10-15 o 115-120 de la secuencia de aminoácidos de CTLA-4 humana como se indica por SEC ID N.º: 20, en el que el péptido de la invención consiste en:

(a) un péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos que está seleccionada de una de la secuencia de aminoácidos YVIDPEPCP como se indica por SEC ID N.º: 14 y la secuencia de aminoácidos PAVVLASS como se indica por SEC ID N.º: 15;

(b) un péptido de (a) que está prolongado en el extremo N y/o el extremo C:

(i) por lauril-cisteína en el extremo N y una cisteína en el extremo C; o

(ii) por un resto orgánico que no es un residuo de aminoácido que se produce naturalmente o sintético; o

(iii) por residuo(s) de aminoácido(s) hidrófobo(s) idéntico(s) que puede(n) ser residuos de aminoácidos que se producen naturalmente o sintéticos; o

(iv) por una cola de lisil-palmitoilo, en el que dicha cola está en el extremo N, en el que el péptido resultante de (b) mantiene la capacidad de inhibir la interacción entre un miembro de la ruta coestimulante de linfocitos T y un superantígeno;

(c) un péptido de (a) que tiene una inserción de un residuo de aminoácido, en el que el péptido resultante de (c) mantiene la capacidad de inhibir la interacción entre un miembro de la ruta coestimulante de linfocitos T y un superantígeno;

(d) un dímero o multímero de (a), (b) o (c), en el que el péptido resultante de (e) mantiene la capacidad de inhibir la interacción entre un miembro de la ruta coestimulante de linfocitos T y un superantígeno.

Alternativamente, el miembro de la ruta puede ser la molécula de ICOS, y la interfase del dímero dentro de ICOS comprende los residuos de aminoácidos 10-15 o 119-124 de secuencia de aminoácidos de ICOS humano como se indica por SEC ID N.º: 21, en el que el péptido de la invención consiste en:

(a) péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos que está seleccionada de la secuencia de aminoácidos YESQLCCQL como se indica por SEC ID N.º: 16 y la secuencia de aminoácidos GEINGSAN como se indica por SEC ID N.º: 17;

5 (b) un péptido de (a) o (b) que está prolongado en el extremo N y/o el extremo C:

(i) por lauril-cisteína en el extremo N y una cisteína en el extremo C; o

(ii) por un resto orgánico que no es un residuo de aminoácido que se produce naturalmente o sintético;

o

10 (iii) por residuo(s) de aminoácido(s) hidrófobo(s) idéntico(s) que puede(n) ser residuos de aminoácidos que se producen naturalmente o sintéticos; o

(iv) por una cola de lisil-palmitoílo, en el que dicha cola está en el extremo N, en el que el péptido resultante de (b) mantiene la capacidad de inhibir la interacción entre un miembro de la ruta coestimulante de linfocitos T y un superantígeno;

15 (c) un péptido de (a) que tiene una inserción de un residuo de aminoácido, en el que el péptido resultante de (c) mantiene la capacidad de inhibir la interacción entre un miembro de la ruta coestimulante de linfocitos T y un superantígeno;

20 (d) un dímero o multímero de (a), (b) o (c), en el que el péptido resultante de (d) mantiene la capacidad de inhibir la interacción entre un miembro de la ruta coestimulante de linfocitos T y un superantígeno.

Alternativamente, el miembro de la ruta puede ser la molécula de PD-1 y los dominios dentro de la molécula de PD-1 que se corresponden con la interfase del dímero en CTLA4 comprenden los residuos de aminoácidos 8-13 o 110-116 de la secuencia de PD-1 humano como se indica por SEC ID N.º: 59, en el que el péptido de la invención consiste en:

25 (a) un péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos que está seleccionada de la secuencia de aminoácidos RVTERRAEV como se indica por SEC ID N.º: 57 y la secuencia de aminoácidos PALLVVTE como se indica por SEC ID N.º: 58;

30 (b) un péptido de (a) que está prolongado en el extremo N y/o el extremo C:

(i) por lauril-cisteína en el extremo N y una cisteína en el extremo C; o

(ii) por un resto orgánico que no es un residuo de aminoácido que se produce naturalmente o sintético;

o

35 (iii) por residuo(s) de aminoácido(s) hidrófobo(s) idéntico(s) que puede(n) ser residuos de aminoácidos que se producen naturalmente o sintéticos; o

(iv) por una cola de lisil-palmitoílo, en el que dicha cola está en el extremo N, en el que el péptido resultante de (b) mantiene la capacidad de inhibir la interacción entre un miembro de la ruta coestimulante de linfocitos T y un superantígeno;

40 (c) un péptido de (a) que tiene una inserción de un residuo de aminoácido, en el que el péptido resultante de (c) mantiene la capacidad de inhibir la interacción entre un miembro de la ruta coestimulante de linfocitos T y un superantígeno;

45 (d) un dímero o multímero de (a), (b) o (c), en el que el péptido resultante de (c) mantiene la capacidad de inhibir la interacción entre un miembro de la ruta coestimulante de linfocitos T y un superantígeno.

En otra realización más, el procedimiento de la invención está previsto para su uso en el tratamiento de patologías producidas por un agente patógeno tal como patógenos bacterianos, virus, hongos, priones, parásitos, levadura y venenos.

50 En una realización específicamente preferida, tal agente patógeno puede ser una bacteria patógena seleccionada del grupo que consiste en *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pyogenes*. Por consiguiente, un componente de dicha bacteria que se une específicamente a un sitio de unión específico dentro de un miembro de la ruta coestimulante de linfocitos T puede ser un superantígeno, preferentemente una exotoxina pirógena.

55 Más particularmente, la inhibición de la interacción directa entre el miembro de la ruta coestimulante de linfocitos T, preferentemente la molécula de CD28 y la exotoxina pirógena, conduce a la inhibición de la activación mediada por exotoxina de linfocitos Th1, protección contra choque tóxico y también puede conducir a la provocación indirecta de inmunidad protectora contra choque tóxico inducido por una exotoxina pirógena o por una mezcla de al menos dos exotoxinas pirógenas.

60 Según una realización preferida, los péptidos y composiciones de la invención son particularmente útiles para su uso en procedimientos de tratamiento de choque tóxico, incapacitación y muerte, inducidos por una exotoxina pirógena o por una mezcla de al menos dos exotoxinas pirógenas.

65

Por el término 'cantidad inmunológicamente eficaz' se quiere decir cualquier cantidad suficiente para potenciar la producción de anticuerpos que bloquean la activación de linfocitos T, preferentemente, la respuesta de Th1 inducida por exotoxinas pirógenas, y confieren inmunidad contra choque tóxico inducido por una exotoxina pirógena o por una mezcla de exotoxinas pirógenas.

5 El término activación mediada por toxina como se usa durante toda esta solicitud puede significar la activación de linfocitos T mediada por una única exotoxina pirógena o una mezcla de tales toxinas.

10 El péptido antagonista de la invención puede usarse para el tratamiento inmediato de choque tóxico agudo y de los efectos perjudiciales que pueden ser debidos a, por ejemplo, intoxicación alimentaria accidental, inducidos por exotoxinas pirógenas. Además, bloqueando la capacidad de la toxina para inducir una respuesta inmunitaria celular que conduce a choque tóxico, el péptido antagonista también puede permitir que el superantígeno induzca una respuesta inmunitaria humoral vigorosa dirigida contra él mismo y, por tanto, estos péptidos pueden conferir indirectamente inmunidad a largo plazo contra tal choque tóxico.

15 En seres humanos, por ejemplo, el choque tóxico resultante de la exposición a exotoxinas pirógenas tiene dos componentes distintos: (1) incapacitación y (2) muerte. Incluso en concentraciones de varios logaritmos por debajo de las letales, las exotoxinas pirógenas incapacitan gravemente, causando alta morbilidad [USAMRIID Manual, (1998) Eitzen, E. Pavlin, J. Cieslak, T. Christopher, G. Culpepper, R. eds. Medical Management of Biological Casualties Handbook. 3^a ed. Fort Detrick, Maryland: United States Army Medical Research Institute of Infectious Diseases, 1998]. La respuesta de incapacitación observada, por ejemplo, en intoxicaciones alimentarias que pueden ser intoxicaciones masivas, afecta a un gran número de personas. Además, la respuesta de incapacitación puede ser una amenaza militar y una amenaza de seguridad nacional.

25 Según una realización, la invención usa como sustancia que inhibe la interacción directa entre un componente derivado de dicho agente patógeno y un sitio de unión dentro de un miembro de la ruta coestimulante de linfocitos T molécula un péptido de la invención de la interfase del dímero de un miembro de la ruta coestimulante de linfocitos T.

30 Según una realización específicamente preferida, la inhibición de la interacción de un agente patógeno, tal como una exotoxina pirógena, y un miembro de la familia de CD28 puede realizarse por un péptido de la invención de la interfase del dímero de un miembro de la ruta coestimulante de linfocitos T.

35 Según una realización específicamente preferida, el péptido usado por la invención inhibe la interacción directa entre la molécula de CD28 y dicha exotoxina pirógena.

40 En otra realización preferida, el péptido usado por la invención es un antagonista de una activación mediada por toxina de linfocitos T y protege contra el choque tóxico inducido por una exotoxina pirógena o por una mezcla de exotoxinas pirógenas.

45 Pueden usarse diversos procedimientos de administración para administrar los péptidos o las composiciones de la invención a un sujeto en necesidad. Los péptidos pueden administrarse mediante inyecciones intravenosas (i.v.), intramusculares (i.m.) intraperitoneales (i.p.), por vía oral (en forma líquida o preparada como formas unitarias de dosificación como cápsulas, píldoras, pastillas para chupar, etc.). Con el fin de ser terapéuticamente eficaces, los péptidos deben prepararse de forma que permitan su estabilidad en el sistema tras la inyección, o incluso más preferentemente, tras la administración por vía oral. Alternativamente, los péptidos de la invención también pueden administrarse mediante administración transdérmica usando parches, pomada o crema.

50 Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden administrarse de varias formas que dependen de si se desea tratamiento local o sistémico y del área que va a tratarse. La administración puede ser tópica (incluyendo oftálmica y en mucosas que incluyen administración vaginal y rectal), pulmonar, por ejemplo, por inhalación o insuflación de polvos o aerosoles, que incluye por nebulizador; intratraqueal, intranasal, epidérmica y transdérmica), oral o parenteral. La administración parenteral incluye inyección o infusión intravenosa, intraarterial, subcutánea, intraperitoneal o intramuscular; o intracraneal, por ejemplo, administración intratecal o intraventricular.

55 Composiciones y formulaciones farmacéuticas para administración tópica pueden incluir parches transdérmicos, pomadas, lociones, cremas, geles, gotas, supositorios, sprays, líquidos y polvos. Pueden ser necesarios o deseables vehículos farmacéuticos convencionales, bases acuosas, en polvo o aceitosas, espesantes y similares. También pueden ser útiles preservativos recubiertos, guantes y similares.

60 Las composiciones y formulaciones para administración por vía oral incluyen polvos o gránulos, suspensiones o disoluciones en agua o medios no acuosos, cápsulas, sobres o comprimidos. Pueden ser deseables espesantes, aromatizantes, diluyentes, emulsionantes, adyuvantes de dispersión o aglutinantes.

65 Composiciones y formulaciones para la administración parenteral, intratecal o intraventricular pueden incluir disoluciones acuosas estériles que también pueden contener tampones, diluyentes y otros aditivos adecuados tales

como, pero no se limitan a, potenciadores de la penetración, compuestos de vehículo y otros vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables. Las composiciones farmacéuticas de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, disoluciones, emulsiones y formulaciones que contienen liposomas. Estas composiciones pueden generarse a partir de una variedad de componentes que incluyen, pero no se limitan a, líquidos preformados, sólidos auto-emulsionantes y semisólidos auto-emulsionantes.

Las formulaciones farmacéuticas de la presente invención, que pueden presentarse convenientemente en forma de dosificación unitaria, pueden prepararse según técnicas convencionales bien conocidas en la industria farmacéutica. Tales técnicas incluyen la etapa de poner en asociación los principios activos con el (los) vehículo(s) farmacéutico(s) o excipiente(s). En general, las formulaciones se preparan poniendo uniformemente e íntimamente en asociación los principios activos con vehículos líquidos o vehículos sólidos finamente divididos o ambos, y a continuación, si fuera necesario, moldear el producto.

Las composiciones de la presente invención pueden formularse en cualquiera de muchas formas de dosificación posibles tales como, pero no se limitan a, comprimidos, cápsulas, jarabes líquidos, geles suaves, supositorios y enemas. Las composiciones de la presente invención también pueden formularse como suspensiones en medios acuosos, no acuosos o mixtos. Las suspensiones acuosas pueden contener adicionalmente sustancias que aumentan la viscosidad de la suspensión que incluyen, por ejemplo, carboximetilcelulosa de sodio, sorbitol y/o dextrano. La suspensión también puede contener estabilizadores.

En una realización de la presente invención, las composiciones farmacéuticas pueden formularse y usarse como espumas. Espumas farmacéuticas incluyen formulaciones tales como, pero no se limitan a, emulsiones, microemulsiones, cremas, gelatinas y liposomas. Aunque básicamente similares en la naturaleza, estas formulaciones varían en los componentes y la consistencia del producto final. La preparación de tales composiciones y formulaciones es generalmente conocida para aquellos expertos en las técnicas farmacéuticas y de formulación y puede aplicarse a la formulación de las composiciones de la presente invención.

Como se describe por la presente invención y también se muestra recientemente por los inventores [documento WO 03/084995], la diana celular del superantígeno es CD28.

Como se muestra en la Figura 4, la presente invención demuestra adicionalmente que los tres miembros de la familia CD28 se unen al sAg. Este hallazgo proporciona dianas de fármaco celulares para el diseño de antagonistas que inhibirán el choque tóxico y otros resultados de la estimulación en exceso mediada por superantígeno de la respuesta inmunitaria celular (y en particular, la respuesta de Th1), tal como muerte e incapacitación tóxica (manifestada por náuseas, vómitos y diarrea). Y, lo que es más importante, la invención permite ahora el diseño de antagonistas novedosos de la interacción entre superantígenos y el receptor de CD28, tanto por péptidos antagonistas como se ilustran en el presente documento como por moléculas pequeñas o enzimas o proteínas. La invención proporciona una nueva estrategia para el descubrimiento de antagonistas de choque tóxico, mediante el uso de los péptidos de la invención que se derivan de la interfase del dímero dentro de moléculas de CD28, CTLA-4 y de ICOS como cebo para la unión de moléculas antagonistas. Lo último puede seleccionarse, por ejemplo, mediante expresión en fago de bibliotecas de péptidos aleatorias o dedicadas, barrido posicional de bibliotecas de péptidos, o de bibliotecas de peptidomiméticos cíclicos.

Así, en otro aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento de cribado para una sustancia de prueba que se une específicamente a un miembro de la ruta coestimulante de linfocitos T y así inhibe la activación de linfocitos T mediada por un agente patógeno, procedimiento de cribado que comprende las etapas de:

- (a) obtener sustancias antagonistas candidatas que se unen a un miembro de la ruta coestimulante de linfocitos T;
- (b) seleccionar de las sustancias obtenidas en la etapa (a) una sustancia que inhibe la interacción directa entre dicho miembro de la ruta coestimulante de linfocitos T y dicho agente patógeno o un componente derivado de dicho agente, preferentemente dicho componente es un superantígeno; y
- (c) determinar el efecto inhibitorio de la sustancia obtenida en la etapa (b) sobre la activación mediada por superantígenos de linfocitos T, preferentemente linfocitos Th1, en el que dicha sustancia antagonista candidata se obtiene por las etapas de: (i) proporcionar una mezcla que comprende un péptido aislado de la invención; (ii) poner en contacto dicha mezcla con dicha sustancia de prueba bajo condiciones adecuadas para dicha unión; y (iii) determinar el efecto de la sustancia de prueba basándose en una indicación del punto final, por lo que la modulación de dicho punto final es indicativa de la unión de dicha sustancia de prueba a dicho péptido.

Es clave para la aplicación de cribado de alto rendimiento para la unión de alta afinidad de péptidos antagonistas generados por barrido posicional y química de ciclación el desarrollo de un ensayo de cribado sensible y conveniente.

El desarrollo de un ensayo de cribado robusto para sustancias antagonistas mediante su afinidad por una cualquiera de la diana CD28, CTLA-4, ICOS y PD-1 en el dominio reconocido por superantígenos será la primera etapa en dicho procedimiento de cribado.

5 En una realización preferida, la sustancia antagonista candidata utilizada mediante el procedimiento de cribado de la invención puede obtenerse por las etapas de:

10 (a) proporcionar una mezcla que comprende cualquiera de las aisladas definidas por la invención; (b) poner en contacto la mezcla con una sustancia de prueba bajo condiciones adecuadas para la unión; y (c) determinar el efecto de la sustancia de prueba basándose en una indicación del punto final, por lo que la modulación de dicho punto final es indicativa de la unión de dicha sustancia de prueba a dicho péptido.

15 Según otra realización, la sustancia candidata cribada mediante el procedimiento de la invención puede seleccionarse del grupo que consiste en: sustancias basadas en proteínas, basadas en hidratos de carbono, basadas en lípidos, basadas en sustancias orgánicas naturales, basadas en sustancias orgánicas sintéticamente derivadas, basadas en sustancias inorgánicas y basadas en peptidomiméticos.

20 En otra realización, la sustancia puede ser un producto de uno cualquiera del barrido posicional de bibliotecas combinatorias de péptidos, bibliotecas de peptidomiméticos cíclicos y bibliotecas de expresión en fago aleatorias o dedicadas.

25 Según otra realización específicamente preferida, la sustancia antagonista candidata puede evaluarse mediante un procedimiento de determinación de la capacidad de dicha sustancia para antagonizar la activación mediada por toxina de linfocitos Th1 y opcionalmente su capacidad para provocar inmunidad protectora contra choque tóxico inducido por una exotoxina pirógena o por una mezcla de tales exotoxinas pirógenas.

30 Según una realización específica, la indicación de punto final puede ser la unión de un anticuerpo anti-péptido al péptido de la invención, que conduce a una señal visualmente detectable. La modulación de la unión del anticuerpo a dicho péptido, que conduce a inhibición o potenciamiento de tal señal, puede indicar que la sustancia de prueba se une al péptido de la invención.

35 Más particularmente, cada sustancia candidata, o preferentemente, péptido, puede colocarse en un pocillo y la unión directa de los péptidos de la invención se detecta preferentemente por un anticuerpo específico para dichos péptidos. Las condiciones para la unión eficaz de los péptidos de la invención a un péptido antagonista candidato sobre la placa pueden optimizarse, que implica estudio de pH, composición de sales y tampón y, proteínas transportadoras tales como BSA. Este cribado robusto da sustancias, preferentemente péptidos, que se unen al sitio de unión del superantígeno dentro de la interfase del dímero de una cualquiera de CTLA-4, ICOS, CD28 y PD-1. Las sustancias (particularmente péptidos) que se unen a los péptidos de la invención se reúnen y a continuación se ensayan como se describe más adelante.

40 Según una realización preferida, en la que el péptido usado mediante el procedimiento de cribado de la invención es un péptido designado p1TA, que tiene una secuencia de aminoácidos como se indica por SEC ID N.º: 9, el anticuerpo que debe usarse para la detección puede ser el anticuerpo monoclonal de ratón anti-CD28 designado MAB342, clon 37407.111 de R&D Systems, Inc., Mineápolis, Minesota, EE. UU.

45 Alternativamente, si el péptido usado para el procedimiento de cribado es p2TA, p1TB, p2TB, p1TC, p2TC, p1TD y p2TD que tiene una secuencia de aminoácidos como se indica por SEC ID N.º: 12, 14, 15, 16, 17, 57 y 58, un anticuerpo específico, preferentemente anticuerpo monoclonal, debe usarse para la detección.

50 El anticuerpo anti-péptidos usado para esta primera etapa del procedimiento de cribado de la invención puede ser uno cualquiera del anticuerpo policlinal y monoclonal. La generación de anticuerpos policlinales contra proteínas se describe en, por ejemplo, el Capítulo 2 de Current Protocols in Immunology, Wiley and Sons Inc.

55 Los anticuerpos monoclonales pueden prepararse a partir de linfocitos B tomados del bazo o ganglios linfáticos de animales inmunizados, en particular ratas o ratones, por fusión con linfocitos B inmortalizados en condiciones que favorecen el crecimiento de células híbridas. La técnica de generación de anticuerpos monoclonales se describe en muchos artículos y libros de texto, tales como el Capítulo 2 anteriormente indicado de Current Protocols in Immunology.

60 El término "anticuerpo" pretende incluir moléculas intactas, además de fragmentos de las mismas, tales como, por ejemplo, Fab y F(ab')₂, que son capaces de unirse al antígeno [Wahl, y col., J. Nucl. Med. 24:316-325 (1983)].

65 Se apreciará que Fab y F(ab')₂ y otros fragmentos de los anticuerpos útiles en la presente invención pueden usarse para la detección y cuantificación de las moléculas de CD28, CTLA-4, ICOS y PD-1 unidas, según los procedimientos desvelados en el presente documento para moléculas de anticuerpo intactas. Tales fragmentos

normalmente se producen por escisión proteolítica, usando enzimas tales como papaína (para producir fragmentos Fab) o pepsina (para producir fragmentos F(ab')₂).

Según una realización preferida, una sustancia adecuada candidata para cribar mediante el procedimiento de la invención puede seleccionarse del grupo que consiste en: sustancias basadas en proteínas, basadas en hidratos de carbono, basadas en lípidos, basadas en sustancias orgánicas naturales, basadas en sustancias orgánicas sintéticamente derivadas, basadas sustancias en inorgánicas y basadas en peptidomiméticos.

Preferentemente, tal sustancia puede ser un producto de uno cualquiera de barrido posicional de bibliotecas combinatorias de péptidos, bibliotecas de peptidomiméticos cíclicos y bibliotecas de expresión en fago aleatorias o dedicadas.

En una realización específicamente preferida, la sustancia antagonista candidata obtenida y seleccionada mediante el procedimiento de cribado de la invención puede ser un péptido. Por tanto, pueden usarse bibliotecas de fagos combinatorias para cribar péptidos antagonistas de superantígenos con afinidad nanomolar por uno cualquiera de los receptores de CD28, CTLA-4, ICOS y PD-1. En un ejemplo particular y no limitante puede usarse la biblioteca de PhD-12 de New England Biolabs.

Puede realizarse inmunopurificación en dos etapas, en la primera etapa, fago unido se eluyó de p1TA, p2TA, p1TB, p2TB, p1TC, p2TC, p1TD y p2TD unido a microplaca de la invención usando elución a pH 2,2.

Esto seleccionará todos los fagos que se unen al sitio de unión del superantígeno de CD28. En la segunda etapa, el fago seleccionado como antes se une a p1TA, p2TA, p1TB, p2TB, p1TC, p2TC, p1TD y p2TD o a sCD28, sICOS, sCTLA-4 y sPD-1 y se eluye específicamente con un exceso de SEB libre. Se eluyeron los fagos unidos y se sometieron a entre dos y tres ciclos adicionales de inmunopurificación. A continuación, puede detectarse la unión directa del fago a p1TA, p2TA, p1TB, p2TB, p1TC, p2TC, p1TD, p2TD, sCD28, sICOS, sCTLA-4, sPD-1 inmovilizado o a cualquier fragmento de los mismos que comprende el sitio de unión del superantígeno, por ELISA de fago, puntuando para M13 sobre la placa. Se amplifican clones de fagos positivos y se secuencian, antes de la síntesis de los péptidos en forma lineal.

Las sustancias antagonistas candidatas que se unen a los péptidos de la invención y, por tanto, al sitio de unión del superantígeno dentro de CD28, que se obtuvieron preferentemente como se ha descrito anteriormente, pueden seleccionarse adicionalmente para su capacidad para prevenir la interacción entre una cualquiera de las moléculas de CD28, ICOS, CTLA-4, PD-1 y el superantígeno.

Un posible enfoque para examinar la capacidad de la sustancia candidata para inhibir la interacción entre el superantígeno y una cualquiera de las moléculas de CD28, ICOS, CTLA-4, PD-1, es usar SEB biotinilada (Toxin Technologies) y ensayo de la capacidad de péptidos para desplazar SEB marcada de la unión a sCD28, sICOS, sCTLA-4 o sPD-1 sobre una placa.

El péptido antagonista candidato obtenido y seleccionado mediante el procedimiento de cribado de la invención puede analizarse adicionalmente y mejorarse por barrido posicional.

En un barrido posicional con pepscan, la afinidad inicial puede ser de tan solo 10⁻³ M y la longitud del péptido puede ser fácilmente 15 residuos. Los péptidos conductores pueden derivarse de cualquier tipo de biblioteca de péptidos, que incluyen bibliotecas combinatorias aleatorias o bibliotecas de péptidos derivadas de secuencias de proteínas dadas. Una relación de señal de sonido con respecto a ruido permite la detección de interacciones específicas de baja afinidad. Puede usarse sobre un soporte sólido [Schroeijsers y col., Cancer Res. 60:1104-1110 (2000)] o después del fraccionamiento de los péptidos del soporte y su uso en forma soluble [Kast y col., Cell 59:603-614 (1989); Kast y col., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 88:2283-2287 (1991); De Samblanx y col., Pept. Res. 9:262-268 (1996); Oosterom y col., J. Biol. Chem. 274:16853-16860 (1999)]. En el barrido posicional limitado, todos los péptidos candidatos se sintetizan como bucles no reducibles; se usan para mejorar adicionalmente la afinidad de péptidos conductores. Así, los péptidos se ligan a un soporte sólido (pepscan-I) o se ensayan como péptidos solubles libres (pepscan-II) para optimizar la afinidad de péptidos conductores.

Puede realizarse un barrido con alanina sobre un péptido antagonista candidato para identificar residuos críticos para unirse al receptor y, por separado, para la actividad antagonista de superantígenos *in vitro*. La actividad antagonista *in vitro* puede evaluarse según la etapa de evaluación del procedimiento de cribado de la invención, descrita más adelante. Se sintetizan péptidos en forma soluble con acetilo del extremo N y -CONH₂ del extremo C y retienen D-alaninas flanqueantes para mayor resistencia de proteasas en ensayos *in vitro* con CMSP como etapa de evaluación. Pueden realizarse rondas adicionales de barrido con alanina sobre péptidos conductores identificados. Debido a que la lisina es importante en el dominio antagonista de superantígeno, asimismo puede realizarse un barrido con lisina del péptido.

Una vez se identifican residuos críticos para la actividad antagonista por el barrido con alanina, 2 de tales posiciones se eligen para un pepscan completamente permutado de los 20 aminoácidos (400 péptidos) y a continuación se

criban igualmente 2 posiciones adicionales (400 péptidos). Los péptidos están primero en forma liberable, pero se mantienen sobre el chip. La unión de uno cualquiera de sCD28, sICOS, sCTLA-4 o sPD-1 a cada péptido se puntúa por ELISA usando anticuerpos policlonales o anticuerpos monoclonales comerciales para este receptor. A continuación, los péptidos positivos son liberados y se reúnen en grupos para el ensayo de unión, el receptor en el formato de ELISA del ensayo de cribado (véase anteriormente) y también para actividad antagonista *in vitro* en ensayos de CMSP (detallado más adelante) y a continuación se desconvolucionan los grupos. En el modo por etapas, los conductores mejorados resultantes se someten a rondas adicionales de barrido posicional. En total, se realizan 4 rondas de barrido posicional, y rondas adicionales de barrido posicional limitado, en el péptido con la mayor afinidad por el receptor.

Para un barrido por ciclación, un conector tal como éster de *N*-hidroxisuccinimida de ácido *m*-maleinimidobenzoico (MBS) puede usarse para reaccionar mediante su éster activo con el extremo *N* de un péptido dado y mediante su grupo maleinimida con un grupo tiol libre de cisteína. La cisteína es parte del péptido.

Para el barrido de bucles, el extremo *N* de cada péptido puede ligarse con MBS a un grupo SH libre de una cisteína que se acopla por separado al fondo del mismo pocillo. De esta forma, se forma un bucle limitado.

Se sintetizan peptidomiméticos cíclicos individualmente y se evalúan para la actividad antagonista en CMSP.

Debe observarse que un antagonista candidato seleccionado y caracterizado por el procedimiento de cribado de la invención mostrado por el Ejemplo 8 es una sustancia que se une al sitio de unión del superantígeno dentro de uno cualquiera de CD28, ICOS, CTLA-4 o PD-1, y debe evaluarse adicionalmente frente a su capacidad para antagonizar la activación mediada por toxina de linfocitos Th1 y opcionalmente su capacidad para provocar inmunidad protectora contra choque tóxico inducido por una exotoxina pirógena o por una mezcla de tales exotoxinas pirógenas.

El sistema de prueba usado para evaluar el antagonista candidato aislado mediante el procedimiento de cribado de la invención puede ser un cultivo celular *in vitro/ex vivo*, o un modelo animal *in vivo*. Tal sistema de prueba comprende opcionalmente además compuestos endógenos y/o exógenos que proporcionan condiciones adecuadas para la activación de linfocitos T inducida por superantígeno y para la detección de una indicación de punto final para determinar el efecto antagonizante del antagonista candidato. Más específicamente, los linfocitos T son linfocitos Th1 y dicha activación se determina por la inducción de la expresión génica de IL2 y/o IFN- γ .

Según una realización, el sistema de prueba utilizado mediante el procedimiento de cribado de la invención para la evaluación puede ser un cultivo celular *in vitro/ex vivo* que comprende moléculas endógenamente expresadas de CD28, ICOS, CTLA-4 o de PD-1. En un ejemplo particular, el cultivo celular usado como sistema de prueba puede ser un cultivo de CMSP aislado de un donante de mamífero. Tal mamífero puede ser preferentemente uno cualquiera de humano y macaco de la India.

La indicación del punto final en este sistema de prueba particular puede, por tanto, ser la expresión inducida por superantígeno de IL2 y/o de IFN- γ , que conduce a una señal visualmente detectable. Así, cualquier inhibición o incluso reducción de dicho punto final es indicativo de la capacidad de la sustancia candidata para antagonizar específicamente e inhibir la interacción de un superantígeno con molécula de CD28. Tal inhibición conduce a la activación antagonizante mediada por toxina de linfocitos Th1. La expresión inducida por superantígeno de IL2 y/o de IFN- γ puede detectarse, por ejemplo, por hibridación cuantitativa por transferencia puntual y ensayo de protección de RNasa.

Como se demuestra por los siguientes ejemplos, los inventores han desarrollado una poderosa herramienta de cribado *in vitro* para la actividad antagonista de superantígenos basándose en la capacidad de un péptido antagonista para inhibir la expresión inducida por superantígeno de ARNm de citocinas Th1 en poblaciones de CMSP humanas completas recientemente aisladas que contienen todos los subconjuntos de células que participan en una respuesta inmunitaria celular [Arad y col., (2000) arriba]. Los inventores han mostrado que este sistema refleja estrechamente la respuesta inmunitaria humana en una variedad de enfermedades en las que se detectó desregulación de esa respuesta [Gerez y col., Clin. Immunol. Immunopathol. 58:152-266 (1991); Gerez y col., Kidney International 40:266-272 (1991); Gerez y col., Clin. Exp. Immunol. 109:296-303 (1997); Kaempfer y col., J. Clin. Oncol. 14:1778-1786 (1996)], proporcionando así un excelente marcador sustituto. Este ensayo de CMSP demostró ser eficaz en el descubrimiento de los péptidos antagonistas *p12* y *p14* por los presentes inventores [Arad y col., (2000), (2001) arriba] y por mostrar la ausencia de actividad agonista de toxina [Arad y col., (2000) arriba]. Por tanto, este sistema puede usarse eficazmente para evaluar la actividad antagonista de las sustancias antagonistas candidatas obtenidas mediante el procedimiento de cribado de la invención.

Los inventores han ideado un procedimiento cuantitativo sensible para medir la expresión de ARNm de IL2 y de IFN- γ inducido en CMSP humanas, cuantificando sus especies de ARNm de baja abundancia en números pequeños de células. El procedimiento permite el conveniente procesamiento de grandes números de muestras, y como tal, es adecuado para cribar posibles antagonistas de toxinas. Además, permite el estudio de respuestas de CMSP de varios donantes humanos diferentes de una vez, para un gran número de parámetros. Esto crea una herramienta

eficaz para mostrar actividad antagonista de una manera reproducible. Las mediciones de proteína IL2 e IFN- γ son menos informativas que de ARNm debido a que estas proteínas aparecen solo gradualmente durante la inducción y son secuestradas uniéndose a sus receptores celulares, mientras que el ARNm se expresa rápidamente y puede ensayarse con exactitud. La determinación de ARNm de IL2 e IFN- γ da información dinámica sobre la respuesta primaria de estos genes en el plazo de horas después de la estimulación inmunitaria. El ensayo es lineal durante un amplio intervalo. La información obtenida de tal análisis se verifica por análisis de protección de RNasa.

Una propiedad esencial del péptido antagonista deseado es aquel que deja intacta la respuesta de Th2. Esto también es un requisito para reservas, y puede probarse por ELISA para IL10, usando medio de cultivo de CMSP en las que la expresión inducida por toxinas de ARNm de citocinas Th1 se inhibe por el péptido antagonista.

En otra alternativa más, el sistema de prueba utilizado mediante el procedimiento de cribado de la invención para evaluar antagonistas candidatos puede ser un sistema *in vivo*, particularmente un modelo animal.

Según una realización específica, el modelo animal puede ser un ratón sensibilizado a D-galactosamina expuesto a un superantígeno, preferentemente una exotoxina pirógena. La indicación del punto final para tal sistema de prueba puede ser la protección y rescate de dicho ratón de choque tóxico letal. Un aumento en dicho punto final es indicativo de la capacidad de dicha sustancia candidata a antagonizar e inhibir específicamente la interacción entre el superantígeno y la molécula de CD28, para antagonizar la activación mediada por toxina pirógena de linfocitos Th1, para proteger contra choque tóxico y puede también indicar la capacidad de dicho candidato para provocar indirectamente la inmunidad protectora contra el choque tóxico inducido por una exotoxina pirógena o por una mezcla de al menos dos exotoxinas pirógenas.

Un modelo animal alternativo puede ser un cerdo expuesto a una exotoxina pirógena. En tal procedimiento, la indicación del punto final puede ser la protección y rescate de dicho cerdo de choque tóxico e incapacitación. Un aumento en tal punto final es indicativo de la capacidad de dicha sustancia candidata para antagonizar e inhibir específicamente la interacción entre el superantígeno y la molécula de CD28, para antagonizar la activación mediada por exotoxina pirógena de linfocitos Th1, para proteger contra choque tóxico e incapacitación y opcionalmente para provocar inmunidad protectora contra el choque tóxico inducido por una exotoxina pirógena o por una mezcla de al menos dos exotoxinas pirógenas.

También se hace referencia a un procedimiento de preparación de una composición terapéutica para el tratamiento de un trastorno relacionado con superantígenos en un sujeto mamífero. Este procedimiento comprende las etapas de:

- (a) identificar una sustancia antagonista que puede antagonizar la activación mediada por superantígenos de linfocitos Th1 y preferentemente adicionalmente que puede provocar la inmunidad protectora contra choque tóxico inducido por una exotoxina pirógena o por una mezcla de al menos dos exotoxinas pirógenas; y
- (b) mezclar dicha sustancia antagonista con al menos una de un vehículo, diluyente, excipiente y/o aditivo farmacéuticamente aceptable.

La sustancia antagonista usada mediante el procedimiento de preparación de una composición terapéutica puede identificarse preferentemente mediante el procedimiento de cribado de la invención, como se ejemplifica por el Ejemplo 8.

Desvelada y descrita, debe entenderse que la presente invención no se limita a los ejemplos particulares, etapas de procedimientos y composiciones desveladas en el presente documento y que tales etapas de procedimiento y composiciones pueden variar algo. También debe entenderse que la terminología usada en el presente documento se usa con el fin de describir realizaciones particulares solo y no previstas para ser limitantes ya que el alcance de la presente invención se limitará solo por las reivindicaciones adjuntas y equivalentes de las mismas.

Debe observarse que, como se usa en esta memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular "un", "una", "el" y "la" incluyen referentes plurales, a menos que el contenido dicte claramente de otro modo.

En toda esta memoria descriptiva y los ejemplos y reivindicaciones que siguen, a menos que el contexto requiera de otro modo, la palabra "comprenden", y variaciones tales como "comprende" y "que comprende", se entenderán que implican la inclusión de un número entero establecido o etapa o grupo de números enteros o etapas, pero no la exclusión de ningún otro número entero o etapa o grupo de número enteros o etapas.

Los siguientes ejemplos son representativos de técnicas empleadas por los inventores en llevar a cabo los aspectos de la presente invención.

Ejemplos

Procedimientos experimentales

Péptidos

5 Se sintetizaron péptidos usando química de fluoronil-metoxicarbonilo, se escindieron y la cadena lateral se desprotegió con ácido trifluoroacético. Los péptidos fueron >95 % puros por cromatografía de líquidos a alta presión y su peso molecular se verificó por espectrometría de masas MALDI-TOF. Todos los péptidos, excepto p12CC, se limitaron con residuos de D-Ala para mayor resistencia a proteasas. Se obtuvieron secuencias desordenadas usando un generador de números aleatorios reales (<http://www.random.org/>).

10 CD28, CTLA4, ICOS y B7-2 solubles

sCD28, sICOS y sB7-2 (R&D Systems), expresados en células NS0 de mieloma de ratón, son homodímeros ligados por disulfuro quiméricos que comprenden el dominio extracelular de 19-152, 21-141 y 20-239 aminoácidos, respectivamente, de los ligandos humanos maduros fusionados con Fc de IgG 1 humana marcada con His₆ del extremo C. sCTLA4 libre de vehículo (R&D Systems), expresado en células Sf21 usando baculovirus, es un homodímero ligado a disulfuro quimérico que comprende el dominio de 37-162 aminoácidos extracelular de CTLA4 humano maduro fusionado asimismo con Fc de IgG 1 maduro.

20 Cultivo celular e inducción de la expresión génica de citocinas

Se separaron CMSP de donantes humanos sanos sobre Ficoll Paque (Pharmacia), se lavaron dos veces con 50 ml de medio RPMI 1640, se resuspendieron a una densidad de 4×10^6 células/ml y se cultivaron en este medio complementado con 2 % de suero bovino fetal, glutamina 2 mM, aminoácidos no específicos MEM 10 mM, piruvato de Na 100 mM, HEPES 10 mM a pH 7,2, 2-mercaptoetanol 5×10^{-5} M, 100 u/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina y 5 µg/ml de nistatina. Se añadió SEB (Department of Toxicology, U.S. Army Medical Research Institute of Infectious Diseases) y TSST-1 (Sigma) a 100 ng/ml.

25 Análisis de ARNm

30 Para el análisis de protección de RNasa (Arad y col., 2000), se extrajo ARN total de alícuotas de 3×10^7 CMSP humanas con reactivo Trizol (Invitrogen) y se hibridaron durante 18 h a 42 °C con sondas de ARN antisentido genómico transcritas con α -[³²P]UTP *in vitro* de ADN insertado en pBS (Promega). La sonda de IL2 de 600 nt, transcrita del promotor T7, es complementaria al exón 3 de IL2 y la parte de intrón 3; en geles de urea-poliacrilamida 8 M, da un ARN de 117 nt protegido por ARNm de IL2. La sonda de IFN- γ de 274 nt, transcrita del promotor T3, es complementaria al exón 3 de IFN- γ y parte del intrón 3 y da un ARN de 183 nt protegido por ARNm de IFN- γ . Las sondas de ARN antisentido para 18S ARNr y el ARNm de β -actina protegen 90 y 415 nt, respectivamente. Para la hibridación cuantitativa por transferencia puntual de ARNm de IL2 e IFN- γ , se lisaron alícuotas de 4×10^6 CMSP en HCl de guanidinio 7,5 M. Se aplicaron cuatro diluciones dobles en serie de ARN total en 10x solución salina-citrato de sodio a hojas de nitrocelulosa en un aparato de transferencia puntual de 96 pocillos. Cada hoja se hibridó con una sonda de ARN antisentido marcada con ³²P. Los autorradiogramas se barrieron a 630 nm en un lector de ELISA. Las diluciones sucesivas dieron respuestas lineales de A₆₃₀ durante un amplio intervalo [Arad (2000) arriba].

45 Espectroscopía de resonancia de plasmones superficiales (SPR)

Se diluyeron SEB, sCD28 y p12CC a 100 µg/ml en acetato de Na 10 mM a pH 4,0 y se inmovizaron sobre un chip sensor CM5 (BIAcore) por acoplamiento de amina-tiol usando el kit del fabricante (BIAcore). Se inyectaron CD28, CTLA4, ICOS, B7-2 solubles o IgG humana (Jackson Laboratories) a 10 µl/min en HEPES 25 mM a pH 7,4, NaCl 150 mM, EDTA 3,4 mM y 0,005 % de tensioactivo P20 en condiciones que no muestran limitación de la transferencia de masa. Se realizaron análisis de afinidad y cinéticos a 25 °C en un instrumento BIAcore 3000 usando el software BIAevaluation 3.0.

50 Expresión en fago

Para el mapeo de epítomos, la biblioteca de expresión en fago combinatoria PhD-12 en M13KE (New England Biolabs) se inmunopurificó sobre el mAb α CD28 inmovilizado (MAB342, clon 37407.111, R&D Systems) siguiendo instrucciones del fabricante; el desplazamiento fue con sCD28. Los fagos de la cuarta inmunopurificación se inmovizaron sobre membranas ECL-plus (Pharmacia) y la unión de α CD28 se detectó con anti-IgG de ratón ligada a peroxidasa de rábano picante (HRP) (Jackson Laboratories). Se alinearon secuencias de 19 insertos distintos con CD28, sin huecos. Para la selección por afinidad de CD28, la misma biblioteca se inmunopurificó sobre sCD28 inmovilizado; el desplazamiento fue con SEB.

60 Ensayo de letalidad en ratón

Se expusieron ratones BALB/c hembra (10-12 semanas; Harlan) a inyección intraperitoneal de SEB (Sigma) y 20 mg de D-galactosamina (Sigma). Cuando estuvo presente, se inyectó intraperitonealmente péptido antagonista 30 min

antes de la exposición. Se monitorizó la supervivencia. La viabilidad siguió constante más de 72 h mientras que se siguió, dos semanas. Los experimentos que implican ratones fueron autorizados por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales.

5 Ejemplo 1

La inducción de ARNm de citocinas Th1 por SEB se atenúa por la inducción concomitante de citocinas Th2

10 Cuando el choque tóxico letal mediado por superantígeno se previno por un peptidomimético de superantígeno, los ratones adquirieron rápidamente inmunidad a las exposiciones a toxinas y desarrollaron Abs ampliamente protectores [Arad (2000) arriba]. Los inventores razonaron que cuando el péptido antagonista bloquea la inducción de una respuesta de Th1 que conduce a choque letal, podría dejar la respuesta de Th2 intacta, permitiendo el desarrollo de inmunidad protectora. De hecho, se indujeron IL4 y IL10 rápidamente por SEB en células mononucleares de sangre periférica (CMSP) humanas (Figura 1D) a niveles que inhibieron fuertemente la expresión de ARNm de IL2 y de IFN- γ . En el plazo de 4-6 h, la amplitud de la onda de ARNm de IL2 inducido aumentó significativamente cuando estuvieron presentes Ab neutralizantes contra IL4 o IL10, mientras que no tuvo efecto la IgG de control del mismo isotipo (Figura 1A). El gen de IFN- γ respondió incluso más ampliamente al empobrecimiento de IL4 o IL10, con amplitud y duración potenciadas de la onda de ARNm inducido, además de expresión más temprana (Figuras 1B y 1C). Así, aunque superantígenos tales como SEB inducen una expresión génica de citocinas Th1 excesiva, esta respuesta sigue estando por debajo de su potencial completo debido a que se atenúa por inducción concomitante de IL4 e IL10. La expresión temprana de estas citocinas Th2 forma una parte integral de la respuesta primaria al superantígeno.

25 Ejemplo 2

Inhibición selectiva de la respuesta de Th1 por un peptidomimético de superantígenos

30 La inducción de genes de citocinas Th1 en CMSP humanas puede bloquearse por un peptidomimético de superantígenos YNKKKATVQELD (p12A, también indicado por SEC ID N.º: 1) parcialmente homólogo a SEB₁₅₀₋₁₆₁ (TNKKKVTAQELD; el 'dominio antagonista', también indicado por SEC ID N.º:2) [Arad (2000) arriba]. Los inventores han sintetizado un péptido relacionado VQYNKKKATVQELD (p12B, también indicado por SEC ID N.º: 3) en el que VQ son homólogos a SEB₁₄₈₋₁₄₉. p12B fue indistinguible de p12A en su capacidad para inhibir la inducción de genes de citocinas Th1 humanas por superantígenos y para proteger ratones de la exposición letal a SEB (PCT IL 03/00278]. Aunque p12B bloqueó la inducción mediada por SEB de ARNm de IL2 y de IFN- γ , no inhibió la inducción de IL4 e IL10 (Figura 1D). Este resultado fue reproducible y muestra que el equilibrio entre las respuestas de Th1 y Th2 inducidas por SEB se modula por el péptido antagonista.

40 La interacción de SEB con la molécula de TCR y de clase II del MHC deja el dominio antagonista accesible (Figura 1E). Para explicar la selectividad por Th1 de p12B (SEC ID N.º:3), los inventores propusieron que la activación de células Th1, pero no de células Th2, por un superantígeno requiere un receptor adicional y que la unión del superantígeno a este receptor se produce mediante el dominio antagonista, haciéndolas más sensibles a la inhibición por el peptidomimético (Figura 1F).

45 Ejemplo 3

La inducción de una respuesta por SEB depende de B7-2

50 Los estudios con ratones deficientes en CD28 sugirieron que la coestimulación de CD28 es necesaria para la toxicidad de superantígenos [Saha, B. y col., J. Exp. Med. 183:2675-2680 (1996); Mittrucker, H.W. y col. J. Exp. Med. 183(6):2481-8 (1996)]. Sin embargo, no se resolvió si B7-1 (CD80), B7-2 (CD86) o ambos participan como coligandos [Muraille, E. y col., Immunology 89: 245-249 (1996); Krummel, M.F. y col., Int. Immunol. 8(4):519-23 (1996)]. La inducción de ARNm de IL2 y de IFN- γ por SEB se bloqueó por anti-B7-2, pero no por anti-B7-1 (Figuras 2A y 2B). Por el contrario, la inducción concomitante de IL10 fue resistente a cualquier mAb (Figura 2C). Estos resultados fueron reproducibles y muestran que en cuanto a los antígenos convencionales [revisados por Carreno y Collins (2002) arriba; Collins, A.V. y col., Immunity 17(2):201-10 (2002)], la inducción de una respuesta de Th1 por SEB se basa selectivamente en la señalización mediante B7-2/CD28.

Ejemplo 4

CD28, CTLA4 y B7-2 solubles inhiben la inducción de una respuesta de Th1 por SEB

65 La selectividad similar del efecto inhibitorio de p12B (SEC ID N.º: 3) y de anti-B7-2 sobre la respuesta de Th1 condujo a los inventores a investigar la posibilidad de que SEB pudiera interactuar con CD28 o B7-2 mediante su dominio antagonista. La inducción de ARNm de IL2 y de IFN- γ por SEB se inhibió por una forma soluble de CD28 humano que comprende su dominio extracelular de 152 aminoácidos (sCD28) (Figura 2D). Por el contrario, la inducción de

IL10 por SEB en el mismo cultivo celular no estuvo esencialmente afectada por sCD28 (Figura 2E). sCD28 solo no indujo estos genes. sCD28 inhibió la inducción de ARNm de IL2 de un modo dependiente de la dosis (Figura 2F). Al igual que sCD28, sB7-2 inhibió la inducción mediada por SEB de ARNm de IL2 (Figuras 2G y 2H), pero no la inducción de IL10 (Figura 2I). Aunque estos resultados podrían sugerir que SEB usa CD28 y B7-2 como ligandos coestimulantes, los inventores conjeturaron que provocando una respuesta de Th1, SEB puede unirse directamente a uno o ambos.

CTLA4 y CD28 son estructuralmente homólogos e interaccionan con los mismos coligandos de B7 proporcionando señales opuestas [revisado por Collins (2002) arriba; Sansom, D.M. y col., Trends Immunol. 24(6):314-9 (2003)]. Los inventores examinaron el efecto de sCTLA4 sobre la expresión de ARNm de IL2 y de IFN- γ inducida por SEB. sCTLA4 también bloqueó esta expresión (Figura 2J) en cuanto a sCD28 y sB7-2, dejó la inducción de IL10 intacta (Figura 2K). sCTLA4 pudo inhibir la acción de SEB compitiendo por B7-2 como se ha sugerido previamente [Zhou, T. y col., Eur. J. Immunol. 24(5):1019-25 (1994)], pero los inventores consideraron la posibilidad que mediante la unión a SEB podría impedirse la interacción del superantígeno con CD28 y/o B7-2 de la superficie celular.

Ejemplo 5

SEB induce un cambio transitorio en la accesibilidad superficial de CD28

Los inventores usaron a continuación un mAAb CD28 (α CD28) o un Ab policlonal CD28 (CD28 Ab) para tefir CMSP humanas enriquecidas en CD4 durante el transcurso de la activación por SEB. CD28 estuvo accesible a Ab CD28 en reposo y se activaron células, pero solo estuvieron disponibles para α CD28 transitoriamente después de la inducción con SEB, durante 6 h (Figura 3A). Por tanto, aunque CD28 se expresa constitutivamente sobre la superficie celular, experimenta un cambio transitorio en la presentación a epítipo inducida por SEB, otra evidencia de una interacción funcional entre estos ligandos.

Ejemplo 6

El peptidomimético de superantígenos bloquea la señalización mediante CD28

Para examinar la función de CD28 en la activación de genes de citocina Th1 independientemente de otros ligandos, los inventores indujeron ARNm de IL2 y de IFN- γ con α CD28 solo. Esta inducción se bloqueó por el peptidomimético de superantígenos p12B (SEC ID N.º: 3, Figura 3B). La combinación de α CD28 y α CD3 provocó una mayor expresión que la de mAAb solo; esta inducción se eliminó prácticamente por completo por p12B (Figura 3C). Por el contrario, la inducción de IL10 por α CD28/ α CD3 fue resistente a p12B (Figura 3D). Así, en ausencia de un superantígeno, el péptido antagonista bloqueó selectivamente la activación de una respuesta de Th1 transducida por CD28. α CD28 se unió a sCD28 como era de esperar, pero dejó de unirse a p12B (Figura 3E), que indica que el péptido compete con α CD28 por CD28.

Los inventores examinaron a continuación el efecto de p12B sobre la señalización de B7-2 mediante CD28. sB7-2 indujo expresión temprana y sostenida de ARNm de IFN- γ ; solo durante 20 h se inhibió esta inducción por p12B (Figura 3F). El peptidomimético de superantígenos no inhibió significativamente la inducción por α CD3, pero abolió la inducción por sB7-2 y α CD3 en combinación, que fue superior a aquella con cualquier ligando solo. α CD28 o sB7-2 dejó de inducir IL10 y la inducción de IL10 por α CD3 no se aumentó por α CD28 o sB7-2 ni se inhibió por p12B (Figuras 3D y 3G).

Estos estudios funcionales muestran que la inducción de IL10 es independiente de CD28. Esto proporciona una explicación de la resistencia de la inducción mediada por SEB de IL10 a p12B y a anti-B7-2, sB7-2, sCD28 y sCTLA4 (Figuras 1D y 2). La señalización mediante CD28 necesita selectivamente para la respuesta de Th1 un superantígeno. El hallazgo de que incluso en ausencia de SEB un peptidomimético de superantígenos bloqueó la activación de Th1 mediada por CD28 condujo a los inventores a examinar si los superantígenos usaban el dominio antagonista homólogo para unirse a CD28.

Ejemplo 7

SEB se une a CD28, CTLA4 e ICOS mediante su dominio antagonista

Los estudios de unión en equilibrio de la resonancia de plasmones superficiales (SPR) han mostrado que la interacción de superantígenos con la molécula de TCR o de la clase II del MHC es débil, con constantes de disociación en el intervalo micromolar [Seth, A. y col., Nature 369:324-327 (1994); Redpath, S. y col., J. Immunol 163:6-10 (1999)]. Como se muestra por la Figura 4, cuando SEB se inmovilizó sobre un chip Biacore, se detectó la unión directa de CD28, CTLA4 o ICOS solubles, con valores de K_D de 28, 31 y 21 nM, respectivamente (Figuras 4A, 4B y 4C), pero no de otro miembro de la superfamilia de inmunoglobulinas, IgG humana (no mostrado). Así, SEB se une directamente a cada miembro de la tríada de receptores coestimulantes, CD28, CTLA4 e ICOS, con una afinidad muy por encima de aquella para la molécula de TCR o de la clase II del MHC.

Los inventores inmovilizaron a continuación p12CC (p12A sostenido por cisteínas terminales). Este péptido fue tan activo como p12 en el bloqueo de la inducción mediada por SEB de ARNm de IL2 y de IFN- γ en CMSP humanas (no mostradas). CD28, CTLA4 e ICOS solubles se unieron directamente a p12CC, con valores de K_D de 76, 33 y 42 nM, respectivamente (Figuras 4D, 4E y 4F). Se obtuvieron resultados similares cuando p12B (SEC ID N.º: 3) se inmovilizó (no mostrado). No se detectó la unión para IgG humana. Las afinidades por el péptido p12 no se diferenciaron significativamente de aquellas para SEB intacto. Los inventores llegan a la conclusión de que SEB usa su dominio antagonista para unirse a CD28. De acuerdo con una función clave de este dominio en la función de superantígenos, el Ab α p12B fue completamente protector contra la exposición letal a SEB en el ratón sensibilizado a D-galactosamina (Figura 4G), un modelo establecido para la letalidad de superantígenos [Arad (2000) arriba].

El coligando de CD28 sB7-2 también se unió directamente a SEB, con una K_D de 25 nM (Figura 4H). Esta afinidad fue similar a la de sCD28 por SEB (Figura 4A) y de sCD28 por sB7-2 (K_D , 19 nM; Figura 4I), pero las tasas de asociación y disociación fueron mayores, dando fe de menor avidéz. Collins y col., [Collins (2002) arriba] informaron una afinidad mucho menor de sCD28 por sB7-2 (K_D , 20 μ M a 37 °C). Lo más verosímil, los resultados de discrepancia de la temperatura, procedimiento de presentación de sCD28 y actividad de las preparaciones de sCD28 recombinantes usadas. Por comparación, α CD28 se unió reproduciblemente a sCD28 con una K_D de 2 nM.

Los resultados de los análisis de expresión génica de citocinas de Th1 (Figuras 1D, 2 y 3) están fácilmente adaptados por el hallazgo de que SEB interacciona directamente con CD28 y que esta unión se produce mediante el dominio antagonista en el superantígeno.

Ejemplo 8

Selección de péptidos antagonistas de SEB por afinidad por CD28

Para obtener pruebas independientes de una interacción directa entre el superantígeno y CD28, los inventores inmunopurificaron repetidamente una biblioteca de expresión en fago 12-mera aleatoria sobre sCD28 inmovilizado, desplazando fagos unidos con SEB. Más del 10 % de los fagos seleccionados se unieron fuertemente a sCD28 (Figura 5A), y más a continuación. Se aislaron 40 péptidos de estos fagos (como se indica por SEC ID N.º: 25 a 56). Se analizaron los péptidos de cuatro fagos para actividad antagonista. pe12 (SHFTHNRHGHST, también indicado por SEC ID N.º: 6) inhibió fuertemente la inducción de ARNm de IL2 y de IFN- γ por SEB que también careció de actividad agonista de superantígenos (Figura 5B) y dejó de inhibir la inducción de IL10 (Figura 5C); pd7 (WHAHPHKPVVA, también indicado por SEC ID N.º: 7) (Figura 5E) y pc3 (FHKHKNPGSPH, también indicado por SEC ID N.º: 8) inhibieron similarmente la inducción de genes de citocinas Th1 (Figura 5F). Estos péptidos presentaron actividad antagonista de SEB también *in vivo*. En exceso molar de solo 2 y 5 veces con respecto a SEB, respectivamente, pe12 y pc3 protegieron 8/10 y 7/10 ratones de la exposición letal que no dejó supervivientes en el grupo de control (Figura 5D). El péptido pd7 también protegió ratones de la exposición letal a SEB (Figura 5G). Solos, pe12, pc3 y pd7 carecieron de toxicidad detectable (Figura 5D y 5G).

Así, pueden seleccionarse antagonistas de superantígenos novedosos de secuencias de péptidos aleatorias únicamente por su afinidad por el sitio de unión de SEB en CD28.

Ejemplo 9

El sitio de unión para SEB en CD28/CTLA4 está mapeado en la interfase del dímero

Como el peptidomimético de superantígenos p12 se une a CD28 (Figura 4D), la observación de que p12B (SEC ID N.º: 3) bloqueó la señalización por α CD28 para la expresión génica de citocinas Th1 (Figuras 3H y 3I) sugirió que este péptido compite con el mAb por su epítipo en CD28. El mapeo de epítopos definió la secuencia CD28₁₁₆₋₁₂₄, HVKKGKHLCP, también indicada por SEC ID N.º: 9, en la que HVKKGKH (SEC ID N.º: 10) se corresponde con el dominio de dimerización en CTLA4, YVIDPE (también indicada por SEC ID N.º: 18) [Schwartz (2001) arriba] (Figura 6A). Aunque son altamente homólogos y aunque están similarmente plegadas [Luhder, F. y col., J. Exp. Med. 197(8):955-66 (2003)], las secuencias de CD28 y CTLA4 se diferencian en este dominio, además de en los residuos 10-15; en la proteína CTLA4 plegada, los dos dominios están yuxtapuestos, creando la interfase del dímero (Figura 6A, rojo y verde). El dominio de unión B7 conservado en los residuos 97-105 se localiza sobre el lado opuesto de CTLA4 (Figura 6A, amarillo), dejando la interfase del dímero accesible.

Para verificar el mapeo del epítipo de CD28, los inventores sintetizaron el péptido A₇HVKKGKHLCP (p7A, también indicado por SEC ID N.º: 11). Al igual que sCD28, p7A abolió la inducción de ARNm de IFN- γ en CMSP por α CD28, tanto si esta inducción se produce pronto como tarde (Figura 6B). Esto proporciona pruebas funcionales de que el mAb interacciona con el dominio CD28₁₁₆₋₁₂₄, que lo más probablemente incluye parte de la interfase del dímero de CD28.

Ejemplo 10

Peptidomiméticos de la interfase del dímero predicha en CD28 bloquean la inducción de una respuesta de Th1 por superantígenos

5 Los resultados anteriores implican que para provocar una respuesta de Th1, SEB debe unirse a CD28 en un sitio que se solapa con el motivo de HVKGGKHLCP (SEC ID N.º: 9). Al igual que sCD28 (Figura 2), pTA bloqueó la inducción de ARNm de IL2 y de IFN- γ por SEB (Figura 6C), de un modo dependiente de la dosis (Figura 6F) [como se muestra por el documento WO 03/084995]. Por el contrario, dejó la inducción de IL10 y IL4 intacta (Figuras 6D y 6E), reflejando la especificidad por Th1 del peptidomimético de superantígenos p12B (Figuras 1 y 3). Los inventores sintetizaron a continuación peptidomiméticos de CD28 HVKGGKHLCP (p1TA, también indicado por SEC ID N.º: 9) y SPMLVAYD (p2TA; OD28₈₋₁₅, también indicado por SEC ID N.º: 12) [como se muestra por una solicitud previa de los inventores, 16824wo, no publicada]. Basándose simplemente en el mapeo de epítomos, no se esperaba que p2TA actuara de antagonista de SEB. Los inventores propusieron que p2TA podría ser un antagonista si, para inducir una respuesta de Th1, el superantígeno debiera poner en contacto ambos bordes de la interfase del dímero predicho para CD28 (Figura 6A). De hecho, p1TA (SEC ID N.º: 9) y p2TA (SEC ID N.º: 12) antagonizaron cada uno la expresión inducida por SEB de ARNm de IL2 y de IFN- γ (Figura 6G). La combinación de p1TA y p2TA no fue significativamente más potente. p1TAsc, que contiene los aminoácidos de p1TA en un orden aleatoriamente desordenado, careció de actividad antagonista (Figura 7A). Estos resultados proporcionan fuertes pruebas de que el sitio de unión funcional para superantígenos en CD28 está compuesto, formado de secuencias en p1TA y p2TA.

20 Dentro de la familia de los superantígenos de bacterias, la toxina 1 del síndrome de choque tóxico (TSST-1) se diferencia lo más ampliamente de los otros miembros, que muestran solo el 6 % de homología de secuencias global con SEB. Aunque TSST-1 presenta en su dominio antagonista FDKKQLAISTLD (también indicado por SEC ID N.º: 13) mucha menos homología de secuencias que otros superantígenos por el dominio de SEB TNKKKVTQAELD (también indicado por SEC ID N.º: 2), este dominio muestra sin embargo conservación espacial [Arad (2000) arriba]. De hecho, p1TA y p2TA inhibieron la inducción de ARNm de IL2 y de IFN- γ por TSST-1 (Figura 6H). Al igual que p12A, por tanto, p1TA y p2TA presentan actividad de amplio espectro como antagonistas de superantígenos. Lo más probablemente, actúan compitiendo con CD28 de la superficie celular por el dominio antagonista en superantígenos.

30 Ejemplo 11

Péptidos miméticos de CD28 de la interfase del dímero protegen ratones de choque letal

35 Los inventores usaron el modelo de ratón para examinar si p1TA (SEC ID N.º: 9) y p2TA (SEC ID N.º: 12) presentan actividad antagonista de SEB *in vivo*. Mientras que todos los controles (10/10) se sacrificaron por SEB, sobrevivieron 7/10 ratones que habían recibido una dosis única de p1TA poco antes de SEB (Figura 7B). p1TA proporcionó el 70 % de protección cuando estuvo presente en 3,6 veces de exceso molar con respecto a SEB. Por el contrario, p1TAsc dejó de proporcionar protección. En 12 veces de exceso molar con respecto a SEB, p12B también dio el 70 % de protección. p2TA, pero no p2TAsc, protegió ratones del choque letal (Figura 7C). Entre los controles expuestos a SEB sola, 3/10 sobrevivieron en comparación con 8/10 sobrevivientes para ratones que también recibieron una dosis única de p2TA. p2TA fue eficaz como antagonista *in vivo* en solo 0,8 veces la relación molar con respecto a SEB. Estos resultados fueron reproducibles. Solos, p1TA y p2TA carecieron de toxicidad detectable incluso a concentraciones 25 y 125 veces mayores, respectivamente, que las necesarias para la protección (Figuras 7B y 7C).

50 La capacidad de p1TA y p2TA para proteger ratones del choque letal inducido por SEB en exceso molar muy bajo con respecto a la toxina y para bloquear la inducción de ARNm de citocinas Th1 (Figuras 6G y 6H) muestra que cada uno de los dos bordes de la interfase del dímero de CD28 predicha desempeña una función crítica en la activación de una respuesta de Th1 perjudicial por el superantígeno.

Ejemplo 12

Miméticos del péptido de la interfase del dímero en CTLA4 o ICOS son antagonistas de SEB

55 SEB se unió no solo a CD28, sino también a los receptores relacionados CTLA4 e ICOS (Figura 4). Los inventores examinaron si la interacción con CTLA4 también tenía lugar en la interfase del dímero. De hecho, los péptidos derivados de cada uno de los dos bordes de la interfase del dímero de CTLA4, YVIDPEPCP (p1TB, también indicado por SEC ID N.º: 14) y PAVVLASS (p2TB, también indicado por SEC ID N.º: 15), fueron potentes antagonistas de SEB que inhibieron la inducción de genes de IL2 y de IFN- γ pero dejaron la inducción de IL10 intacta (Figuras 7D y 7E). Cuando están presentes en exceso molar de solo dos veces con respecto a SEB, p1TB y p2TB protegieron los ratones de la exposición letal (Figura 7F).

65 ICOS, el tercer miembro de la tríada de co-receptores [Hutloff, A. y col., Nature 397(6716):263-6 (1999); Coyle, A.J. y col., Immunity 13(1):95-105 (2000)], usa un co-ligando diferente, ICOSL [revisado por Sharpe y Freeman, (2002) arriba] y así parece que funciona de forma distinta de CD28 y CTLA4. Como se muestra por la Figura 6I, los

inventores alinearon ICOS humano con CD28 y sintetizaron dos péptidos, YESQLCCQL (p1TC, también indicado por SEC ID N.º: 16) y GEINGSAN (p2TC, también indicado por SEC ID N.º: 17), postulando que estos pueden corresponderse con la interfase del dímero bipartita en CTLA4/CD28. De hecho, p1TC y p2TC inhibieron la respuesta de citocinas Th1 a SEB, pero no la inducción de IL10 (Figuras 7G y 7H) y protegieron ratones de la exposición letal con el superantígeno (Figura 7I).

Los inventores llegan a la conclusión de que SEB tiene el potencial de unirse directamente no solo a la interfase del dímero (predicha) en CD28, sino también en CTLA4 e ICOS. Los péptidos derivados de las interfases del dímero en la tríada CD28/CTLA4/ICOS, aunque carecen totalmente de homología, son potentes antagonistas de superantígenos que bloquean la inducción de una respuesta de citocinas Th1 y protegen contra choque tóxico letal. Así, dos clases distintas de péptidos antagonistas definen una función crítica para la interacción directa del superantígeno y CD28: miméticos de superantígeno que compiten con el superantígeno por CD28 y miméticos de la tríada de co-receptores que compiten con CD28 por el superantígeno (Figura 7J).

15 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Yissum Research and Development

20 <120> Procedimientos y composiciones para la inhibición de la modulación de la ruta coestimulante de linfocitos T por un agente patógeno

<130> 17428/WO/04

25 <160> 59

<170> PatentIn versión 3.1

<210> 1

<211> 12

30 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

35 <223> Péptido sintético p12A

<400> 1

Tyr Asn Lys Lys Lys Ala Thr Val Gln Glu Leu Asp
1 5 10

40 <210> 2

<211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

45 <220>

<223> Péptido sintético derivado de los residuos 150-161 de SEB

<400> 2

Thr Asn Lys Lys Lys Val Thr Ala Gln Glu Leu Asp
1 5 10

<210> 3

<211> 14

<212> PRT

55 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido sintético p12B

60 <400> 3

Val Gln Tyr Asn Lys Lys Lys Ala Thr Val Gln Glu Leu Asp
1 5 10

ES 2 530 971 T3

<211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 5 <220>
 <223> Péptido sintético p1TA
 <400> 9
 His Val Lys Gly Lys His Leu Cys Pro
 10 1 5
 <210> 10
 <211> 6
 <212> PRT
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido sintético del dominio de dimerización de CD28
 20 <400> 10
 His Val Lys Gly Lys His
 1 5
 <210> 11
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 25 <220>
 <223> Péptido sintético
 30 <400> 11
 Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala His Val Lys Gly Lys His Leu Cys Pro
 35 1 5 10 15
 <210> 12
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 40 <220>
 <223> Péptido sintético p2TA
 <400> 12
 45 Ser Pro Met Leu Val Ala Tyr Asp
 1 5
 <210> 13
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 50 <220>
 <223> Péptido sintético del dominio antagonista de TSST-1
 55 <400> 13
 Phe Asp Lys Lys Gln Leu Ala Ile Ser Thr Leu Asp
 1 5 10
 60 <210> 14
 <211> 9

ES 2 530 971 T3

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 5 <223> Péptido sintético p1TB

 <400> 14

 Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro
 1 5

 10
 <210> 15
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 15
 <220>
 <223> Péptido sintético p2TB

 <400> 15

 20
 Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser
 1 5

 <210> 16
 <211> 9
 25 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Péptido sintético p1TC
 30
 <400> 16

 Tyr Glu Ser Gln Leu Cys Cys Gln Leu
 1 5

 35
 <210> 17
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 40
 <220>
 <223> Péptido sintético p2TC

 <400> 17

 Gly Glu Ile Asn Gly Ser Ala Asn
 45 1 5

 <210> 18
 <211> 6
 <212> PRT
 50 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Péptido sintético de la interfase del dímero CTLA4

 <400> 18

 Tyr Val Ile Asp Pro Glu
 1 5

 <210> 19
 60 <211> 202

ES 2 530 971 T3

<212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 19

5

Asn Lys Ile Leu Val Lys Gln Ser Pro Met Leu Val Ala Tyr Asp Asn
 1 5 10 15
 Ala Val Asn Leu Ser Cys Lys Tyr Ser Tyr Asn Leu Phe Ser Arg Glu
 20 25 30
 Phe Arg Ala Ser Leu His Lys Gly Leu Asp Ser Ala Val Glu Val Cys
 35 40 45
 Val Val Tyr Gly Asn Tyr Ser Gln Gln Leu Gln Val Tyr Ser Lys Thr
 50 55 60
 Gly Phe Asn Cys Asp Gly Lys Leu Gly Asn Glu Ser Val Thr Phe Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Asn Leu Tyr Val Asn Gln Thr Asp Ile Tyr Phe Cys Lys Ile
 85 90 95
 Glu Val Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Leu Asp Asn Glu Lys Ser Asn Gly
 100 105 110
 Thr Ile Ile His Val Lys Gly Lys His Leu Cys Pro Ser Pro Leu Phe
 115 120 125
 Pro Gly Pro Ser Lys Pro Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val
 130 135 140
 Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp
 145 150 155 160
 Val Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met
 165 170 175
 Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala
 180 185 190
 Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser
 195 200

<210> 20
 <211> 188
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 20

10

15

Lys Ala Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg
 1 5 10 15
 Gly Ile Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Ala Thr

ES 2 530 971 T3

			20					25					30			
Glu	Val	Arg	Val	Thr	Val	Leu	Arg	Gln	Ala	Asp	Ser	Gln	Val	Thr	Glu	
		35					40					45				
Val	Cys	Ala	Ala	Thr	Tyr	Met	Met	Gly	Asn	Glu	Leu	Thr	Phe	Leu	Asp	
	50					55					60					
Asp	Ser	Ile	Cys	Thr	Gly	Thr	Ser	Ser	Gly	Asn	Gln	Val	Asn	Leu	Thr	
65					70					75					80	
Ile	Gln	Gly	Leu	Arg	Ala	Met	Asp	Thr	Gly	Leu	Tyr	Ile	Cys	Lys	Val	
				85					90					95		
Glu	Leu	Met	Tyr	Pro	Pro	Pro	Tyr	Tyr	Leu	Gly	Ile	Gly	Asn	Gly	Thr	
			100					105					110			
Gln	Ile	Tyr	Val	Ile	Asp	Pro	Glu	Pro	Cys	Pro	Asp	Ser	Asp	Phe	Leu	
		115					120					125				
Leu	Trp	Ile	Leu	Ala	Ala	Val	Ser	Ser	Gly	Leu	Phe	Phe	Tyr	Ser	Phe	
	130					135					140					
Leu	Leu	Thr	Ala	Val	Ser	Leu	Ser	Lys	Met	Leu	Lys	Lys	Arg	Ser	Pro	
145					150					155					160	
Leu	Thr	Thr	Gly	Val	Tyr	Val	Lys	Met	Pro	Pro	Thr	Glu	Pro	Glu	Cys	
				165					170					175		
Glu	Lys	Gln	Phe	Gln	Pro	Tyr	Phe	Ile	Pro	Ile	Asn					
			180					185								

<210> 21
 <211> 156
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<400> 21

Leu	Arg	Ile	Lys	Val	Leu	Thr	Gly	Glu	Ile	Asn	Gly	Ser	Ala	Asn	Tyr
1				5					10					15	
Glu	Met	Phe	Ile	Phe	His	Asn	Gly	Gly	Val	Gln	Ile	Leu	Cys	Lys	Tyr
			20					25					30		

10

ES 2 530 971 T3

Pro Asp Ile Val Gln Gln Phe Lys Met Gln Leu Leu Lys Gly Gly Gln
 35 40 45

Ile Leu Cys Asp Leu Thr Lys Thr Lys Gly Ser Gly Asn Thr Val Ser
 50 55 60

Ile Lys Ser Leu Lys Phe Cys His Ser Gln Leu Ser Asn Asn Ser Val
 65 70 75 80

Ser Phe Phe Leu Tyr Asn Leu Asp His Ser His Ala Asn Tyr Tyr Phe
 85 90 95

Cys Asn Leu Ser Ile Phe Asp Pro Pro Pro Phe Lys Val Thr Leu Thr
 100 105 110

Gly Gly Tyr Leu His Ile Tyr Glu Ser Gln Leu Cys Cys Gln Leu Lys
 115 120 125

Phe Trp Leu Pro Ile Gly Cys Ala Ala Phe Val Val Val Cys Ile Leu
 130 135 140

Gly Cys Ile Leu Ile Cys Trp Leu Thr Lys Lys Met
 145 150 155

5 <210> 22
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Péptido sintético del dominio de unión de B7
 <400> 22

Met Tyr Pro Pro Pro Tyr
 1 5

15 <210> 23
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Péptido sintético
 <400> 23

Val Val Leu Ala Ser Ser
 1 5

25 <210> 24
 <211> 6
 <212> PRT
 30 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Péptido sintético

ES 2 530 971 T3

<400> 24

Met Leu Val Ala Tyr Asp
1 5

5 <210> 25
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Péptido sintético pa2

<400> 25

Phe His Lys His Ser Pro Arg Ser Pro Ile Phe Ile
1 5 10

15 <210> 26
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Péptido sintético pb11

25 <400> 26

Ser Trp Pro His His His Arg Met Pro Leu Leu Ala
1 5 10

30 <210> 27
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> Péptido sintético pc11

<400> 27

Phe His Lys Thr Pro Arg Ile Ala Pro Pro Pro Leu
1 5 10

40 <210> 28
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Péptido sintético pf11

<400> 28

50 <210> 29
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

55 <220>
<223> Péptido sintético pg3

60 <400> 29

ES 2 530 971 T3

	His	Asn	Ser	Tyr	His	His	Gln	His	Lys	Pro	Thr	Ser
	1				5					10		
5	<210> 30 <211> 12 <212> PRT <213> Secuencia artificial											
10	<220> <223> Péptido sintético pb12 <400> 30											
	Tyr	His	Arg	Pro	His	Glu	His	Lys	Met	Phe	Gln	Pro
	1				5					10		
15	<210> 31 <211> 12 <212> PRT <213> Secuencia artificial											
20	<220> <223> Péptido sintético pa8.1 <400> 31											
	Ala	His	Lys	Ala	His	Lys	His	Met	Pro	Trp	Ile	Asn
	1				5					10		
25	<210> 32 <211> 12 <212> PRT <213> Secuencia artificial											
30	<220> <223> Péptido sintético pb3 <400> 32											
35	<210> 33 <211> 12 <212> PRT <213> Secuencia artificial											
40	<220> <223> Péptido sintético pb5 <400> 33											
	Ala	Pro	Trp	Thr	His	His	Ser	Lys	His	Ser	His	Pro
	1				5					10		
45	<210> 33 <211> 12 <212> PRT <213> Secuencia artificial											
50	<220> <223> Péptido sintético pb5 <400> 33											
	Lys	Pro	Phe	His	His	Asp	His	Ser	Lys	Gln	His	Gln
	1				5					10		
55	<210> 34 <211> 12 <212> PRT <213> Secuencia artificial											
60	<220> <223> Péptido sintético pb11 <400> 34											

ES 2 530 971 T3

Tyr Pro His Ile His Thr His Arg Pro Pro Val His
 1 5 10

5 <210> 40
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Péptido sintético pb3
 <400> 40

Ala Trp Asn Ser Pro His Gln His His His Arg Lys
 1 5 10

15 <210> 41
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Péptido sintético pb2
 <400> 41

Trp Pro Arg His His His Ser Gly Glu Leu Lys Thr
 1 5 10

25 <210> 42
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Péptido sintético pc2
 <400> 42

Ser His Trp His Ser Lys Leu Arg Tyr Phe Pro Pro
 1 5 10

40 <210> 43
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Péptido sintético pc8
 <400> 43

Leu Pro His His Lys His Arg Pro Asn Leu Pro Ser
 1 5 10

50 <210> 44
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> Péptido sintético pc9
 <400> 44

60

ES 2 530 971 T3

Phe His Lys His Asn Tyr Lys Ser Pro Pro Ile Ile
 1 5 10

5 <210> 45
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Péptido sintético pf12
 <400> 45

Trp Pro Met Lys His His His Leu Val Thr Ala Arg
 1 5 10

15 <210> 46
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Péptido sintético pc4
 <400> 46

His Ile Lys His Leu Ser His Trp Thr Pro Lys Pro
 1 5 10

25 <210> 47
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Péptido sintético pe11
 <400> 47

Ala His Arg His Gln His Gln His Pro His Ala Gln
 1 5 10

40 <210> 48
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Péptido sintético pb5
 <400> 48

Leu Pro Trp His Arg His Gly Pro Ala Pro Ser Phe
 1 5 10

50 <210> 49
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> Péptido sintético pe11
 <400> 49

60 Ala Pro Trp Ser His His His Gly Lys Leu Pro Arg
 1 5 10

ES 2 530 971 T3

<211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 5 <220>
 <223> Péptido sintético pd8
 <400> 55
 Thr His Pro His Leu His His Arg His Leu Ala Pro
 10 1 5 10
 <210> 56
 <211> 12
 <212> PRT
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido sintético pg6
 20 <400> 56
 Gly Lys Met His Leu His His Pro His Ser Gln Pro
 25 1 5 10
 <210> 57
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 30 <220>
 <223> Péptido sintético p1TD
 <400> 57
 Arg Val Thr Glu Arg Arg Ala Glu Val
 35 1 5
 <210> 58
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 40 <220>
 <223> Péptido sintético p2TD
 <400> 58
 45 Pro Ala Leu Leu Val Val Thr Glu
 1 5
 <210> 59
 <211> 255
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 50 <400> 59
 55 Pro Pro Thr Phe Phe Pro Ala Leu Leu Val Val Thr Glu Gly Asp Asn

REIVINDICACIONES

1.- Un péptido aislado y purificado que consiste en:

5 (a) un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es una interfase del dímero de un miembro de la ruta coestimulante de linfocitos T seleccionada de la interfase del dímero dentro de CD28 humano, CTLA4 humano, ICOS humano y PD-1 humano, estando dicha secuencia de aminoácido seleccionada de los
10 residuos de aminoácidos 10-15 o 116-121 de SEC ID N.º: 19, residuos de aminoácidos 10-15 o 115-120 de SEC ID N.º: 20, residuos de aminoácidos 10-15 o 119-124 de SEC ID N.º: 21, y residuos de aminoácidos 8-13 o 110-116 de SEC ID N.º: 59, en el que el péptido:

(i) es un péptido de la interfase del dímero de CD28 humano que consiste en la secuencia de aminoácidos HVKGGKHLCP como se indica por SEC ID N.º: 9 o la secuencia de aminoácidos SPMLVAYD como se indica por SEC ID N.º: 12;
15 (ii) es un péptido de la interfase del dímero de CTLA4 humano que consiste en la secuencia de aminoácidos YVIDPEPCP como se indica por SEC ID N.º: 14 o la secuencia de aminoácidos PAWLASS como se indica por SEC ID N.º: 15;
(iii) es un péptido de la interfase del dímero de ICOS humano que consiste en la secuencia de aminoácidos YESQLCCQL como se indica por SEC ID N.º: 16 o la secuencia de aminoácidos
20 GEINGSAN como se indica por SEC ID N.º: 17; o
(iv) es un péptido de la interfase del dímero de PD-1 humano que consiste en la secuencia de aminoácidos RVTERRAEV como se indica por SEC ID N.º: 57 o la secuencia de aminoácidos PALLWTE como se indica por SEC ID N.º: 58;

25 (b) un péptido que es al menos el 80 % homólogo al péptido de CD28 humano de SEC ID N.º: 9 o 12, en el que el péptido resultante de (b) mantiene la capacidad de inhibir la interacción entre un miembro de la ruta coestimulante de linfocitos T y un superantígeno;

(c) un péptido de (a) que tiene una inserción de un residuo de aminoácido, en el que el péptido resultante de (c) mantiene la capacidad de inhibir la interacción entre un miembro de la ruta coestimulante de linfocitos T y un superantígeno;
30 (d) un péptido de (a), (b) o (c) que está prolongado en el extremo N y/o el extremo C:

(i) por una lauril-cisteína en el extremo N y una cisteína en el extremo C; o
35 (ii) por un resto orgánico que no es un residuo de aminoácido que se produce naturalmente o sintético; o
(iii) por residuo(s) de aminoácido(s) hidrófobo(s) idéntico(s) que puede(n) ser residuo(s) de aminoácido(s) que se produce(n) naturalmente o sintético(s); o
(iv) por una cola de lisil-palmitoílo, en el que dicha cola está en el extremo N, en el que el péptido
40 resultante de (c) mantiene la capacidad de inhibir la interacción entre un miembro de la ruta coestimulante de linfocitos T y un superantígeno;

(e) un dímero o multímero de (a), (b), (c) o (d) en el que el péptido resultante de (e) mantiene la capacidad de inhibir la interacción entre un miembro de la ruta coestimulante de linfocitos T y un superantígeno.

45 2.- El péptido según la reivindicación 1, en el que dicho péptido aislado y purificado consiste en:

(a) un péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos que está seleccionada de la secuencia de aminoácidos HVKGGKHLCP como se indica por SEC ID N.º: 9 y la secuencia de aminoácidos SPMLVAYD como se indica por SEC ID N.º: 12;

50 (b) un péptido que es al menos el 80 % homólogo al péptido de (a), en el que el péptido resultante de (b) mantiene la capacidad de inhibir la interacción entre un miembro de la ruta coestimulante de linfocitos T y un superantígeno;

(c) un péptido de (a) o (b) que está prolongado en el extremo N y/o el extremo C:

55 (v) por una lauril-cisteína en el extremo N y una cisteína en el extremo C; o
(vi) por un resto orgánico que no es un residuo de aminoácido que se produce naturalmente o sintético; o

(vii) por residuo(s) de aminoácido(s) hidrófobo(s) idéntico(s) que puede(n) ser residuo(s) de aminoácido(s) que se produce(n) naturalmente o sintético(s); o

60 (viii) por una cola de lisil-palmitoílo, en el que dicha cola está en el extremo N, en el que el péptido resultante de (c) mantiene la capacidad de inhibir la interacción entre un miembro de la ruta coestimulante de linfocitos T y un superantígeno; o

65 (d) un dímero o multímero de (a), (b) o (c) en el que el péptido resultante de (d) mantiene la capacidad de inhibir la interacción entre un miembro de la ruta coestimulante de linfocitos T y un superantígeno.

3.- El péptido según la reivindicación 2, en el que dicho péptido se designa p1TA y tiene la secuencia de aminoácidos HVKGGKHLCP como se indica por SEC ID N.º: 9.

5 4.- El péptido según la reivindicación 2, en el que dicho péptido se designa p2TA y tiene la secuencia de aminoácidos SPMLVAYD como se indica por SEC ID N.º: 12.

5.- El péptido según la reivindicación 1, en el que dicho péptido aislado y purificado consiste en:

10 (a) un péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos que está seleccionada de una de la secuencia de aminoácidos YVIDPEPCP como se indica por SEC ID N.º: 14 y la secuencia de aminoácidos PAWLASS como se indica por SEC ID N.º: 15;

(b) un péptido de (a) que está prolongado en el extremo N y/o el extremo C:

15 (i) por lauril-cisteína en el extremo N y una cisteína en el extremo C; o
(ii) por un resto orgánico que no es un residuo de aminoácido que se produce naturalmente o sintético;
o

(iii) por residuo(s) de aminoácido(s) hidrófobo(s) idéntico(s) que puede(n) ser residuo(s) de aminoácido(s) que se produce(n) naturalmente o sintético(s); o

20 (iv) por una cola de lisil-palmitoílo, en el que dicha cola está en el extremo N, en el que el péptido resultante de (b) mantiene la capacidad de inhibir la interacción entre un miembro de la ruta coestimulante de linfocitos T y un superantígeno; o

(c) un dímero o multímero de (a) o (b), en el que el péptido resultante de (c) mantiene la capacidad de inhibir la interacción entre un miembro de la ruta coestimulante de linfocitos T y un superantígeno.

25 6.- El péptido según la reivindicación 5, en el que dicho péptido se designa p1TB y tiene la secuencia de aminoácidos YVIDPEPCP como se indica por SEC ID N.º: 14.

30 7.- El péptido según la reivindicación 5, en el que dicho péptido se designa p2TB y tiene la secuencia de aminoácidos PAVVLASS como se indica por SEC ID N.º: 15.

8.- El péptido según la reivindicación 1, en el que dicho péptido aislado y purificado consiste en:

35 (a) péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos que está seleccionada de la secuencia de aminoácidos YESQLCCQL como se indica por SEC ID N.º: 16 y la secuencia de aminoácidos GEINGSAN como se indica por SEC ID N.º: 17;

(b) un péptido de (a) o (b) que está prolongado en el extremo N y/o el extremo C:

40 (i) por lauril-cisteína en el extremo N y una cisteína en el extremo C; o
(ii) por un resto orgánico que no es un residuo de aminoácido que se produce naturalmente o sintético;
o

(iii) por residuo(s) de aminoácido(s) hidrófobo(s) idéntico(s) que puede(n) ser residuo(s) de aminoácido(s) que se produce(n) naturalmente o sintético(s); o

45 (iv) por una cola de lisil-palmitoílo, en el que dicha cola está en el extremo N, en el que el péptido resultante de (b) mantiene la capacidad de inhibir la interacción entre un miembro de la ruta coestimulante de linfocitos T y un superantígeno; o

(c) un dímero o multímero de (a) o (b), en el que el péptido resultante de (c) mantiene la capacidad de inhibir la interacción entre un miembro de la ruta coestimulante de linfocitos T y un superantígeno.

50 9.- El péptido según la reivindicación 8, en el que dicho péptido se designa p1TC y tiene la secuencia de aminoácidos YESQLCCQL como se indica por SEC ID N.º: 16.

55 10.- El péptido según la reivindicación 8, en el que dicho péptido se designa p2TC y tiene la secuencia de aminoácidos GEINGSAN, como se indica por SEC ID N.º: 17.

11.- El péptido según la reivindicación 1, en el que dicho péptido aislado y purificado consiste en:

60 (a) un péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos que está seleccionada de la secuencia de aminoácidos RVTERRAEV como se indica por SEC ID N.º: 57 y la secuencia de aminoácidos PALLWTE como se indica por SEC ID N.º: 58;

(b) un péptido de (a) que está prolongado en el extremo N y/o el extremo C:

65 (i) por lauril-cisteína en el extremo N y una cisteína en el extremo C; o
(ii) por un resto orgánico que no es un residuo de aminoácido que se produce naturalmente o sintético;
o

- (iii) por residuo(s) de aminoácido(s) hidrófobo(s) idéntico(s) que puede(n) ser residuo(s) de aminoácido(s) que se produce(n) naturalmente o sintético(s); o
 (iv) por una cola de lisil-palmitoílo, en el que dicha cola está en el extremo N, en el que el péptido resultante de (b) mantiene la capacidad de inhibir la interacción entre un miembro de la ruta coestimulante de linfocitos T y un superantígeno; o
- 5 (c) un dímero o multímero de (a) o (b), en el que el péptido resultante de (c) mantiene la capacidad de inhibir la interacción entre un miembro de la ruta coestimulante de linfocitos T y un superantígeno.
- 10 12.- El péptido según la reivindicación 11, en el que dicho péptido se designa p1TD y tiene la secuencia de aminoácidos RVTERRAEV como se indica por SEC ID N.º: 57.
- 13.- El péptido según la reivindicación 11, en el que dicho péptido se designa p2TD y tiene la secuencia de aminoácidos PALLWTE, como se indica por SEC ID N.º: 58.
- 15 14.- El péptido según la reivindicación 1, en el que dicho péptido se prolonga en el extremo N y/o extremo C del mismo con D-alanina.
- 20 15.- El péptido según la reivindicación 1, en el que el péptido es como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 3, 4, 6, 7, 9, 10, 12 o 13 y está limitado con residuo(s) de D-Ala en el extremo N y/o extremo C del mismo.
- 25 16.- El péptido según la reivindicación 15, en el que el péptido tiene la secuencia de aminoácidos definida en la reivindicación 3 de SPMLVAYD, como se indica por SEC ID N.º: 12, que está limitado con un residuo de D-Ala en el extremo N y/o extremo C del mismo.
- 30 17.- El péptido según la reivindicación 16, en el que el péptido tiene la secuencia de aminoácidos definida en la reivindicación 3 de SPMLVAYD, como se indica por SEC ID N.º: 12, que está limitado con un residuo de D-Ala en el extremo N y extremo C del mismo.
- 35 18.- El péptido según la reivindicación 1, en el que el péptido es como se designa en el presente documento p2TA, que comprende la secuencia de aminoácidos SPMLVAYD como se indica por SEC ID N.º: 12, en el que dicho péptido se prolonga en el extremo N y/o extremo C del mismo con D-alanina.
- 40 19.- Una composición que comprende como principio activo un péptido purificado como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18 o cualquier combinación de las mismas y opcionalmente que comprende además vehículo, diluyente, adyuvante y/o excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 45 20.- La composición según la reivindicación 19, para su uso en un procedimiento de tratamiento de un trastorno inmunitario relacionado con un desequilibrio en la respuesta de Th1-Th2 en un sujeto en necesidad del mismo, en el que dicho trastorno inmunitario es uno cualquiera de una enfermedad autoinmunitaria, trastorno proliferativo maligno o no maligno, patología de rechazo del injerto, y un trastorno inducido por una exotoxina pirógena o por una mezcla de al menos dos exotoxinas pirógenas seleccionadas de choque tóxico e incapacitación o para su uso en un procedimiento de prevención de muerte inducida por una exotoxina pirógena o por una mezcla de al menos dos exotoxinas pirógenas.
- 50 21.- La composición para su uso en un procedimiento de tratamiento según la reivindicación 20, en el que dicha exotoxina pirógena es un superantígeno de un patógeno bacteriano seleccionado del grupo que consiste en *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pyogenes*.
- 55 22.- La composición para su uso en un procedimiento de tratamiento según la reivindicación 21, en el que el procedimiento protege contra choque tóxico inducido por una exotoxina pirógena o por una mezcla de exotoxinas pirógenas.
- 60 23.- La composición según la reivindicación 19, en el que dicho péptido comprende una secuencia de aminoácidos como se indica por una cualquiera de p1TA (como se indica por SEC ID N.º: 9), p2TA (como se indica por SEC ID N.º: 12), p1TB (como se indica por SEC ID N.º: 14), p2TB (como se indica por SEC ID N.º: 15), p1TC (como se indica por SEC ID N.º: 16), p2TC (como se indica por SEC ID N.º: 17), p1TD (como se indica por SEC ID N.º: 57), p2TD (como se indica por SEC ID N.º: 58) y cualquier combinación de los mismos.
- 65 24.- La composición según la reivindicación 19, en la que dicho péptido se prolonga en el extremo N y/o extremo C del mismo con D-alanina.
- 25.- Uso de un péptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18 para la preparación de una composición para su uso en el tratamiento de trastornos inmunitarios relacionados con un desequilibrio en la respuesta de Th1-Th2 en un sujeto en necesidad del mismo, en el que dicho trastorno inmunitario es uno cualquiera de una

enfermedad autoinmunitaria, trastorno proliferativo maligno o no maligno, patología de rechazo del injerto, y un trastorno inducido por una exotoxina pirógena o por una mezcla de al menos dos exotoxinas pirógenas seleccionadas de choque tóxico e incapacitación o para su uso en un procedimiento de prevención de muerte inducida por una exotoxina pirógena o por una mezcla de al menos dos exotoxinas pirógenas.

5 26.- El uso según la reivindicación 25, en el que dicho péptido es como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18 o cualquier combinación de las mismas.

10 27.- El uso según la reivindicación 26, en el que preferentemente dicho péptido está seleccionado del grupo que consiste en *pTA* (como se indica por SEC ID N.º: 11), *p1TA* (como se indica por SEC ID N.º: 9), *p2TA* (como se indica por SEC ID N.º: 12), *p1TB* (como se indica por SEC ID N.º: 14), *p2TB* (como se indica por SEC ID N.º: 15), *p1TC* (como se indica por SEC ID N.º: 16), *p2TC* (como se indica por SEC ID N.º: 17), *p1TD* (como se indica por SEC ID N.º: 57), *p2TD* (como se indica por SEC ID N.º: 58) y cualquier combinación de los mismos.

15 28.- El uso según la reivindicación 25 o 26, en el que dicho péptido se prolonga en el extremo N y/o extremo C del mismo con D-alanina.

20 29.- Un procedimiento de cribado para una sustancia de prueba que se une específicamente a un miembro de la ruta coestimulante de linfocitos T y así inhibe la activación de linfocitos T mediada por un agente patógeno, procedimiento de cribado que comprende las etapas de:

(a) obtener sustancias antagonistas candidatas que se unen a un miembro de la ruta coestimulante de linfocitos T;

25 (b) seleccionar de las sustancias obtenidas en la etapa (a) una sustancia que inhibe la interacción directa entre dicho miembro de la ruta coestimulante de linfocitos T y dicho agente patógeno o un componente derivado de dicho agente, preferentemente dicho componente es un superantígeno; y

(c) determinar el efecto inhibitorio de la sustancia obtenida en la etapa (b) sobre la activación mediada por superantígenos de linfocitos T, preferentemente linfocitos Th1, en el que dicha sustancia antagonista candidata se obtiene por las etapas de:

30 (i) proporcionar una mezcla que comprende un péptido aislado como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18;

(ii) poner en contacto dicha mezcla con dicha sustancia de prueba bajo condiciones adecuadas para dicha unión; y

35 (iii) determinar el efecto de la sustancia de prueba basándose en una indicación del punto final, por lo que la modulación de dicho punto final es indicativa de la unión de dicha sustancia de prueba a dicho péptido.

40 30.- El procedimiento de cribado según la reivindicación 29, en el que dicha sustancia antagonista candidata se evalúa mediante un procedimiento de determinación de la capacidad de dicha sustancia para inhibir la activación de linfocitos T por un agente patógeno.

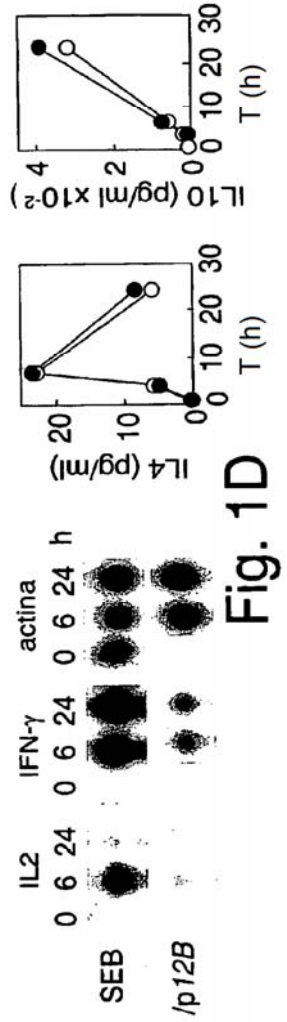
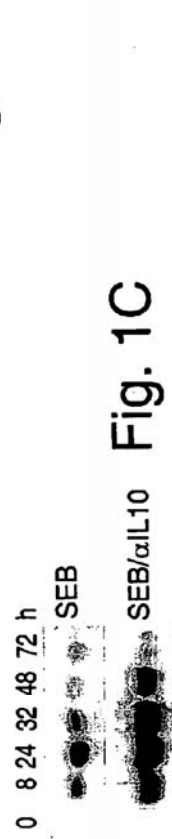
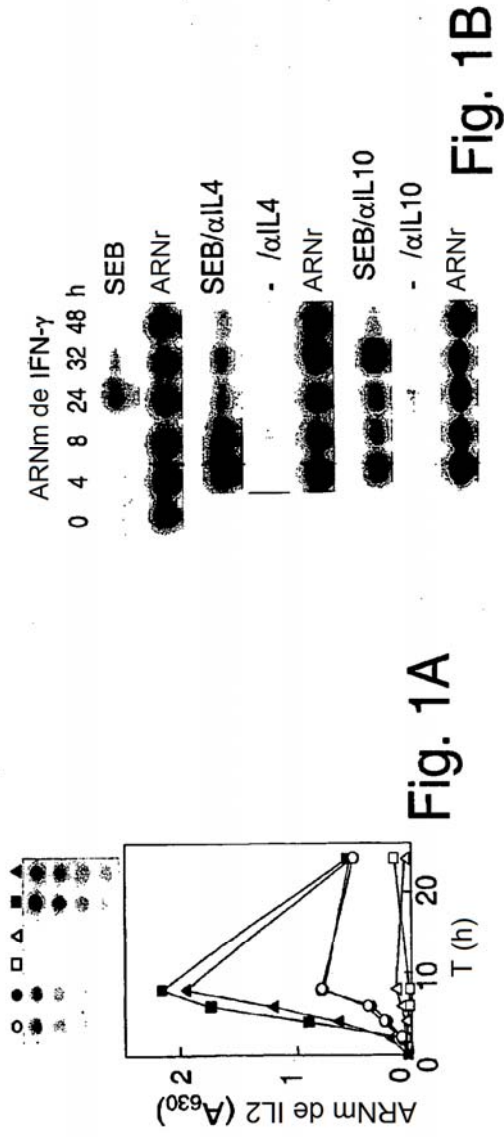




Fig. 1E

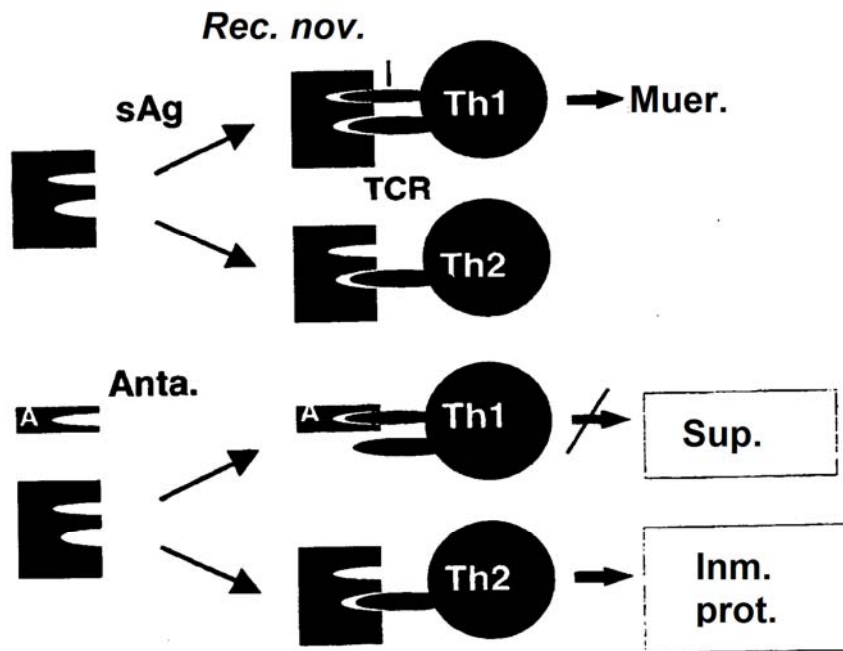


Fig. 1F

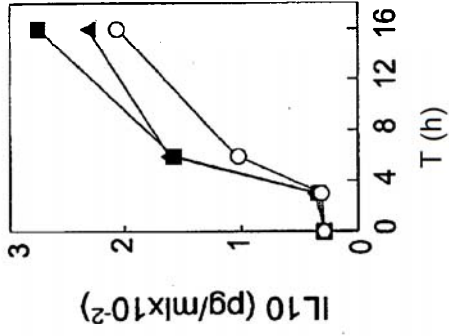


Fig. 2C

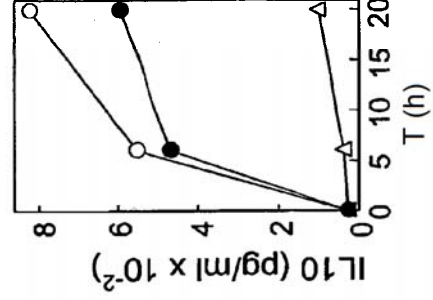


Fig. 2E

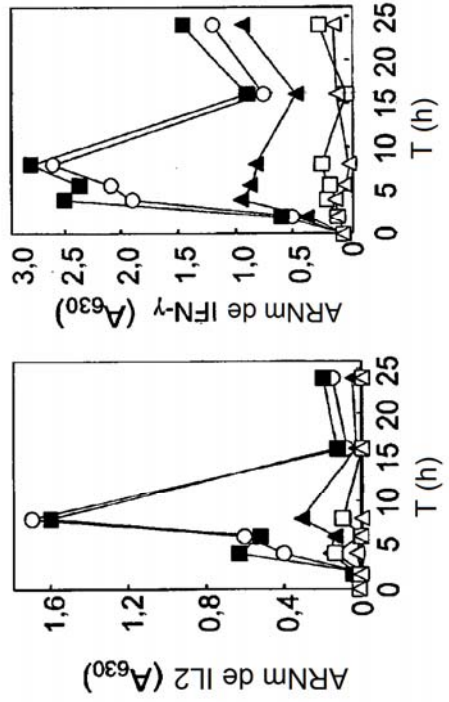


Fig. 2A

Fig. 2B

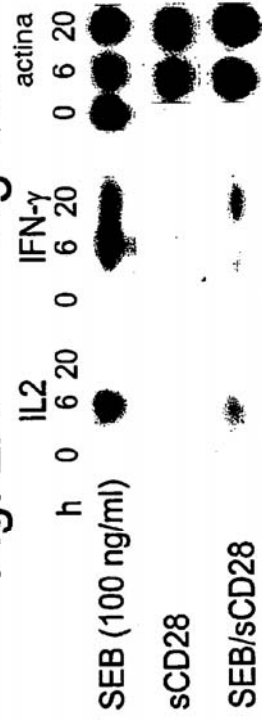


Fig. 2D

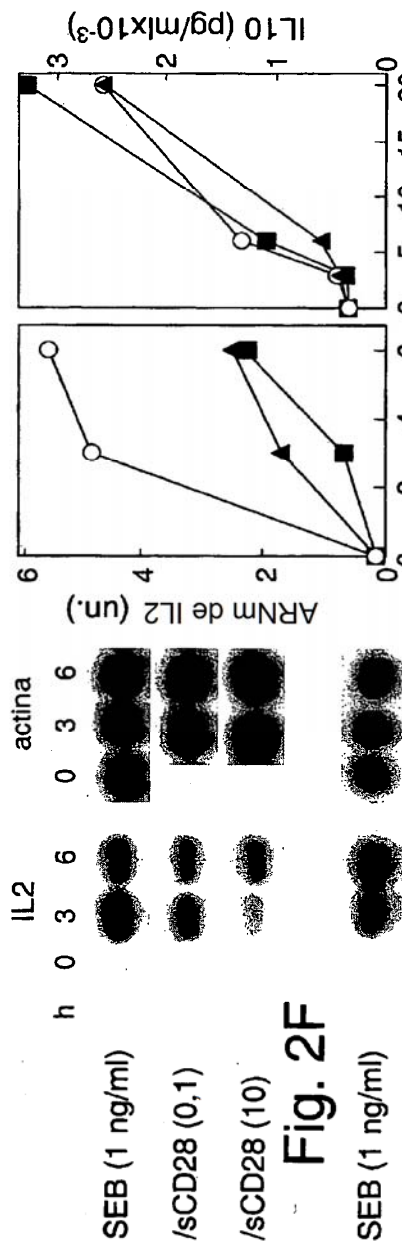


Fig. 2I

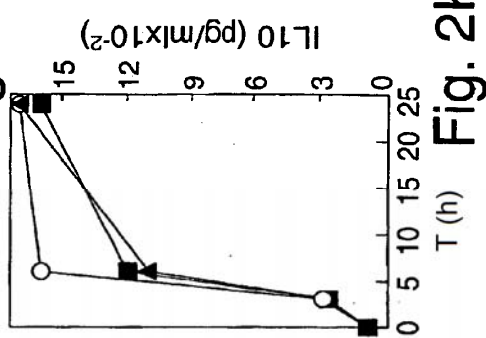


Fig. 2K

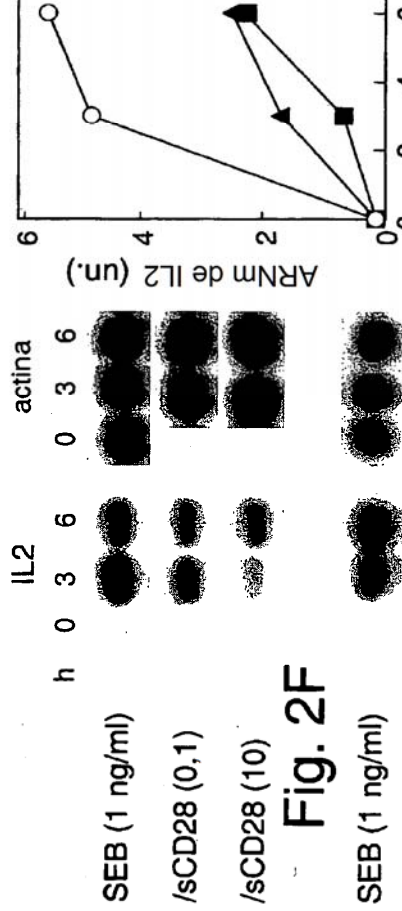


Fig. 2H

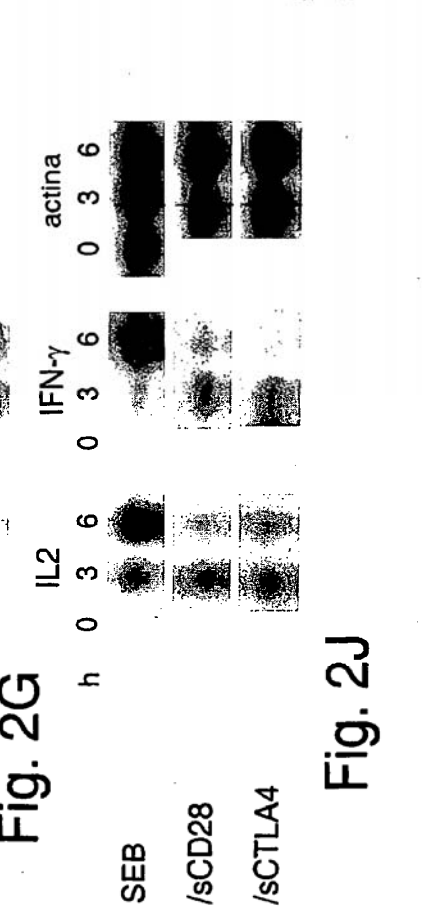
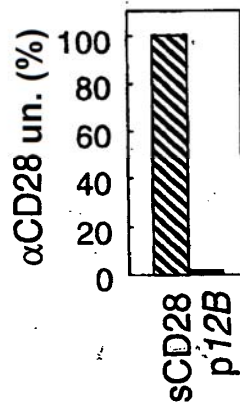
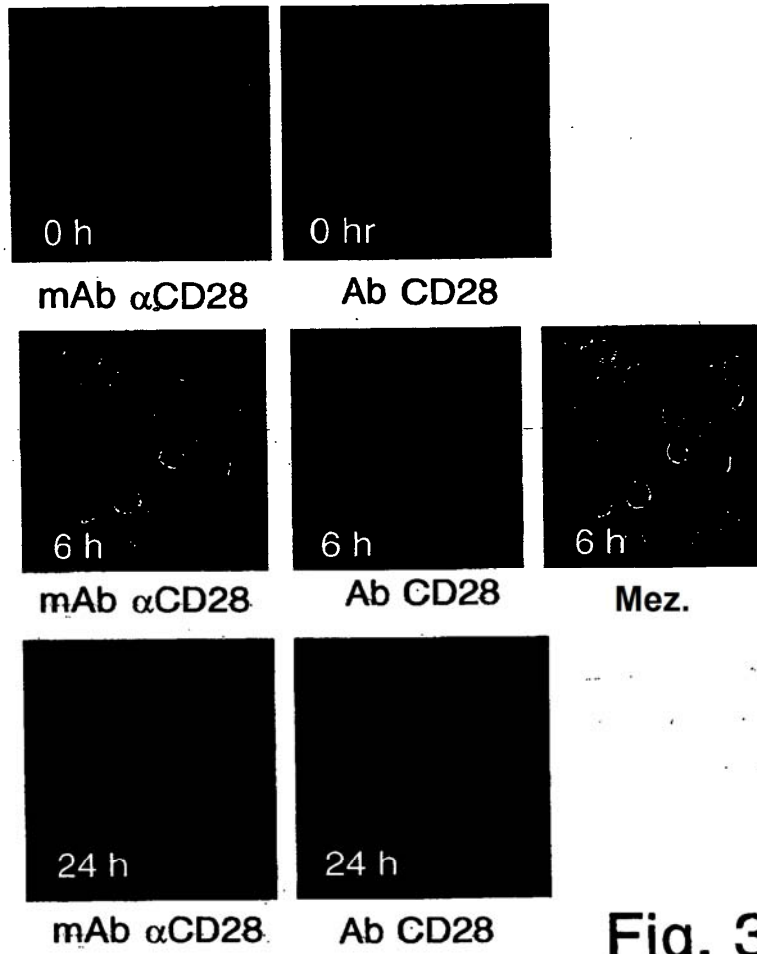


Fig. 2J



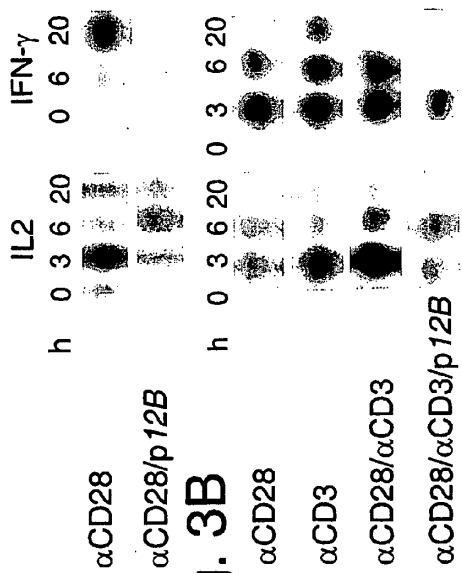


Fig. 3B

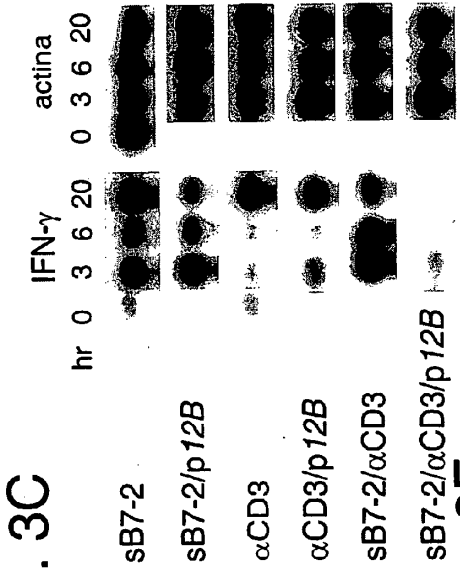


Fig. 3F

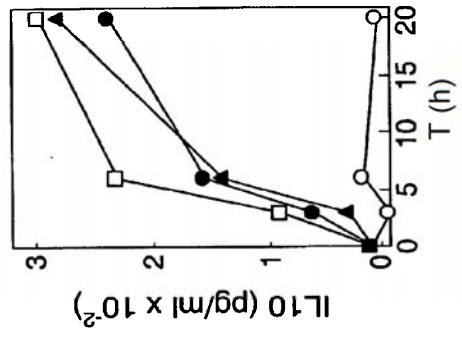


Fig. 3D

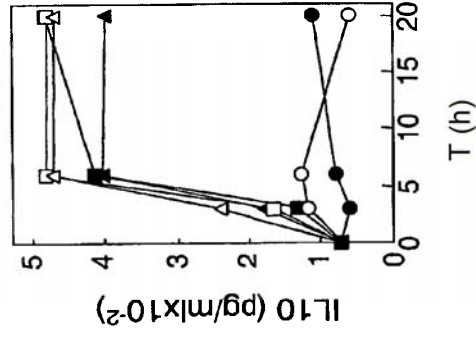


Fig. 3G

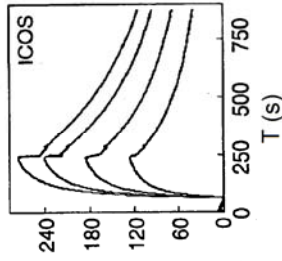


Fig. 4C

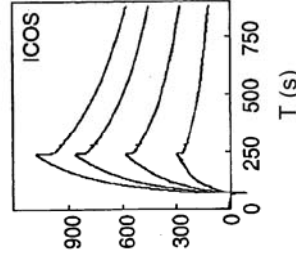


Fig. 4F

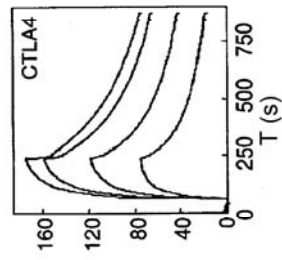


Fig. 4B

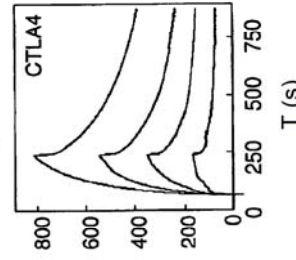


Fig. 4E

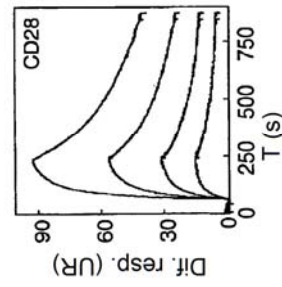


Fig. 4A

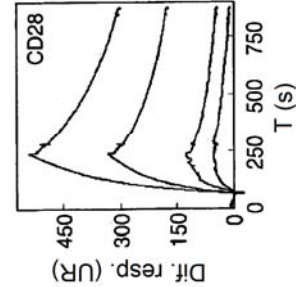


Fig. 4D

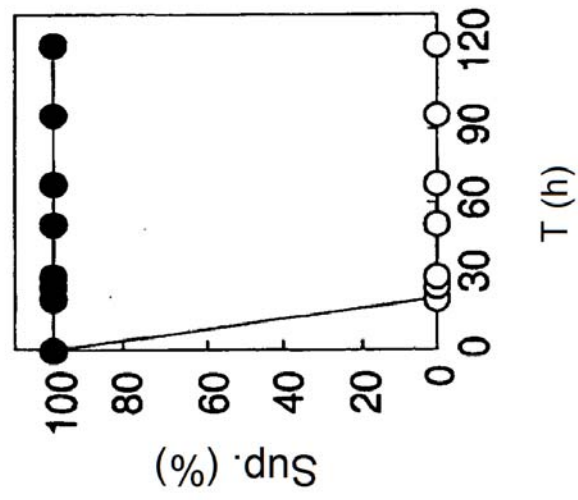
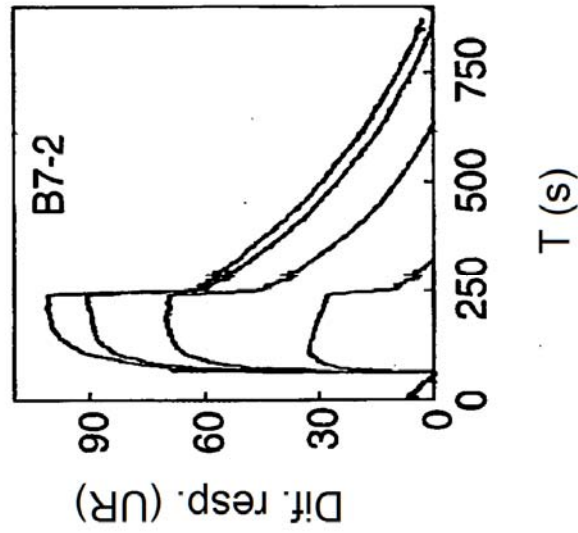
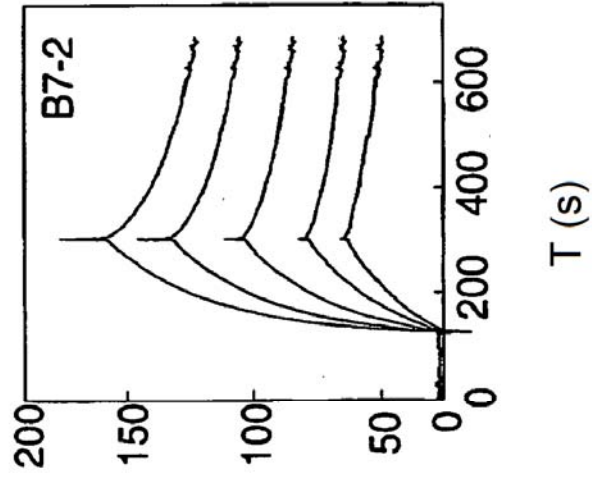


Fig. 4I

Fig. 4H

Fig. 4G

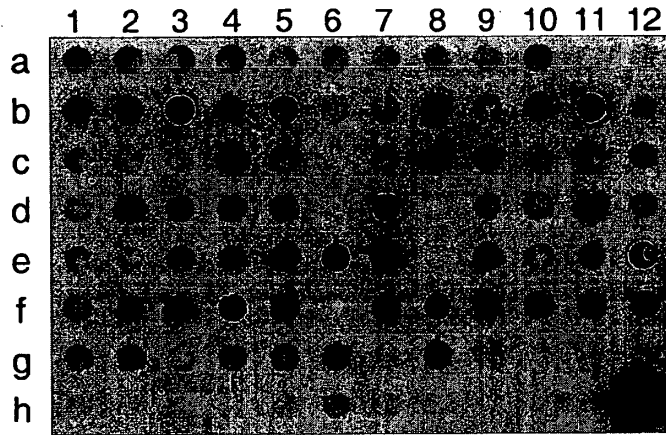


Fig. 5A

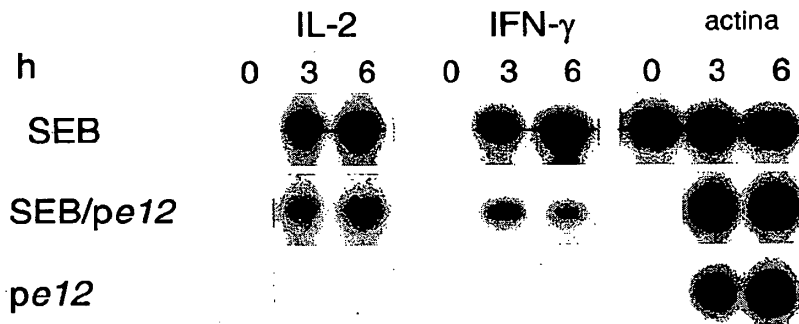


Fig. 5B

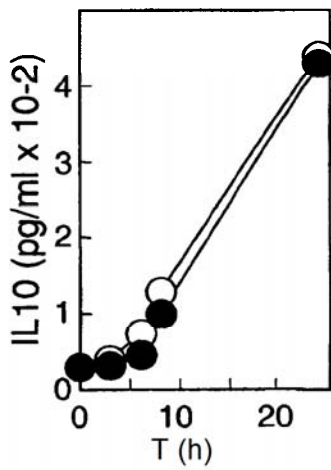


Fig. 5C

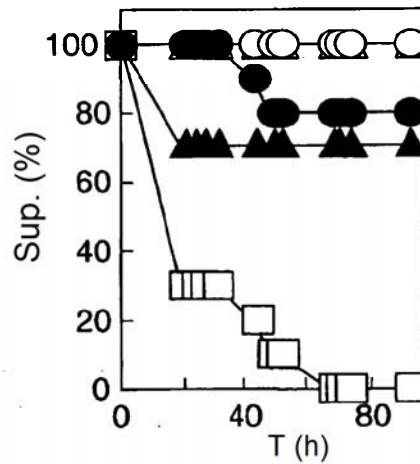


Fig. 5D

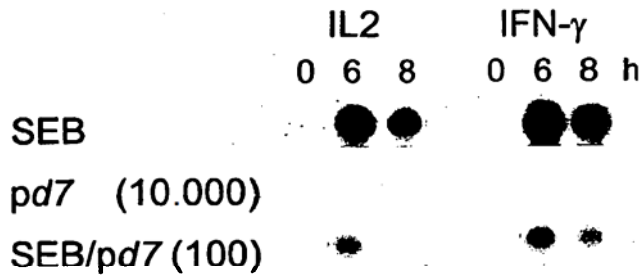


Fig. 5E

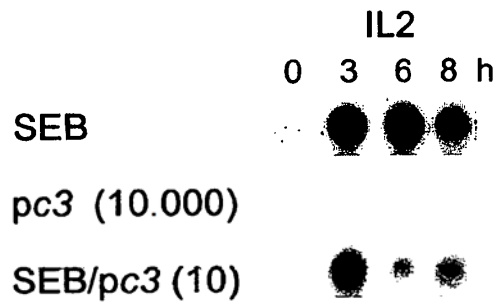


Fig. 5F

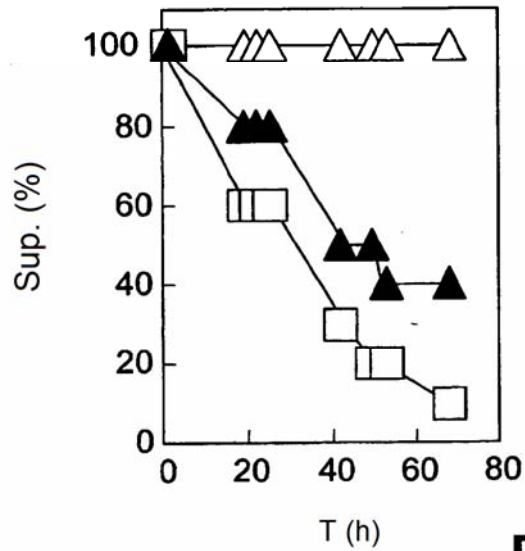
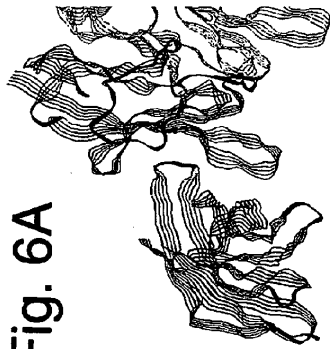


Fig. 5G

Fig. 6A



1 8 15
 hCD28 NKILVQSP L I NAVN-LSCKISYNLFSRFRASLHKGLDSAV-EVCVYGNYSQQLQVYSK
 mCD28 NKILVQSP L I D NEVS-LSCRISYNLLAKEFRASLYKGVNSDV-EVCVGNFTYQOQFRSN
 hCTLA4 KAMHVAQPA V S RGIASFVCEIASPGKATEVRVTVLROADSQVTEVCAATYMMGNELTELDD
 mCTLA4 EAIQVTQPS V S HGVASFPCEXSPSHNTDSEVRVTVLRQNDQMTVEVCATTFTEKNTVGVGLDY
 97 105 116 124
 hCD28 TGFNCDGKLGNESTVFLQNLVYVQNDIYFCCKLEVMKPPFLLDNEKSHGTLI LCPSPFL
 mCD28 AEFNCDGDFDNEITVFRMLNHLVNHDIYFCCKLEFMKPPFLLDNEKSHGTLI LCHTQS
 hCTLA4 S--ICTGTSSGNQVNLTIQELRAMDTGLIYICRVELMPPFLLYLG-IGHGKQI LCPDSD
 mCTLA4 P--FCSTGFNESTRVNLTIQELRAVDTGLIYICRVELMPPFLLYLG-MGHGKQI LCPDSD

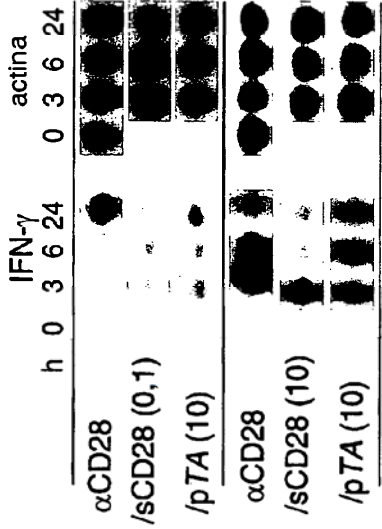


Fig. 6B

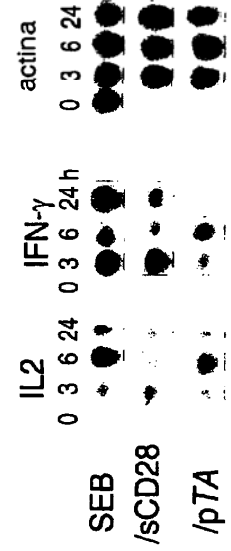


Fig. 6C

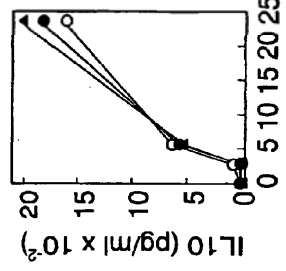


Fig. 6D

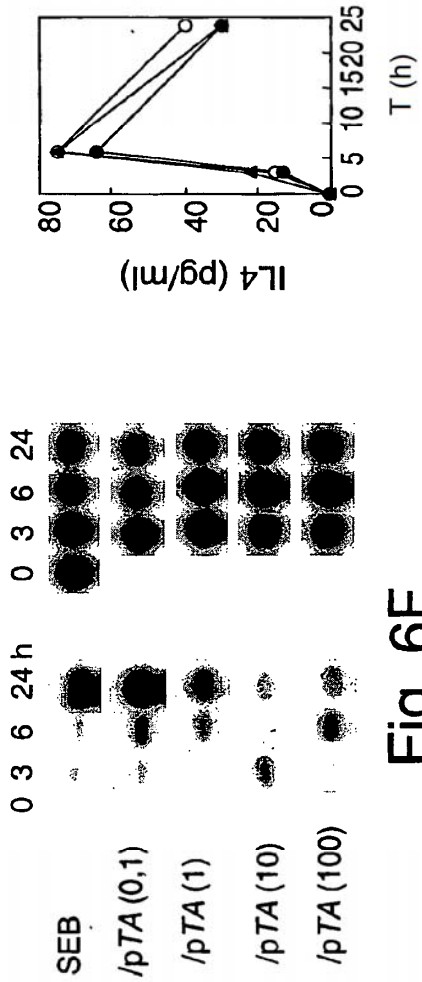
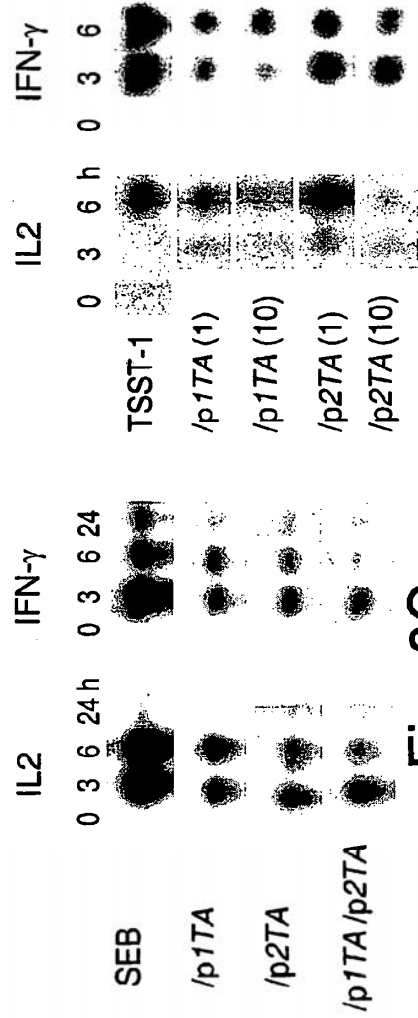


Fig. 6E



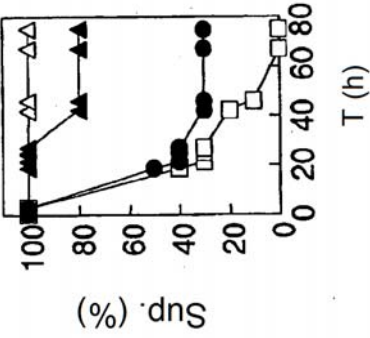


Fig. 7C

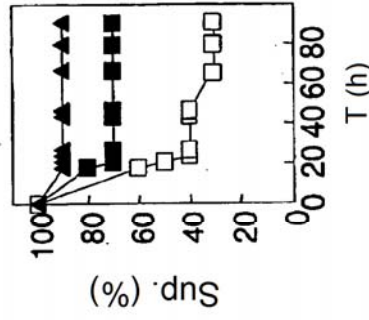


Fig. 7F

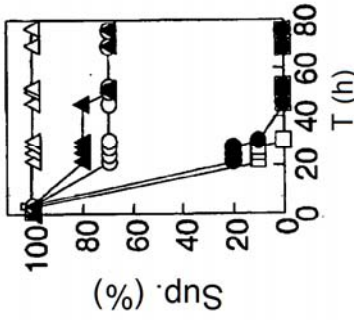


Fig. 7B

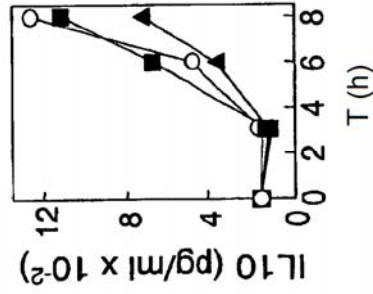


Fig. 7E

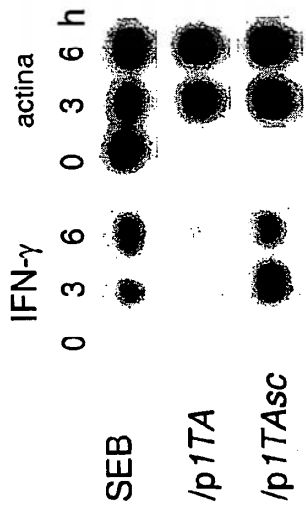


Fig. 7A

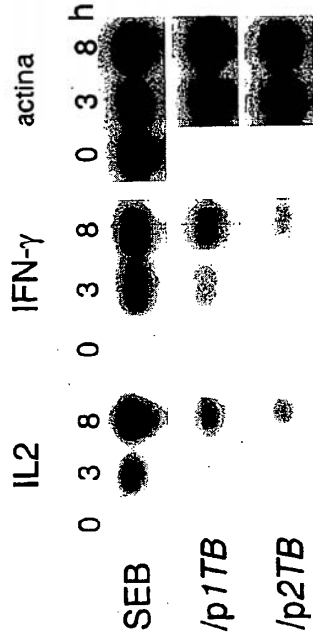


Fig. 7D

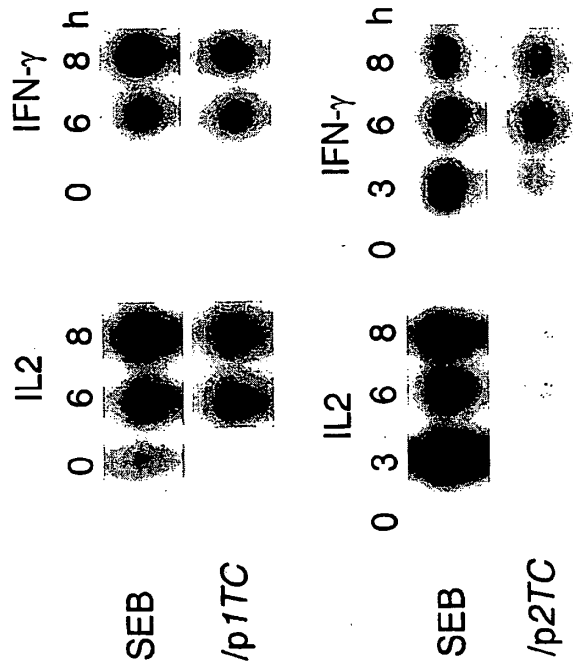


Fig. 7G

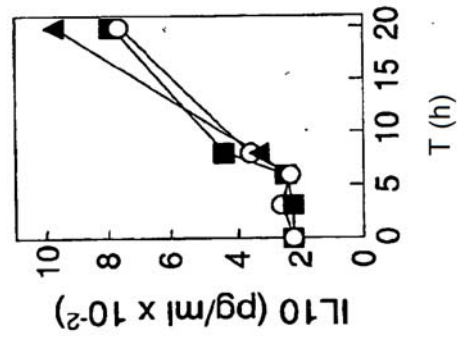


Fig. 7H

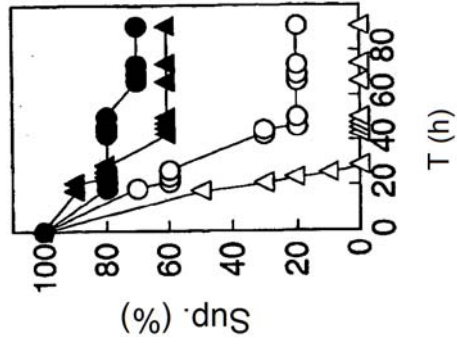


Fig. 7I

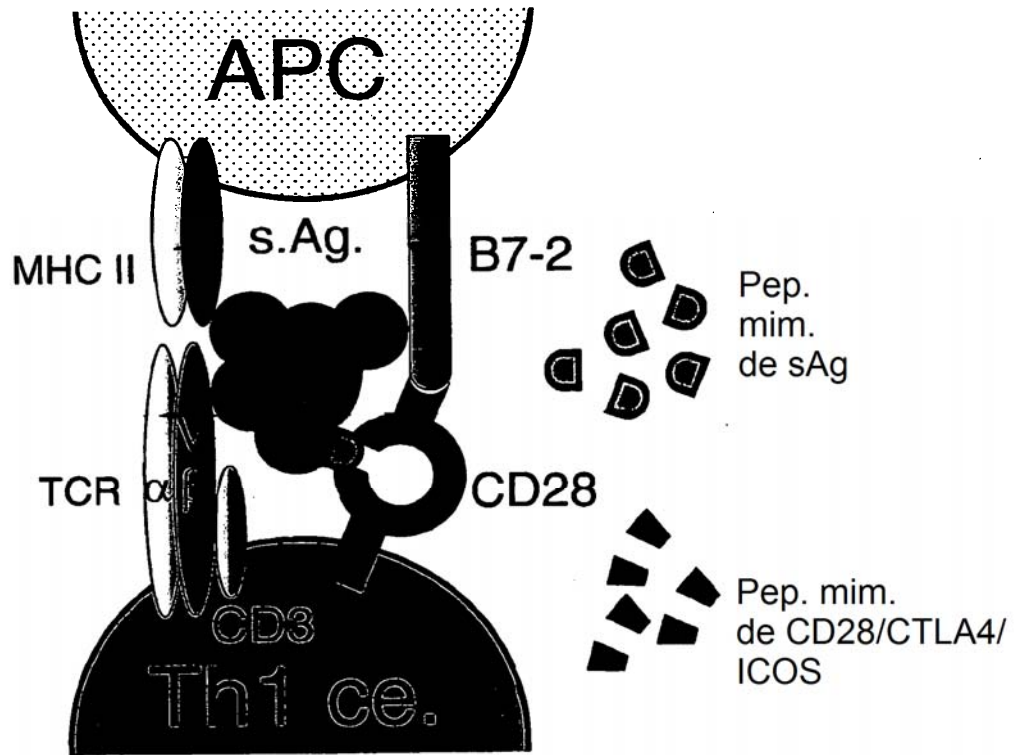


Fig. 7J