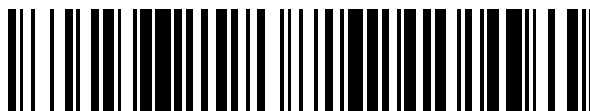


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 778 053**

51 Int. Cl.:

C07K 14/54 (2006.01)
A61K 38/20 (2006.01)
A61P 35/02 (2006.01)
A61P 17/00 (2006.01)
A61P 11/00 (2006.01)
A61P 3/10 (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01)
A61Q 19/00 (2006.01)
A61Q 5/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.01.2012** **PCT/US2012/021566**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.07.2012** **WO12099886**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.01.2012** **E 12736203 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.12.2019** **EP 2665486**

54 Título: **Composiciones para modular la actividad de la citocina γ -c**

30 Prioridad:

18.01.2011 US 201161433890 P
24.08.2011 US 201161527049 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
07.08.2020

73 Titular/es:

BIONIZ, LLC (100.0%)
20914 Bake Parkway, Suite 110
Lake Forest, CA 92630, US

72 Inventor/es:

TAGAYA, YUTAKA y
AZIMI, NAZLI

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 778 053 T3

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

DESCRIPCIÓN

Composiciones para modular la actividad de la citocina γ -c

5 Campo de la invención

Las presentes realizaciones se refieren a antagonistas peptídicos de las citocinas de la familia γ c, un grupo de citocinas de mamíferos que se producen principalmente por células epiteliales, estromales e inmunes y controlan la activación normal y patológica de una amplia gama de linfocitos. Las presentes realizaciones también se refieren a los usos terapéuticos de tales péptidos para el tratamiento de ciertas enfermedades humanas. Las presentes realizaciones también se refieren a las aplicaciones cosmeceúticas de tales péptidos. Se describe la descripción de enfermedades diana, aplicaciones cosmeceúticas, así como métodos de administración, producción y comercialización de los péptidos.

15 Antecedentes

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

Se han identificado más de 100 citocinas hasta el momento y se considera que se han desarrollado mediante duplicaciones de genes de un conjunto de genes primordiales (véase Bazan, J. F. 1990, Immunol. Today 11: 350-354). En apoyo de este punto de vista, es común que un grupo de citoquinas comparta un componente en su sistema receptor de múltiples subunidades. La subunidad de citocina compartida mejor documentada en las células T es la subunidad común γ (subunidad γ c). La subunidad γ es compartida por 6 citocinas conocidas (Interleucina-2 (IL-2), Interleucina-4 (IL-4), Interleucina-7 (IL-7), Interleucina-9 (IL-9), Interleucina-15 (IL -15) e Interleucina-21 (IL-21), denominadas colectivamente "citocinas γ c" o "citocinas de la familia γ c") y desempeña un papel indispensable en la transducción de señales de activación celular para todas estas citocinas. Además, para cada una de las citocinas γ c, existen una o dos subunidades propias de receptores específicos de citocinas que, cuando forman complejos con la subunidad γ c, dan lugar a un receptor completamente funcional. (véase Rochman et al., 2009, Nat Rev Immunol. 9: 480-90.)

Las citocinas de la familia γ c son un grupo de citocinas de mamíferos que se producen principalmente por células epiteliales, estromales e inmunes y controlan la activación normal y patológica de una amplia gama de linfocitos. Estas citocinas son críticamente necesarias para el desarrollo temprano de las células T en el timo, así como su homeostasis en la periferia. Por ejemplo, en ausencia de la subunidad γ c, las células T, B y NK no se desarrollan en ratones. (véase Sugamura et al., 1996, Annu. Rev. Immunol. 14: 179-205).

40 Patologías asociadas a las citocinas γ c

Estudios recientes han indicado que la desregulación de la expresión y la disfunción de las citocinas γ c podrían conducir a una amplia variedad de enfermedades inmunológicas y hematopoyéticas humanas.

45 IL-2

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

60 IL-4

La IL-4 es una citocina no redundante implicada en la diferenciación de células T auxiliares en el subconjunto Th2 (T-auxiliar tipo 2), que promueve la diferenciación de células B prematuras en células plasmáticas productoras de IgE. Los niveles de IgE están elevados en el asma alérgica. Por lo tanto, IL-4 está implicada en el desarrollo de asma alérgica. Los anticuerpos dirigidos a IL-4 pueden usarse para tratar o incluso prevenir la aparición de asma alérgica. (véase Le Buanec et al., 2007, Vaccine 25: 7206-16.)

IL-7

La IL-7 es esencial para el desarrollo de células B y el desarrollo temprano de células T en el timo. En ratones, la expresión anormal de IL-7 causa leucemia asociada a células T. (véase Fisher et al., 1993, *Leukemia* 2: S66-68.) Sin embargo, en humanos, la regulación errónea de IL-7 no parece causar leucemia asociada a células T. En humanos, la regulación por incremento de IL-7 sola o en combinación con otro miembro de la familia de las citocinas γc , IL-15, se ha implicado en la leucemia de linfocitos granulares grandes (LGL).

IL-9

El papel de IL-9 aún no está caracterizado en comparación con otros miembros de la familia de citoquinas γc . Los ratones desprovistos del gen IL-9 parecen normales y no carecen de subconjuntos de células en los compartimientos linfoides y hematopoyéticos. Sin embargo, estudios recientes revelan un papel in vivo para IL-9 en la generación de células Th17 (ayudantes T inducidas por interleucina-17) (véase Littman et al., 2010, *Cell* 140 (6): 845-58; y Nowak et al., 2009, *J. Exp. Med.* 206: 1653-60).

IL-15

La IL-15 participa de manera crítica en el desarrollo de células NK, células NK-T, algunos subconjuntos de linfocitos intraepiteliales (IEL), células $\gamma\delta$ -T y células T CD8 con fenotipo de memoria (véase Waldmann, 2007, *J. Clin. Immunol.* 27: 1-18; y Tagaya et al., 1996, *EMBO J.* 15: 4928-39.) La sobreexpresión de IL-15 en ratones conduce al desarrollo de leucemia celular tipo T de células NK-T y CD8 (véase Fehniger et al., 2001, *J. Exp. Med.* 193: 219-31; Sato et al. 2011 *Blood* en prensa). Estas leucemias inducidas experimentalmente parecen similares a la leucemia LGL (linfocito granular grande) en humanos, ya que en ambos casos las células leucémicas expresan el antígeno CD8.

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

Además de la transformación leucémica, estudios recientes implican a la IL-15 en el desarrollo patológico de la enfermedad celíaca (EC), una enfermedad autoinmune. Se sabe que IL-15 estimula la diferenciación de NK, CD8 y células de linfocitos intraepiteliales intestinales (LIE) en células asesinas activadas por linfocinas (LAK) al inducir la expresión de enzimas citolíticas (es decir, Granzyme y Perforina) así como interferón- γ . La enfermedad celíaca (que se denomina EC en el presente documento) es una enteropatía inmunomediada que se desencadena por el consumo de alimentos que contienen gluten en individuos que expresan alelos HLA-DQ específicos. La prevalencia de esta enfermedad es del 1% en la población occidental. El único tratamiento actual para la EC es la eliminación completa del gluten de la dieta del paciente. La patología de la EC está causada principalmente por un daño extenso a la mucosa intestinal, que es causada por las células T CD8 activadas que se han infiltrado en la lámina propia intestinal. Estas células T CD8 parecen activarse a través de mecanismos que involucran IL-15. Una publicación reciente demostró en ratones que la sobreexpresión ectópica de IL-15 por enterocitos conduce al desarrollo de enteropatía, que se parece mucho a las lesiones en pacientes con EC. La neutralización de la actividad de IL-15 disminuyó drásticamente los cambios patológicos. Por lo tanto, una intervención que bloquea la activación de las células T CD8 por IL-15 parece proporcionar una estrategia alternativa en el manejo de la EC a la dieta libre de gluten convencional.

IL-21

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

Estrategias actuales para tratar los trastornos mediados por citocinas γc

Como se cree que las citocinas γc están implicadas en numerosas enfermedades humanas, se han propuesto varios métodos para tratar enfermedades implicadas en citocinas γc mediante la inhibición de las actividades de la familia de las citocinas γc . Estos métodos incluyen el uso de anticuerpos monoclonales específicos de citocina para neutralizar la actividad de la citocina dirigida in vivo; uso de anticuerpos monoclonales dirigidos a las subunidades privadas del receptor específico de citocina (subunidades distintas de la subunidad γc compartida) para inhibir selectivamente la actividad de citocina; y el uso de inhibidores químicos que bloquean la vía de transducción de señales de citocinas intracelulares corriente abajo. Mientras que los anticuerpos específicos de citocina son a menudo la primera opción en el diseño de terapias, las citocinas que comparten componentes del receptor muestran funciones superpuestas

(véase Paul, WE, 1989, Cell 57: 521-24) y más de una citocina puede cooperar para causar una enfermedad (véase ejemplo descrito a continuación). Por lo tanto, los enfoques que implican la neutralización de una sola citocina pueden no ser efectivos en el tratamiento de enfermedades humanas con citocinas implicadas.

Se han propuesto estrategias para diseñar terapias que inhiben la función de múltiples citocinas a través de anticuerpos que reconocen un componente del receptor compartido. Sin embargo, la naturaleza de múltiples subunidades de los sistemas de receptores de citocinas y el hecho de que los receptores funcionales para una sola citocina pueden asumir diferentes configuraciones dificultan este enfoque. Por ejemplo, un receptor funcional de IL-15 puede ser IL-15R β / γ c o IL-15R α / β / γ c. (véase Dubois et al., 2002, Immunity 17: 537-47.) Un anticuerpo contra el receptor de IL-15R β (TM β 1) es un inhibidor eficaz de la función de IL-15, pero solo cuando la molécula de IL-15R α está ausente complejo receptor (véase Tanaka et al., 1991, J. Immunol. 147: 2222-28.) Por lo tanto, la efectividad de un anticuerpo monoclonal antirreceptor, ya sea generado contra una subunidad compartida o propia, puede depender del contexto y es impredecible in vivo.

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

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

Reconocimiento de JAK3, como un ejemplo alternativo existente para la inhibición de múltiples citocinas γ c

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

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

Por lo tanto, existe una gran necesidad de una estrategia alternativa para tratar enfermedades con citoquinas γ c implicadas.

Resumen de la invención

La presente invención está definida por las reivindicaciones. Un aspecto de la invención se refiere a un péptido aislado o purificado, que comprende una secuencia de aminoácidos del núcleo γ c-box I-K-E-F-L-Q-R-F-I-H-I-V-Q-S-I-I-N-T-S (Id. de Sec. nº: 1) (BNZ- γ), y en el que el péptido puede inhibir la actividad de una o más citocinas γ c seleccionadas del grupo que consiste en: IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 o IL-21.

Una realización se refiere a un péptido aislado o purificado, que consiste esencialmente en una secuencia de aminoácidos de 19 unidades I-K-E-F-L-Q-R-F-I-H-I-V-Q-S-I-I-N-T-S (Id. de Sec. nº: 1) (denominado en este documento "BNZ- γ " (BNZ γ)).

Otra realización se refiere a un método in vitro para bloquear la señalización de uno o más miembros de la familia de las citocinas γ c, que comprende poner en contacto una célula con un péptido aislado o purificado que consiste esencialmente en la secuencia de aminoácidos I-K-E-F-L-Q-R-F-I-H-I-V-Q-S-I-I-N-T-S (Id. de Sec. nº: 1).

Otra realización se refiere a un método in vitro para bloquear la señalización de uno o más miembros de la familia de las citocinas γ c, que comprende poner en contacto una célula con un péptido aislado o purificado que consiste esencialmente en la secuencia de aminoácidos I-K-E-F-L-Q-R-F-I-H-I-V-Q-S-I-I-N-T-S (Id. de Sec. nº: 1), en el que la célula es una célula inmune.

Otra realización se refiere a un método in vitro para bloquear la señalización de uno o más miembros de la familia de las citocinas γ c, que comprende poner en contacto una célula con un péptido aislado o purificado que consiste esencialmente en la secuencia de aminoácidos I-K-E-F-L-Q-R-F-I-H-I-V-Q-S-I-I-N-T-S (Id. de Sec. nº: 1), en el que el miembro de la familia de la citocina γ c se selecciona del grupo que consiste en: IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 o IL-21.

Otra parte de esta descripción se refiere a péptidos derivados de un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos I-K-E-F-L-Q-R-F-I-H-I-V-Q-S-I-I-N-T-S (Id. de Sec. nº: 1), en donde el péptido derivado tiene propiedades fisicoquímicas similares al péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos I-K-E-F-L-Q-R-F-I-H-I-V-Q-S-I-I-N-T-S (Id. de Sec. nº: 1), pero el péptido derivado tiene una actividad biológica distinta.

Otra parte de esta descripción se refiere a un péptido personalizado en el que la secuencia de aminoácidos del péptido personalizado difiere de la secuencia de aminoácidos I-K-E-F-L-Q-R-F-I-H-I-V-Q-S-I-I-N-T-S (Id. de Sec. nº: 1) por sustitución conservadora de uno o más aminoácidos.

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

Otra parte de esta descripción se refiere a un péptido personalizado en el que la secuencia de aminoácidos del péptido personalizado difiere de la secuencia de aminoácidos I-K-E-F-L-Q-R-F-I-H-I-V-Q-S-I-I-N-T-S (Id. de Sec. nº: 1) sustituyendo la glutamina por otro aminoácido polar.) en la posición 6.

Otra parte de esta descripción se refiere a un péptido personalizado en el que la secuencia de aminoácidos del péptido personalizado difiere de la secuencia de aminoácidos I-K-E-F-L-Q-R-F-I-H-I-V-Q-S-I-I-N-T-S (Id. de Sec. nº: 1) mediante la sustitución de uno o más aminoácidos con similares propiedades bioquímicas de los aminoácidos que comprenden la secuencia I-K-E-F-L-Q-R-F-I-H-I-V-Q-S-I-I-N-T-S (Id. de Sec. nº: 1).

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

Otra realización se refiere a una conjugación de un péptido que consiste esencialmente en la secuencia de aminoácidos I-K-E-F-L-Q-R-F-I-H-I-V-Q-S-I-I-N-T-S (Id. de Sec. nº: 1) a los extremos N-terminal, C-terminal y/o los residuos laterales de proteínas/péptidos biológicos existentes para una entrega eficaz y estabilidad biológica mejorada in vivo. Ejemplos de tales conjugaciones son BSA, albúmina, región Fc de IgG, otras proteínas biológicas que funcionan como armazón, polietilenglicol o (PEG) a diferentes pesos moleculares u otras porciones similares.

Otra parte de esta descripción se refiere a la conjugación de derivados peptídicos personalizados de la secuencia de aminoácidos I-K-E-F-L-Q-R-F-I-H-I-V-Q-S-I-I-N-T-S (Id. de Sec. nº: 1) a los extremos N-terminal, C-terminal y/o los residuos secundarios de proteínas/péptidos biológicos existentes, en donde la secuencia de aminoácidos del péptido personalizado tiene propiedades fisicoquímicas similares a un péptido de la secuencia de aminoácidos I-K-E-F-L-Q-R-F-I-H-I-V-Q-S-I-I-N-T-S (Id. de Sec. nº: 1), pero tiene una actividad biológica distinta, en donde la secuencia de aminoácidos del péptido personalizado comparte en al menos 50% de homología de secuencia con la secuencia de aminoácidos I-K-E-F-L-Q-R-F-I-H-I-V-Q-S-I-I-N-T-S (Id. de Sec. nº: 1). Ejemplos de tales conjugaciones son la albúmina, la región Fc de IgG, otras proteínas biológicas que funcionan como armazón, o el polietilenglicol o (PEG) a diferentes pesos moleculares u otras porciones similares.

Otra realización se refiere a un método in vitro de inhibición de la actividad de citocina γ c que comprende, poner en contacto una citocina γ c con un péptido que consiste esencialmente en la secuencia de aminoácidos I-K-E-F-L-Q-R-F-I-H-I-V-Q-S-I-I-N-T-S (Id. de Sec. nº: 1).

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

Otra parte de esta descripción se refiere a anticuerpos policlonales y monoclonales generados contra derivados de péptidos personalizados de la secuencia de aminoácidos I-K-E-F-L-Q-R-F-I-H-I-V-Q-S-I-I-N-T-S (Id. de Sec. nº: 1), en donde la secuencia de aminoácidos del péptido personalizado tiene propiedades físico químicas similares al péptido de la secuencia de aminoácidos I-K-E-F-L-Q-R-F-I-H-I-V-Q-S-I-I-N-T-S (Id. de Sec. nº: 1), pero tiene una actividad

biológica distinta, y en donde la secuencia de aminoácidos del péptido personalizado comparte al menos un 50% de homología de secuencia con la secuencia de aminoácidos I-K-E-F-L-Q-R-F-I-H-I-V-Q-S-I-I-N-T-S (Id. de Sec. nº: 1).

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1A muestra una alineación de la región de la hélice D de los miembros de la familia de las citocinas γ c humanas.

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

La figura 2 representa una representación esquemática de las propiedades bioquímicas de los aminoácidos.

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

La Figura 3B muestra el ensayo de proliferación de células CTTL2 cultivadas en presencia de IL-2 o IL-15 y 0, 0,1, 1 o 10 μ M de BNZ- γ .

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

La Figura 4A muestra un ensayo de proliferación de células T ex vivo usando sangre periférica HAM/TSP. La proliferación de células T se inhibe mediante la adición de BNZ- γ .

La Figura 4B muestra que la población de células CD4+ CD25+ en un ensayo de proliferación de células T ex vivo usando sangre periférica HAM/TSP se reduce después de agregar BNZ- γ al cultivo.

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

La Figura 4D muestra que el porcentaje de células vivas por tinción Guava en un ensayo de proliferación de células T ex vivo usando sangre periférica HAM/TSP no se ve afectado después de agregar BNZ- γ al cultivo.

Descripción detallada

Resumen

Las citocinas γ c son jugadores importantes en el desarrollo de las células linfoides que constituyen el sistema inmunitario, particularmente las células T, B y NK. Además, las citocinas γ c se han implicado en diversas enfermedades humanas. Por lo tanto, los factores que inhiben la actividad de la citocina γ c proporcionarían herramientas útiles para dilucidar el mecanismo de desarrollo de subconjuntos de linfocitos y para tratar trastornos inmunes y enfermedades mediadas por la citocina γ c.

El agotamiento de la línea germinal de los genes que codifican la subunidad γ c en ratones o las mutaciones de la subunidad γ c en humanos se sabe que causan inmunodeficiencia combinada severa (SCID) al alterar la apariencia o función normal de las células NK, T y B. La importancia de la subunidad γ c en la transducción de señales de las citocinas γ c, IL-2, -4, -7, -9, -15, -21, está indicada en estudios que demuestran la respuesta de los linfocitos de estos ratones y pacientes humanos a las citocinas γ c (revisado en Sugamura et al., 1995 Adv. Immunol. 59: 225-277). Esto indica que la interrupción de la interacción entre la subunidad γ c y una citocina γ c bloquearía eficazmente los eventos de señalización intracelular por parte de los miembros de la familia de las citocinas γ c. Por lo tanto, se espera que los péptidos antagonistas de acuerdo con las realizaciones presentes bloqueen eficazmente los cambios patogénicos en humanos que padecen las enfermedades mediadas por la regulación errónea de los miembros de la familia de las citocinas γ c.

Como una alternativa a los enfoques mediados por anticuerpos para modular la actividad de las citocinas γ c individuales, los solicitantes han ideado nuevos compuestos de bajo peso molecular denominados en este documento "Simul-Block", que suprimen la actividad de múltiples citocinas γ c. Estos compuestos de bajo peso molecular, que incluyen productos químicos y péptidos, son menos inmunogénicos que los anticuerpos. Estas propiedades distinguen a Simul-Block como una estrategia más eficiente para mediar la actividad de la citocina γ c en intervenciones clínicas.

Descubrimiento de la caja γ c

El extremo C terminal (la hélice D) de las citocinas γ c contiene el sitio propuesto para interactuar con la subunidad γ c común de los receptores de citocinas de unidades múltiples. (Bernard et al., 2004 J. Biol. Chem. 279: 24313-21.) La comparación de las propiedades bioquímicas de los aminoácidos de todas las citocinas γ c identificadas en ratones y humanos reveló que la naturaleza química de los aminoácidos, por ejemplo, la hidrofobicidad, la hidrofilia, la naturaleza básica/ácida están conservadas, si no son idénticas, en muchas posiciones en la hélice D a través de los miembros de la familia de las citocinas γ c. Por el contrario, la secuencia de IL-13, que está relacionada con la citocina γ c, IL-4, pero no se une a la subunidad γ c, no presenta una homología significativa en la región de la hélice D con las citocinas γ c, lo que sugiere que la homología de secuencia en la región de la hélice D está correlacionada con la unión a la subunidad γ c. Como se muestra en la Figura 1, la alineación de las secuencias de aminoácidos de la región de la hélice D de los miembros de la familia de las citocinas γ c en humanos revela un motivo de homología de secuencia moderada en estas citocinas referidas aquí como "la caja γ c".

La caja γ comprende 19 aminoácidos donde de las 19 posiciones, las posiciones 4, 5 y 13 se conservan completamente como fenilalanina, leucina y asparagina, respectivamente. Se observa menos conservación en las posiciones 6, 7 y 11 de la caja γ donde el aminoácido es uno de dos o tres aminoácidos relacionados que comparten propiedades fisicoquímicas: la posición 6 puede estar ocupada por los aminoácidos polares Glutamato, Asparagina o Glutamina; los aminoácidos no polares Serina o Arginina pueden ocupar la posición 7; y la posición 11 está ocupada por cualquiera de los aminoácidos alifáticos no polares Leucina o Isoleucina. Las posiciones 9 y 16 pueden estar ocupadas por el aminoácido no polar Isoleucina o el aminoácido polar Lisina. Ver Figura 1B. Se observan algunas diferencias en la composición de aminoácidos de la caja γ en las posiciones 9 y 6 entre las subfamilias de las citocinas γ . La comparación de las citocinas γ entre especies indica que la isoleucina está presente en las posiciones 9 y 6 en la subfamilia IL-2/15, mientras que los otros miembros de la familia γ (por ejemplo, IL-4, IL-21) poseen lisina en estas posiciones. Sin querer ceñirse a ninguna teoría particular, la isoleucina y la lisina son bioquímicamente diferentes y, por lo tanto, pueden impartir diferencias conformacionales específicas entre la subfamilia IL-2/15 y otras citocinas γ .

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

Inhibidores de péptidos de la actividad citoquina γ

La actividad de las citocinas de la familia γ puede bloquearse al interrumpir la interacción entre la citocina γ y la subunidad γ , por ejemplo, mediante la introducción de un inhibidor competitivo que puede interactuar con la subunidad γ sin estimular la señalización a través de la multi-subunidad de receptores de citoquinas. Para no estar sujeto a una teoría particular, el motivo de caja γ conservado, que participa en la unión de las citocinas de la familia γ a la subunidad γ , presenta una secuencia de aminoácidos de base central que puede utilizarse para diseñar inhibidores peptídicos de señalización de citoquinas γ .

La secuencia de aminoácidos del núcleo de la caja γ comprende: D/E-F-L-E/Q/N-S/R-X-I/K-X-L/I-X-Q (Id. de Sec. nº: 2) (donde X denota cualquier aminoácido). Partes de esta descripción descrita en el presente documento se refieren a derivados de péptidos personalizados de la secuencia de aminoácidos del núcleo de la caja γ que puede inhibir la actividad de una o más citocinas γ . Los derivados de péptidos personalizados incluyen cualquier péptido cuya secuencia parcial de aminoácidos muestre aproximadamente 50%, 50-60%, 60-70%, 70-80%, 80%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% o 99,8 % de identidad con la secuencia de aminoácidos del núcleo de la caja γ . Los derivados de péptidos personalizados incluyen además cualquier péptido en el que una secuencia de aminoácidos parcial de ese derivado de péptido comprende aminoácidos con propiedades fisicoquímicas similares a los aminoácidos del núcleo de la caja γ . Por ejemplo, los aminoácidos con propiedades fisicoquímicas similares incluirían fenilalanina, tirosina, triptófano e histidina, que son aminoácidos aromáticos. La Figura 2 muestra una representación esquemática de aminoácidos con propiedades fisicoquímicas similares que pueden ser sustituidas por los aminoácidos que comprenden el núcleo de la caja γ . Los derivados peptídicos del núcleo de la caja γ pueden tener 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 24, 25-30, 30-35, 35-40, 40- 45, 45-50, o más de 50 aminoácidos de longitud. En algunas realizaciones, los derivados peptídicos personalizados pueden conjugarse con los extremos N, C y/o con los residuos laterales de proteínas/péptidos biológicos existentes.

En base a la identificación del motivo conservado de la caja γ en las citocinas que se unen a la subunidad γ , los solicitantes han ideado un nuevo péptido derivado personalizado de 19 unidades que es un péptido compuesto artificial que combina la secuencia de aminoácidos de la caja γ de IL-2 e IL-15 humana. El péptido de 19 unidades, en este documento denominado BNZ- γ , consiste en la secuencia de aminoácidos: **I-K-E-F-L-Q-R-F-I-H-I-V-Q-S-I-I-N-T-S** (Id. de Sec. nº: 1), donde los aminoácidos representados por caracteres en negrita se conservan entre IL-2 e IL -15 y los aminoácidos subrayados representan posiciones donde se conservan las propiedades fisicoquímicas de los aminoácidos.

Los solicitantes descubrieron que el BNZ- γ de 19 unidades suprime la proliferación celular inducida por IL-15 e IL-9, pero no la proliferación celular inducida por IL-2 o IL-4. Véase la Figura 3A y el Ejemplo 2. Los solicitantes demostraron además que BNZ- γ inhibe la fosforilación mediada por IL-15 de la molécula de transducción de señal de citocina intracelular, STAT-5. Véase la Figura 3C y el Ejemplo 5. Estos resultados demuestran que los derivados peptídicos personalizados del motivo de caja γ conservada pueden inhibir la actividad de múltiples citocinas γ .

Varias partes de esta descripción se refieren a péptidos derivados personalizados de la secuencia de aminoácidos BNZ- γ de 19 unidades, **I-K-E-F-L-Q-R-F-I-H-I-V-Q-S-I-I-N-T-S** (Id. de Sec. nº: 1), que pueden inhibir la actividad de una o más citocinas γ . Los derivados de péptidos personalizados de la secuencia de aminoácidos BNZ- γ de 19 unidades incluyen cualquier péptido cuya secuencia de aminoácidos parcial muestre aproximadamente 50%, 50-60%, 60-70%, 70-80%, 80%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% o 99,8% de identidad con la secuencia de aminoácidos: **I-K-E-F-L-Q-R-F-I-H-I-V-Q-S-I-I-N-T-S** (Id. de Sec. nº: 1). Los derivados de péptidos personalizados incluyen además cualquier péptido en el que una secuencia de aminoácidos parcial de ese derivado de péptido comprende aminoácidos con

propiedades fisicoquímicas similares a los aminoácidos de secuencia: I-K-E-F-L-QR-F-I-H-I-V-Q-S-I-I-N-T-S (Id. de Sec. nº: 1). En varias partes de esta descripción, los residuos de aminoácidos de los péptidos derivados personalizados conservan propiedades fisicoquímicas similares con los residuos de aminoácidos de BNZ- γ , pero presentan una especificidad de inhibición biológica diferente a los 6 miembros de la familia de citocinas γ de del péptido original de 19 unidades. Los derivados peptídicos de BNZ- γ pueden tener 19, 20, 21, 22, 24, 25-30, 30-35, 35-40, 40-45, 45-50 o más de 50 aminoácidos de longitud. En algunas realizaciones, los derivados peptídicos personalizados pueden conjugarse con los extremos N, C y/o residuos secundarios de proteínas/péptidos biológicos existentes.

Varias de las presentes descripciones se refieren a derivados de péptidos personalizados de los motivos de caja γ de IL-5, IL-2, IL-21, IL-4, IL-9 o IL-7, que se representan en la Figura 1A. Otras partes de esta descripción se refieren a péptidos derivados personalizados que son péptidos compuestos artificiales que combinan la secuencia de aminoácidos de dos o más de los motivos de caja γ de IL-5, IL-2, IL-21, IL-4, IL-9 e IL-7 humanas. Varias partes de esta descripción se refieren a derivados de péptidos personalizados de los motivos de la caja γ de IL-5, IL-2, IL-21, IL-4, IL-9 o IL-7 que tienen una secuencia parcial de aminoácidos 15 que muestra aproximadamente 50%, 50-60%, 60-70%, 70-80%, 80%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% o 99,8% de identidad con las secuencias de aminoácidos de los motivos de la caja γ de IL-5, IL-2, IL-21, IL-4, IL-9 o IL-7. Los derivados peptídicos personalizados de los motivos de caja γ de IL-5, IL-2, IL-21, IL-4, IL-9 o IL-7 incluyen además cualquier péptido en el que una secuencia de aminoácidos parcial de ese derivado peptídico comprende aminoácidos con propiedades fisicoquímicas similares a los aminoácidos de secuencia de los motivos de caja γ de IL-5, IL-2, IL-21, IL-4, IL-9 o IL-7.

Varias partes de esta descripción se refieren a derivados peptídicos personalizados que inhibirían la función de uno, todos o miembros selectivos de las citocinas γ . En algunas partes de esta descripción, los derivados de péptidos personalizados se dirigen selectivamente a miembros individuales de la familia de las citocinas γ . Por ejemplo, un derivado peptídico personalizado puede inhibir selectivamente la función de IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 o IL-21. En otras partes de esta descripción, un derivado peptídico personalizado puede inhibir 2 o más miembros de la familia de las citocinas γ . Por ejemplo, los derivados peptídicos personalizados de la presente descripción pueden inhibir selectivamente la función de IL-2 en combinación con una o más de IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 e IL-21; IL-4 en combinación con una o más de IL-7, IL-9, IL-15 e IL-21; IL-7 en combinación con una o más de IL-9, IL-15 e IL-21; IL-9 en combinación con una o más de IL-2, IL-4, IL-7, IL-15 e IL-21; IL-15 en combinación con una o más de IL-2, IL-4, IL-7, IL-9 e IL-21; o IL-21 en combinación con una o más de IL-2, IL-4, IL-7, IL-9 e IL-15. En otras partes de esta descripción, los derivados de péptidos personalizados pueden dirigirse de manera integral a todos los miembros de la familia de las citocinas γ . No deseando estar ligados a una teoría particular, los derivados peptídicos personalizados pueden inhibir la función de todos o miembros selectivos de las citocinas γ disminuyendo la unión de las citocinas γ a la subunidad γ , por ejemplo, como un inhibidor competitivo. Dichos derivados de péptidos personalizados pueden usarse en diversas aplicaciones, incluso como fármaco clínico.

Los términos "oligopéptido", "polipéptido", "péptido" y "proteína" se pueden usar indistintamente cuando se refieren a los derivados de péptidos personalizados proporcionados de acuerdo con las presentes realizaciones y se pueden usar para designar una serie de aminoácidos residuos de cualquier longitud. Los péptidos de acuerdo con las presentes realizaciones también pueden contener aminoácidos no naturales. Los elementos enlazadores se pueden unir a los péptidos de las presentes realizaciones mediante enlaces peptídicos o mediante enlaces químicos. Los péptidos de las presentes realizaciones pueden ser lineales o cíclicos, y pueden incluir aminoácidos (D) así como (L). Los péptidos de las presentes realizaciones también pueden contener uno o más aminoácidos raros (tales como 4-hidroxiprolina o hidroxilisina), ácidos orgánicos o amidas y/o derivados de aminoácidos comunes, tales como aminoácidos que tienen el carboxilato C-terminal esterificado (p. ej., éster bencílico, metílico o etílico) o amidado y/o que tiene modificaciones del grupo amino N-terminal (p. ej., acetilación o alcóxicarbonilamino), con o sin una amplia variedad de modificaciones y/o sustituciones de la cadena lateral (p. ej., metilación, bencilación, t-butilación, tosilación, alcóxicarbonilamino y similares). Los residuos distintos de los aminoácidos comunes que pueden estar presentes incluyen, entre otros, penicilamina, tetrametilen cisteína, pentametilen cisteína, ácido mercaptopropiónico, ácido pentametilen mercaptopropiónico, 2 mercaptobenceno, 2 mercaptoanilina, 2 mercaptoprolina, ornitina, ácido diaminobutírico, ácido aminoalápico, ácido m-aminometilbenzoico y ácido diaminopropiónico.

Los péptidos de las presentes realizaciones se pueden producir y obtener mediante diversos métodos conocidos por los expertos en la materia. Por ejemplo, el péptido puede producirse mediante ingeniería genética, basándose en la secuencia de nucleótidos que codifica el péptido de las presentes realizaciones, o sintetizarse químicamente por medio de síntesis de péptidos en fase sólida y similares, o producirse y obtenerse en su combinación. Un experto en la materia puede sintetizar los derivados peptídicos personalizados basados en la presente descripción del motivo conservado de caja γ y el conocimiento de las propiedades bioquímicas de los aminoácidos como se describe en la Figura 2. Algunas realizaciones también se refieren a polinucleótidos que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifican los péptidos de la presente invención. Se puede usar indistintamente "secuencia de nucleótidos", "polinucleótido" o "ácido nucleico", y se entiende que significa ADN de doble cadena, un ADN de cadena sencilla o productos de transcripción de dichos ADN (por ejemplo, moléculas de ARN). Los polinucleótidos pueden administrarse a células o sujetos y expresarse por las células o sujetos, en lugar de administrar los péptidos mismos. Varias realizaciones también se refieren a construcciones genéticas que comprenden una secuencia de polinucleótidos que codifica los péptidos de la presente invención. Las construcciones genéticas también pueden contener elementos

reguladores adicionales tales como promotores y potenciadores y, opcionalmente, marcadores seleccionables.

Métodos para tratar enfermedades mediadas por citoquinas γ c

Varias realizaciones se refieren al uso de péptidos antagonistas de γ c en el tratamiento de enfermedades mediadas por citoquinas γ c. El uso de derivados de péptidos personalizados de acuerdo con las presentes realizaciones permite flexibilidad en el diseño del agente terapéutico (diseño personalizado del péptido) y permite resultados más completos, que no se lograrían mediante estrategias convencionales que emplean anticuerpos anti-citocina o anti-receptor de citocina.

En este documento se describe un método novedoso para bloquear la acción de las citocinas de la familia γ c. Dichas manipulaciones pueden producir métodos efectivos de intervenciones clínicas en el tratamiento de enfermedades relacionadas con la desregulación o disfunción de las citocinas γ c. Los ejemplos de enfermedades que pueden tratarse interrumpiendo la interacción entre la citocina γ c y la subunidad γ c incluyen enfermedades autoinmunes como el lupus eritematoso sistémico, el síndrome de Sjogren, la granulomatosis de Wegener, la enfermedad celíaca, la enfermedad de Hashimoto o la tiroiditis autoinmune; enfermedades del colágeno que incluyen artritis reumatoide, enfermedad inflamatoria intestinal, diabetes mellitus, enfermedades autoinmunes de la piel tales como psoriasis; enfermedades neuronales degenerativas como esclerosis múltiple, uveítis o inflamación del ojo y oftalmia simpática, enfermedad de injerto contra huésped (EICH) y miastenia gravis.

En algunas realizaciones, los péptidos antagonistas de γ c descritos en el presente documento se pueden usar en el tratamiento de enfermedades linfotrópicas de células T humanas de tipo I y II (HTLV-I y HTLV-II) incluyendo leucemia de células T adultas (ATL), mielopatía asociada a HTLV/paraparesia espástica tropical (HAM/TSP) y otras enfermedades inflamatorias no neoplásicas asociadas a HTLV como uveítis (HU), artropatía, neumopatía, dermatitis, exocrinopatía y miositis. En algunas realizaciones, los péptidos antagonistas de γ c descritos en el presente documento pueden usarse en el tratamiento de otras enfermedades virales tales como gripe, SIDA, VHB y herpes o enfermedades parasitarias.

En varias realizaciones, los péptidos antagonistas de γ c pueden administrarse antes, durante y después del trasplante de diversos órganos como agente inmunosupresor.

En algunas realizaciones, los péptidos antagonistas de γ c descritos en este documento pueden usarse en el tratamiento de enfermedades inmunomediadas tales como asma y otras enfermedades respiratorias inflamatorias, tales como, pero sin limitación, sinusitis, fiebre del heno, bronquitis, obstructiva crónica, enfermedad pulmonar (EPOC), rinitis alérgica, otitis aguda y crónica, fibrosis pulmonar. En algunas realizaciones, los péptidos antagonistas de γ c pueden administrarse para tratar o prevenir reacciones alérgicas debido a la exposición a alérgenos, agentes químicos u otras causas comunes de enfermedad respiratoria aguda. En algunas realizaciones, los péptidos antagonistas de γ c pueden administrarse para tratar o prevenir respuestas inflamatorias causadas por virus, bacterias, reactivos químicos y reactivos bioquímicos.

En varias realizaciones, los péptidos antagonistas de γ c pueden administrarse para tratar algunos tipos de neoplasias malignas tales como leucemia LGL, linfoma intraepitelial y leucemia en enfermedad celíaca refractaria, leucemia/linfoma NK y leucemia/linfoma NK-T

En algunas realizaciones, los derivados peptídicos personalizados de acuerdo con la presente descripción pueden usarse con fines cosméticos, tales como el tratamiento del acné, la pérdida de cabello, las quemaduras solares y el mantenimiento de las uñas, incluido el ungüento como componente antienvjecimiento debido a la naturaleza anti-inflamatoria de ellos.

Varias realizaciones se refieren a péptidos antagonistas terapéuticos que inhibirían la función de todos o miembros selectivos de las citocinas γ c. En algunas realizaciones, los péptidos antagonistas terapéuticos inhiben selectivamente a los miembros individuales de la familia de las citocinas γ c (péptidos personalizados). En otras realizaciones, los péptidos antagonistas terapéuticos pueden inhibir exhaustivamente a todos los miembros de la familia de las citocinas γ c (Simul-Block). En algunas realizaciones, los péptidos antagonistas terapéuticos inhiben selectivamente subconjuntos de las citocinas γ c. No deseando estar ligados a una teoría particular, los antagonistas peptídicos pueden inhibir la función de todos o miembros selectivos de las citocinas γ c disminuyendo la unión de las citocinas γ c a la subunidad γ c, por ejemplo, como un inhibidor competitivo.

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

realizaciones se refieren al uso de una combinación de péptidos antagonistas terapéuticos que inhiben selectivamente IL-2, IL-7 o IL-15.

5 Algunas realizaciones se refieren al uso de péptidos antagonistas terapéuticos que inhiben selectivamente la función de IL-2 para el tratamiento de trastornos autoinmunes en los que se cree que los T-reg desempeñan un papel. En algunas realizaciones, la inhibición de T-regs mediada por péptidos puede mejorar la inmunidad natural contra el cáncer en humanos, proporcionando un medio novedoso de terapia contra el cáncer.

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

15 Algunas realizaciones se refieren al uso de péptidos antagonistas terapéuticos que inhiben selectivamente la IL-7, ya sea solos o en combinación con péptidos antagonistas terapéuticos que inhiben selectivamente al miembro de la familia de las citocinas γ c, IL-15, como agente terapéutico para la leucemia LGL. En algunas realizaciones, los péptidos antagonistas terapéuticos que inhiben selectivamente tanto la actividad de IL-7 como la IL-15 pueden usarse para tratar la leucemia LGL. Varias realizaciones se refieren al uso de BNZ- γ para tratar la leucemia LGL. En algunas realizaciones, los péptidos antagonistas γ c específicos que inhiben selectivamente IL-15 solo o péptidos antagonistas γ c específicos que inhiben selectivamente IL-15 e IL-7 se usan como un agente terapéutico para la leucemia asociada a linfocitos T CD4/CD8, incluida la causada por la HTLV-I.

20 Varias realizaciones se relacionan con el uso de péptidos antagonistas de γ c que inhiben selectivamente la actividad de IL-9, ya sea solo o en combinación con los otros miembros de la familia citocinas γ c, como agente terapéutico para enfermedades humanas que implican el desarrollo anormal de células Th17.

25 Varias realizaciones se refieren al uso de péptidos antagonistas terapéuticos que inhiben selectivamente la actividad de IL-15 como agente terapéutico para tratar la EC. Una publicación reciente sugirió que IL-21, además de IL-15, puede desempeñar un papel en la patogénesis de la EC. (véase Bodd et al., 2010, Mucosal Immunol. 3: 594-601.) Esto sugiere que el tratamiento óptimo de la EC por anticuerpos anticitocinas o receptores de citoquinas convencionales se beneficiaría de una combinación de al menos dos anticuerpos que reconocen el componente que pertenece a los sistemas IL-15 e IL-21. En algunas realizaciones, los péptidos antagonistas derivados personalizados que inhiben selectivamente tanto la actividad de IL-15 como la IL-21 se usan como un agente terapéutico para tratar la EC.

35 Además de tener aplicaciones terapéuticas, los péptidos antagonistas de γ c también tienen aplicaciones en productos de consumo. Varias realizaciones se refieren al uso de péptidos antagonistas de γ c en productos para el cuidado de la piel, tales como aplicaciones antienvjecimiento, antiinflamatorias, antiacné y otras aplicaciones relacionadas. Algunas realizaciones se refieren al uso de péptidos antagonistas de γ c en productos para el cabello como ingrediente anticaída para tratar la pérdida de cabello causada por trastornos autoinmunes.

40 Otras partes de esta descripción se refieren al desarrollo de compuestos químicos 5 (no péptidos, no proteínas) que tienen una estructura espacial que se asemeja a la secuencia de aminoácidos de 19 unidades I-K-E-F-L-Q-R-F-I-H-I-V-Q-S-I-I-N-T-S (Id. de Sec. nº: 1) y puede caber en el bolsillo de la subunidad γ c para obstaculizar estructuralmente el acceso de una citocina γ c a la subunidad γ c para la unión. Algunas realizaciones se refieren al uso de compuestos químicos estructuralmente similares como inhibidores de la actividad de la citocina γ c. Dicha estrategia de mimetismo molecular para refinar aún más el desarrollo de compuestos sintéticos que se asemejan en estructura a péptidos/proteínas biológicos existentes se describe en Orzaez et al., 2009 Chem. Med. Chem 4: 146-160. Otra parte de esta descripción se refiere a la administración de compuestos químicos (no péptidos, no proteínas) que tienen una estructura tridimensional similar a la secuencia de aminoácidos de 19 unidades I-K-E-F-L-Q-R-F-I-H-I-V-Q-S-I-I-N-T-S (Id. de Sec. nº: 1) para tratar enfermedades mediadas por citocinas γ c.

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

60 Varias partes de esta descripción se refieren a la administración de anticuerpos policlonales y monoclonales generados contra un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos I-K-E-F-L-Q-R-F-I-H-I-V-Q-S-I-I-N-T-S (Id. de Sec. nº: 1) en pacientes como un inmunógeno para tratar enfermedades mediadas por citoquinas γ c. Otra parte de esta divulgación se relaciona con la administración de anticuerpos policlonales y monoclonales que se generaron contra péptidos derivados de la secuencia de aminoácidos I-K-E-F-L-Q-R-F-I-H-I-V-Q-S-I-I-N-T-S (Id. de Sec. nº: 1) en donde

la secuencia de aminoácidos del péptido derivado tiene propiedades fisicoquímicas similares a un péptido con la secuencia de aminoácidos I-K-E-F-L-Q-R-F-I-H-I-V-Q-S-I-I-N-T-S (Id. de Sec. nº: 1), pero tiene una actividad biológica distinta, en pacientes como inmunógeno para tratar enfermedades mediadas por citoquinas γ c.

5 Administración de péptidos antagonistas γ c

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

Las presentes realizaciones proporcionan métodos para usar composiciones farmacéuticas que comprenden una cantidad eficaz de antagonistas para las citocinas γ c en un diluyente o vehículo adecuado. Un antagonista de γ c de las presentes realizaciones puede formularse de acuerdo con métodos conocidos usados para preparar composiciones farmacéuticamente útiles. Un antagonista de γ c se puede combinar en mezcla, ya sea como el único material activo o con otros materiales activos conocidos, con diluyentes farmacéuticamente adecuados (p. ej., fosfato, acetato, Tris-HCl), conservantes (p. ej., timerosal, alcohol bencílico, parabenos), compuestos emulsionantes, solubilizantes, adyuvantes y/o vehículos tales como albúmina de suero bovino. Los portadores adecuados y sus formulaciones se describen en Remington's Pharmaceutical Sciences, 16ª ed. 1980 Mack Publishing CO. Además, tales composiciones pueden contener un antagonista de γ c formando complejo con polietilenglicol (PEG), iones metálicos, o incorporado en compuestos poliméricos tales como ácido poliacético, ácido poliglicólico, hidrogeles, etc., o incorporado en liposomas, microemulsiones, micelas, vesículas unilamelares o multilamelares, fantasmas de eritrocitos o esferoblastos. Dichas composiciones influirán en el estado físico, la solubilidad, la estabilidad, la velocidad de liberación in vivo y la velocidad de eliminación in vivo o un antagonista de γ c. Un antagonista de γ c puede conjugarse con anticuerpos contra antígenos, receptores, ligandos específicos de células o acoplarse a ligandos para receptores específicos de tejido.

Los métodos para administrar antagonistas de γ c de las presentes realizaciones pueden seleccionarse según sea apropiado, dependiendo de factores, tales como el tipo de enfermedades, la condición de los sujetos y/o el sitio a ser dirigido. Los antagonistas de γ c pueden administrarse por vía tópica, oral, parenteral, rectal o por inhalación. El término "parenteral" incluye inyecciones subcutáneas, intravenosas, intramusculares, intraperitoneales, inyección intracisternal o técnicas de infusión. Estas composiciones típicamente incluirán una cantidad efectiva de un antagonista de γ c, solo o en combinación con una cantidad efectiva de cualquier otro material activo. La cantidad del péptido contenido en las composiciones farmacéuticas de las presentes realizaciones, la forma de dosificación de las composiciones farmacéuticas, la frecuencia de administración y similares pueden seleccionarse según sea apropiado, dependiendo de factores, tales como el tipo de enfermedades, la condición de los sujetos, y/o el sitio al que se dirigirá. Dichas dosis y concentraciones deseadas de fármaco contenidas en las composiciones pueden variar afectadas por muchos parámetros, incluido el uso previsto, el peso corporal y la edad del paciente, y la vía de administración. Los estudios piloto primero se llevarán a cabo utilizando estudios en animales y la ampliación a la administración humana se realizará de acuerdo con la práctica aceptada en la técnica.

En una parte de esta descripción, las células huésped que se han modificado genéticamente con un polinucleótido que codifica al menos un péptido antagonista de γ c se administran a un sujeto para tratar un trastorno de proliferación y/o para reducir el crecimiento de células malignas. El polinucleótido es expresado por las células huésped, produciendo así los péptidos dentro del sujeto. Preferiblemente, las células huésped son alogénicas o autogénicas para el sujeto.

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

Una terapia de combinación pretende abarcar la administración de estos agentes terapéuticos de manera secuencial, es decir, en donde cada agente terapéutico se administra en un momento diferente, así como la administración de estos agentes terapéuticos, o al menos dos de los agentes terapéuticos, de manera sustancialmente simultánea. Se puede lograr una administración sustancialmente simultánea, por ejemplo, administrando al sujeto una cápsula única que tiene una proporción fija de cada agente terapéutico o en cápsulas múltiples para cada uno de los agentes terapéuticos. La administración secuencial o sustancialmente simultánea de cada agente terapéutico puede realizarse por una ruta apropiada que incluye, pero no se limita a, rutas orales, vías intravenosas, rutas intramusculares y absorción directa a través de tejidos de membrana mucosa. Allí los agentes terapéuticos pueden administrarse por la misma ruta o por diferentes rutas. La secuencia en la que se administran los agentes terapéuticos no es estrictamente

crítica.

La terapia de combinación también puede abarcar la administración de los agentes terapéuticos como se describió anteriormente en combinación adicional con otros ingredientes biológicamente activos (tales como, pero sin limitación, un segundo y diferente agente terapéutico) y terapias no farmacológicas (tales como, pero no limitado a, cirugía o tratamiento de radiación). Cuando la terapia de combinación comprende además tratamiento con radiación, el tratamiento con radiación puede realizarse en cualquier momento adecuado siempre que se logre un efecto beneficioso de la coacción de la combinación de los agentes terapéuticos y el tratamiento con radiación. Por ejemplo, en casos apropiados, el efecto beneficioso aún se logra cuando el tratamiento de radiación se retira temporalmente de la administración de los agentes terapéuticos, tal vez por días o incluso semanas.

En cierta parte de esta descripción, los péptidos antagonistas de γ c pueden administrarse en combinación con al menos un agente antiproliferativo seleccionado del grupo que consiste en un agente quimioterapéutico, un antimetabolito y un agente antitumoral, y un agente antimitótico y un agente antiviral, y un agente antineoplásico, un agente inmunoterapéutico y un agente radioterapéutico.

En cierta parte de esta descripción, los péptidos antagonistas de γ c pueden administrarse en combinación con al menos un agente antiinflamatorio seleccionado del grupo que consiste en esteroides, corticosteroides y fármacos antiinflamatorios no esteroideos.

También se describen aquí kits para realizar cualquiera de los métodos anteriores. Los kits pueden incluir un antagonista de γ c de acuerdo con las presentes realizaciones. En alguna parte de esta descripción, el kit puede incluir instrucciones. Las instrucciones pueden estar en forma escrita o pictográfica, o pueden estar en medios grabados que incluyen cintas de audio, CD de audio, cintas de video, DVD, CD-ROM o similares. Los kits pueden comprender embalaje.

Definiciones

Como se usa en este documento, el término "paciente" se refiere al receptor de un tratamiento terapéutico e incluye todos los organismos dentro del reino animalia. En realizaciones preferidas, el animal está dentro de la familia de mamíferos, tales como humanos, bovinos, ovinos, porcinos, felinos, búfalos, caninos, caprinos, equinos, burros, ciervos y primates. El animal más preferido es el humano.

Como se usa en el presente documento, el término "tratar" o cualquier variación del mismo (por ejemplo, tratamiento, tratando, etc.) se refiere a cualquier tratamiento de un paciente diagnosticado con una afección biológica, tal como CD4-, CD8-, y leucemia LGL, una enfermedad autoinmune, lupus eritematoso sistémico, síndrome de Sjogren, granulomatosis de Wegener, enfermedad celíaca, tiroiditis de Hashimoto, una enfermedad de colágeno, artritis reumatoide, enfermedad inflamatoria intestinal, diabetes mellitus, psoriasis, una enfermedad neuronal degenerativa, esclerosis múltiple, uveítis, inflamación del ojo, enfermedad de injerto-versus huésped (EICH), miastenia gravis, enfermedades asociadas a células T linfotrópicas humanas 1 de tipo I y II (HTLV-I y HTLV-II), leucemia de células T adultas (ATL), mielopatía asociada a HTL/Paraparesia espástica tropical (HAM/TSP), uveítis (HU), artropatía, neumopatía, dermatitis, exocrinopatía, miositis, gripe, SIDA, VHB, herpes, asma, sinusitis, fiebre del heno, bronquitis, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), rinitis alérgica otitis crónica y aguda, fibrosis pulmonar, leucemia/linfoma NK y leucemia/linfoma NK-T. El término tratar, como se usa en este documento, incluye: (i) prevenir o retrasar la presentación de síntomas asociados con la condición biológica de interés en un paciente en riesgo que aún no ha mostrado síntomas asociados con la condición biológica; (ii) mejorar los síntomas asociados con la condición biológica de interés en un paciente diagnosticado con la condición biológica; (iii) prevenir, retrasar o mejorar la presentación de síntomas asociados con complicaciones, afecciones o enfermedades asociadas con la condición biológica de interés en un paciente en riesgo o un paciente diagnosticado con la condición biológica; (iv) ralentizar, retrasar o detener la progresión de la condición biológica; y/o (v) prevenir, retrasar, ralentizar, detener o mejorar los eventos celulares de inflamación.

El término "síntoma(s)" como se usa en el presente documento, se refiere a signos o indicaciones comunes de que un paciente padece una afección o enfermedad específica.

El término "cantidad efectiva", como se usa en el presente documento, se refiere a la cantidad necesaria para provocar la respuesta biológica deseada. De acuerdo con las presentes realizaciones, una cantidad efectiva de un antagonista γ c es la cantidad necesaria para proporcionar un efecto observable en al menos un factor biológico para usar en el tratamiento de una afección biológica.

La "tecnología de ADN recombinante" o "recombinante" se refiere al uso de técnicas y procesos para producir polipéptidos específicos a partir de microbios (por ejemplo, bacterias, levaduras), invertebrados (insectos), células u organismos de mamíferos (por ejemplo, animales o plantas transgénicos) que se han transformado o transfectado con secuencias de ADN clonadas o sintéticas para permitir la biosíntesis de péptidos heterólogos. El patrón de glicosilación nativo solo se logrará con el sistema de expresión de células de mamífero. Los sistemas de expresión procariotas carecen de la capacidad de agregar glucosilación a las proteínas sintetizadas. Las células de levadura e insecto

proporcionan un patrón de glicosilación único que puede ser diferente del patrón nativo.

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

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

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

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

Ejemplos

Ejemplo 1

Método para evaluar la actividad inhibitoria del péptido antagonista γ c

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

Para cada una de las seis citocinas γ c, las líneas celulares indicadoras: CTLL-2, una línea de células T CD8 murinas disponible de American Type Culture Collection, y PT-18, una línea de mastocitos murinos y su subclón PT-18 β , se transfectan con el gen IL-2R β humano para que las células respondan a IL-2 e IL-15 (Tagaya et al., 1996, EMBO J. 15: 4928-39), y se usa para determinar cuantitativamente la actividad de promoción del crecimiento de la citocina γ c (véase Current protocols actuales en Immunology de Wiley and Sons para una referencia metodológica). Las células indicadoras muestran una respuesta dependiente de la dosis semi-lineal cuando se mide mediante un ensayo WST-1 colorimétrico en un rango de concentraciones (véase Clontech PT3946-1 y el manual del usuario asociado, para obtener una descripción detallada de los reactivos y métodos). Una vez se determinan las dosis apropiadas de la citocina que producen el 50% y 95% de respuesta máxima de la línea celular indicadora, se añaden varias concentraciones (que varían de 1 pM a 10 μ M) del péptido derivado personalizado purificado o sintetizado a cada pocillo que contiene la citocina y las células indicadoras. La reducción de la absorbancia de la luz a 450 nm se usa como un indicador de inhibición de la proliferación celular estimulada por citoquinas. Típicamente, las células son estimuladas por las citocinas de tal manera que la absorbancia del pocillo que contiene la línea celular indicadora y la citocina está entre 2,0 y 3,0, que se reduce a un rango de 0,1 a 0,5 mediante la adición de péptidos inhibidores.

Ejemplo 2

El péptido BNZ- γ inhibe específicamente las actividades promotoras del crecimiento de IL-9 e IL-15

Mediante el uso de células PT-18 β como se describió anteriormente, se determinó la capacidad del péptido BNZ- γ para inhibir específicamente la actividad promotora del crecimiento de las citocinas γ c seleccionadas (Figura 3A). La IL-3, una citocina que no es γ c que apoya el crecimiento de las células PT-18 β , se utilizó como control negativo. Brevemente, las células PT-18 β se incubaron con dos diluciones diferentes de péptido BNZ- γ producidas por células HEK293T (dilución 1:20 o 1:50 del sobrenadante original de células HEK293T transfectadas con una construcción de expresión BNZ- γ) o sin péptido BNZ- γ en presencia de IL-3, IL-9, IL-15 o IL-4 (1 nM de cada citocina en el cultivo). Las respuestas de crecimiento de las células se determinaron 2 días después de la introducción del péptido BNZ- γ y la citocina usando el ensayo WST-1. BNZ- γ no inhibió la actividad promotora del crecimiento de IL-3 (una citocina no γ c). Por el contrario, la actividad de IL-15 e IL-9 se redujo significativamente ($p < 0,01$ prueba de Student) por el péptido BNZ- γ . La proliferación celular estimulada por IL-4, otra citocina γ c, no se vio afectada por la adición del péptido BNZ-

γ. Los resultados para IL-3, IL-9, IL-15 e IL-4 se muestran en la Figura 3A.

En un ensayo similar, se usó la línea celular murina CTTL2. En este ensayo, las células se cultivaron con 0,5 nM de IL-2 recombinante en suero de ternera fetal RPMI al 10%. Para configurar el ensayo de proliferación, las células se lavaron de las citocinas 3 veces. Las células se sembraron en 1×10^5 células por pocillo de una placa de 96 pocillos con una concentración final de 50 pM de IL-2 o IL-15. Se añadieron diversas concentraciones de péptido BNZ-γ (0,1, 1 y 10 μg/ml) a cada pocillo. Las células se cultivaron durante 20 horas y en las últimas 4 horas, se añadió ^3H -timidina a las placas. Las células se recogieron usando un lector de placas. Los datos se muestran en la Figura 3B.

Ejemplo 3

Método para medir la inhibición de la actividad de citocina γc mediante el ensayo de la incorporación de ^3H -timidina como marcador de la proliferación celular

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

Ejemplo 4

Método para medir la inhibición de la actividad de la citocina γc mediante ensayo de incorporación de un colorante de rastreo celular como marcador de la proliferación celular

Las células indicadoras se incuban en presencia de una citocina γc seleccionada o en presencia de una citocina γc seleccionada y un péptido derivado personalizado seleccionado. La población celular se marca in vitro usando un colorante de rastreo celular, por ejemplo, CMFDA, C2925 de Invitrogen, y se controla la descomposición de la fluorescencia verde celular en cada división celular usando un citómetro de flujo (por ejemplo, Beckton-Dickinson FACScalibur). Típicamente, en respuesta a la estimulación de citocina γc, aparecen en el canal de fluorescencia verde de 7 ~10 picos diferentes correspondientes al número de divisiones que han sufrido las células. La incubación de las células con la citocina γc y el péptido derivado personalizado de antagonista seleccionados reduce el número de picos a solo 1 a 3, dependiendo del grado de inhibición.

Ejemplo 5

Inhibición de la señalización intracelular por BNZ-γ y sus antagonistas derivados

Además de estimular la proliferación celular, la unión de las citocinas γc a sus receptores provoca una gran variedad de eventos intracelulares. (Rochman et al. 2009 Nat. Rev. Immunol. 9: 480-90, Pesu et al. 2005 Immunol. Rev. 203: 127-142.) Inmediatamente después de que la citocina se une a su receptor, una tirosina quinasa llamada Jak3 (Janus -quinasa 3) se une al receptor en la membrana plasmática. Esta quinasa fosforila los residuos de tirosina de múltiples proteínas, incluida la subunidad γc, STAT5 (transductor de señal y activador de la transcripción 5) y subunidades de la quinasa PI3 (fosfatidilinositol 3). Entre estos, la fosforilación de STAT5 ha sido relacionada en muchos estudios por estar vinculada a la proliferación de células iniciadas por la citocina γc. (Revisado en Hennighausen y Robinson, 2008 Genes Dev. 22: 711-21.) De acuerdo con estos datos publicados, se examinó si el péptido BNZ-γ inhibe o no la fosforilación de la tirosina de la molécula STAT5 en las células PT-18β estimuladas por IL-15 (los resultados se muestran en la Figura 3C).

Las células PT-18β fueron estimuladas por IL-15 en presencia o ausencia de péptido BNZ-γ. Las proteínas citoplasmáticas se extrajeron de las células de acuerdo con un método convencional como se describe en Tagaya et al. 1996 EMBO J. 15: 4928-39. Las proteínas citoplasmáticas extraídas se resolvieron usando una SDS-PAGE estándar (electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio) y el estado de la fosforilación se confirmó con un anticuerpo antifosfo-STAT5 (Cell Signaling Technology, n° Catálogo 9354, Danvers MA) usando inmunotransferencia (véase Figura 3C, panel superior). Para confirmar que cada carril representaba una carga de proteína total similar, la membrana se despojó de anticuerpo y se volvió a sondear con un anticuerpo anti-STAT5 (Cell Signaling Technology, n° Catálogo 9358) (véase Figura 3C, panel inferior).

Estos resultados demostraron que la fosforilación de tirosina de STAT5, un marcador de transducción de señales, fue inducida por IL-15 en células PT-18β, y la fosforilación de tirosina de STAT5 se redujo notablemente por el péptido BNZ-γ.

Ejemplo 6

Diseño racional para péptidos antagonistas derivados de BNZ- γ

Los péptidos derivados se preparan a partir de la secuencia central D/E-F-L-E/Q/N-S/R-X-I/K-X-L/I-X-Q (Id. de Sec. nº: 2) (donde X denota cualquier aminoácido) sustituyendo los aminoácidos definidos de la secuencia central con aminoácidos que tienen propiedades fisicoquímicas idénticas a las designadas en la figura 2.

Ejemplo 7

Método de identificación de la especificidad inhibitoria de péptidos derivados personalizados antagonistas

La especificidad inhibitoria de la citocina γ c de los péptidos derivados personalizados antagonistas se determina analizando la capacidad de un péptido derivado personalizado para inhibir la respuesta proliferativa de una línea celular sensible a las citocinas a cada una de las 6 citocinas γ c. Por ejemplo, una línea celular de ratón, CTLL-2, se usa para determinar si un péptido candidato inhibe la función de IL-2 e IL-15. Las células PT-18 (β) se usan para determinar si un péptido candidato inhibe la función de IL-4 e IL-9. Las células PT-18 (7 α) se usan para determinar si un péptido candidato inhibe la función de IL-7, y las células PT-18 (21 α) se usan para determinar si un péptido candidato inhibe la función de IL-21. PT-18 (β) denota un subclón de células PT-18 que expresan exógenamente IL-2R β humano por transfección génica (véase Tagaya et al. 1996), PT-18 (7 α) denota un subclón que expresa IL-7R α humano por transfección génica y las células PT-18 (21R α) expresan IL-21R α humana.

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

Ejemplo 8

Preparación de péptidos antagonistas γ c

Los péptidos derivados de antagonista γ c personalizados se sintetizan químicamente mediante procesos manuales y automatizados.

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

Síntesis automatizada: muchas empresas comerciales proporcionan síntesis de péptidos automatizada por un precio. Estas compañías utilizan varios sintetizadores de péptidos comerciales, incluidos los sintetizadores proporcionados por Applied Biosystems (ABI). Los péptidos derivados de antagonistas γ c personalizados se sintetizan mediante sintetizadores automáticos de péptidos.

Ejemplo 9

Producción biológica de péptidos derivados de antagonistas γ c personalizados usando tecnología recombinante

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

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

Ejemplo 10

Conjugación de BNZ- γ y derivados a proteínas transportadoras para fines de inmunización y generación de anticuerpo anti-BNZ- γ

BNZ- γ y otros péptidos derivados personalizados se usan para inmunizar animales para obtener anticuerpos policlonales y monoclonales. Los péptidos se conjugan con el extremo N o C de proteínas transportadoras apropiadas (por ejemplo, albúmina sérica bovina, hemocianina de lapa californiana (KLH), etc.) mediante métodos convencionales que usan glutaraldehído o éster de m-maleimidobenzoil-N-hidroxisuccinimida. Los péptidos conjugados junto con un adyuvante apropiado se usan para inmunizar animales tales como conejos, roedores o burros. Los anticuerpos resultantes se examinan para determinar su especificidad utilizando métodos convencionales. Si los anticuerpos resultantes reaccionan con el péptido inmunogénico, se prueba su capacidad para inhibir la actividad individual de la citoquina γ de acuerdo con los ensayos de proliferación celular descritos en los Ejemplos 1-3. Debido a la naturaleza compuesta de los péptidos derivados, es posible generar un solo anticuerpo que reconoce dos citocinas diferentes simultáneamente, debido a la naturaleza compuesta de estos péptidos.

Ejemplo 11

Método para la producción a gran escala de péptidos derivados de antagonistas γ c personalizados

Las proteínas recombinantes se producen a gran escala mediante el uso del sistema libre de células como se describe en otra parte. (véase Takai et al., 2010 Curr. Pharm. Biotechnol. 11 (3): 272-8.) Brevemente, los ADNc que codifican el péptido antagonista γ c y una etiqueta se subclonan en un vector apropiado (véase Takai et al., 2010 Curr. Pharm. Biotechnol. 11 (3): 272-8), que se somete a transcripción in vitro, seguida inmediatamente por una traducción in vitro para producir el péptido marcado. El pro-polipéptido se purifica luego usando un anticuerpo inmovilizado que reconoce el epítipo marcado, tratado por la enzima proteolítica y se prueba la pureza del eluato (que contiene principalmente el péptido derivado personalizado de interés) usando Tricina-SDS-PAGE convencional al 18% (Invitrogen) y la tinción convencional de comassie. Si no se alcanza la pureza deseada del péptido (> 98%), la mezcla se somete a HPLC convencional (cromatografía líquida de alta resolución) para una purificación adicional.

Ejemplo 12

Uso de péptidos derivados de antagonista γ c personalizados para bloquear la función de las citocinas en HAM/TSP

La mielopatía asociada a HTLV-1 (HAM)/paraparesia espástica tropical (TSP) es una mielopatía crónica progresiva observada en algunas personas infectadas con el virus linfotrópico T humano de tipo I (HTLV-I). La infiltración de linfocitos en la médula espinal está asociada con la respuesta inmune al HTLV-I y da como resultado la liberación de ciertas citocinas. Algunas de estas citocinas también pueden dañar los nervios.

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

Para demostrar la eficacia de los péptidos derivados de antagonistas γ c personalizados de acuerdo con las realizaciones descritas en el presente documento, probamos la capacidad del péptido BNZ- γ para bloquear la respuesta inmune al HTLV-I en un ensayo de proliferación espontánea de células T usando un Sistema de cultivo ex vivo HAM/TSP. Los ensayos de proliferación se realizaron en muestras de sangre de pacientes con HAM/TSP con y sin la adición de BNZ- γ . Estos ensayos evaluaron la capacidad de BNZ- γ para bloquear la función de las citocinas, como IL-2 e IL-15, presentes en el hemocultivo ex vivo de pacientes con HAM/TSP y prevenir la proliferación espontánea de células T en estas muestras.

En un ensayo de proliferación espontánea de células T ex vivo, se cultivó PBMC de un paciente HAM/TSP a 1×10^6 células por pocillo de una placa de 96 pocillos en RPMI-10% FCS. Se añadieron concentraciones crecientes de péptido BNZ- γ a cada pocillo. Como control, se usó un péptido irrelevante de manera similar. Las células se incubaron en una incubadora de CO₂ a 37 ° C durante 3, 4 y 6 días. Se añadió a las células la cantidad de 1 μ Ci de 3H-timidina. Después de una incubación adicional de 6 horas, se recogieron las células y se midió su tasa de proliferación. Los datos para un paciente representativo de HAM/TSP se muestran en la Figura 4A-D. Como se indica en la Figura 4, el péptido

BNZ- γ inhibe la proliferación espontánea de células T en cultivo HAM/TSP a una concentración de aproximadamente 1 μ g/ml.

Otros marcadores inmunológicos se midieron adicionalmente en este ensayo. El porcentaje de las células CD8 específicas virales se midió durante el cultivo ex vivo usando tetrámeros de proteínas virales. La población de células CD4⁺ CD25⁺, un marcador de activación de células T, así como la tinción de Ki67, un marcador de proliferación de células T, se monitorizó en un ensayo de citometría de flujo.

Otras formas del derivado peptídico BNZ- γ conjugado pueden usarse en un ensayo futuro similar. Incluyen albúmina, BSA, PEG que se pueden conjugar con el péptido después de la síntesis química. Otras formas biológicas del conjugado de péptido BNZ- γ pueden incluir regiones de entidades proteicas conocidas (que incluyen pero no se limitan a la región Fc de IgG humana) que se fusionan con el derivado de péptido BNZ- γ .

Ejemplo 13

Método de tratamiento de la leucemia de células T adultas (ATL) en un paciente humano mediante la administración de péptido derivado de antagonista γ c personalizado

Se identifica un paciente humano que padece leucemia de células T adultas. Una dosis efectiva, según lo determinado por el médico, del péptido derivado del antagonista γ c personalizado, por ejemplo, BNZ- γ se administra al paciente durante un período de tiempo determinado por el médico. Se determina que el tratamiento es efectivo si el paciente entra en remisión.

Ejemplo 14

Método de tratamiento de HAM/TSP en un paciente humano mediante la administración de péptido derivado de antagonista γ c personalizado

Se identifica un paciente humano que padece HAM/TSP. Una dosis efectiva, según lo determinado por el médico, del péptido derivado de antagonista γ c personalizado, por ejemplo, BNZ- γ se administra al paciente durante un período de tiempo determinado por el médico. Se determina que el tratamiento es efectivo si los síntomas del paciente mejoran o si la progresión de la enfermedad se ha detenido o ralentizado.

Referencias

Antony, P.A., Paulos, C.M., Ahmadzadeh, M., Akpinarli, A., Palmer, D.C., Sato, N., Kaiser A., Heinrichs, C.S., Klebanoff, C.A., Tagaya, Y., and Restifo, NP., Interleukin-2-dependent mechanisms of tolerance and immunity in vivo. 2006 J. Immunol. 176:5255-66.

Azimi, N., Nagai, M., Jacobson, S., Waldmann, T.A., IL-15 plays a major role in the persistence of Taxspecific CD8 cells in HAM/TSP patients. 2001 Proc. Natl. Acad. Sci. 98:14559-64.

Azimi, N., Mariner J., Jacobson S., Waldmann T.A., How does interleukin 15 contribute to the pathogenesis of HTLV type-1 associated myelopathy/tropical spastic paraparesis? 2000 AIDS Res. Hum. Retroviruses 16:1717-22.

Azimi, N., Jacobson, S., Leist, T., Waldmann, T.A., Involvement of IL-15 in the pathogenesis of human T lymphotropic virus type-I-associated myelopathy/ tropical spastic paraparesis: implications for therapy with a monoclonal antibody directed to the IL-2/15R beta receptor. 1999 J. Immunol. 163:4064-72.

Azimi, N., Brown, K., Bamford, R.N., Tagaya, Y., Siebenlist, U., Waldmann, T.A., Human T cell lymphotropic virus type I Tax protein trans-activates interleukin 15 gene transcription through an NF-kappaB site. 1998 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:2452-7.

Bazan, J.F., Hematopoietic receptors and helical cytokines. 1990 Immunol. Today 11:350-354.

Bettini, M., and Vignali, D.A., Regulatory T cells and inhibitory cytokines in autoimmunity. 2009 Curr. Opin. Immunol. 21:612-8.

Bodd, M., Raki, M., Tollefsen, S., Fallang, L.E., Bergseng, E., Lundin, K.E., Sollid, L.M., HLA-DQ2-re- 27 28 EP 2 665 486 B1 16 5 10 15 20 25 30 35 40 45 50 55 stricted gluten-reactive T cells produce IL-21 but not IL-17 or IL-22. 2010 Mucosal Immunol. 3:594-601.

De Rezende, L.C., Silva I.V., Rangel, L.B., Guimaraes, M.C., Regulatory T cells as a target for cancer therapy. 2010 Arch. Immunol. Ther. Exp. 58:179-90.

- Dubois, S., Mariner, J., Waldmann, T.A., Tagaya, Y., IL-15R α recycles and presents IL-15 in trans to neighboring cells. 2002 *Immunity* 17:537-47.
- 5 Dodge DL. Et al., IL-2 and IL-12 alter NK cell responsiveness to IFN- γ -inducible protein 10 by down-regulating CXCR3 expression. *J. Immun.* 168:6090-8.
- Fehniger, T.A., Suzuki, K., Ponnappan, A., Van- Deusen, J.B., Cooper, M.A., Florea, S.M., Freud, A.G., Robinson, M.L., Durbin, J., Caligiuri, M.A., Fatal leukemia in interleukin 15 transgenic mice follows early expansions in natural killer and memory phenotype CD8 $^{+}$ T cells. 2001 *J. Exp. Med.* 193:219-31.
- 10 Fisher, A.G., Burdet, C., LeMeur, M., Haasner, D., Gerber, P., Cerediq, R., Lymphoproliferative disorders in an IL-7 transgenic mouse line. 1993 *Leukemia* 2:S66-68.
- Gong JH, et al. Characterization of a human cell line (NK-92) with phenotypical and functional characteristics of activated natural killer cells. *Leukemia* 8: 652-658, 1994.
- 15 Hennighausen, L., Robinson, G.W., Interpretation of cytokine signaling through the transcription factors STAT5A and STAT5B. 2008 *Genes Dev.* 22:711-21.
- Klingemann HG, et al. A cytotoxic NK-cell line (NK- 92) for ex vivo purging of leukemia from blood. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 2: 68-75, 1996.
- Krause, C.D. and Pestka, S., Evolution of the Class 2 cytokines and receptors, and discovery of new friends and relatives. 2005 *Pharmacol. and Therapeutics* 106:299-346.
- 25 Kundig, T.M., Schorle, H., Bachmann, M.F., Hengartner, H., Zinkernagel, R.M., Horak, I., Immune Responses of the interleukin-2-deficient mice. 1993 *Science* 262:1059-61.
- Le Buanec, H., Paturance, S., Couillin, I., Schnyder- Candrian, S., Larcier, P., Ryffel, B., Bizzini, B., Bensussan, A., Burny, A., Gallo, R., Zagury, D., Peltre, G., Control of allergic reactions in mice by an active anti-murine IL-4 immunization. 2007 *Vaccine* 25:7206-16.
- 30 Littman, D.R., Rudensky, A.Y., Th17 and regulatory T cells in mediating and restraining inflammation. 2010 *Cell* 140(6):845-58.
- 35 Miyagawa, F., Tagaya, Y., Kim, B.S., Patel, H.J., Ishida, K., Ohteki, T., Waldmann, T.A., Katz, S.I., IL-15 serves as a costimulator in determining the activity of autoreactive CD8 T cells in an experimental mouse model of graft-versus-host-like disease. 2008 *J. Immunol.* 181:1109-19.
- 40 Noguchi, M., Yi, H., Rosenblatt, H.M., Filipovich, A.H., Adelstein, S., Modi, W.S., McBride, O.W., Leonard, W.J., Interleukin 2 receptor gamma chain mutation results in X-linked severe combined immunodeficiency in humans. 1993 *Cell* 73:147-157.
- OH, U., Jacobson S., Treatment of HTLV-1-Associated Myelopathy / Tropical Spastic Paraparesis: Towards Rational Targeted Therapy 2008 *Neurol Clin.* 2008 26: 781-785.
- 45 Orzaez, M., Gortat, A., Mondragon, L., Perez-Paya, E., Peptides and Peptide Mimics as Modulators of Apoptotic Pathways. 2009 *Chem. Med. Chem.* 4:146-160.
- O'Shea, J.J., Targeting the Jak/STAT pathway for immunosuppression. 2004 *Ann. Rheum. Dis.* 63:(suppl II): ii67-71.
- Paul, W.E., Pleiotropy and redundancy: T cell-derived lymphokines in the immune response. 1989 *Cell* 57:521-4.
- Pesu M, Candotti F, Husa M, Hofmann SR, Notarangelo LD, and O'Shea JJ. Jak3, severe combined immunodeficiency, and a new class of immunosuppressive drugs. 2005 *Immunol. Rev.* 203:127-142.
- 55 Pesu, M., Laurence, A., Kishore, N., Zwillich, S., Chan, G., O'Shea, J.J., Therapeutic targeting of Janus kinases. *Immunol.* 2008 *Rev.* 223:132-142.
- Rochman, Y., Spolski, R., Leonard, W.J., New Insights into the regulation of T cells by gamma c family cytokines. 2009 *Nat. Rev. Immunol.* 9:480-90.
- 60 Sakaguchi, S., Yamaguchi, T., Nomura, T., Ono, M., Regulatory T cells and immune tolerance. 2008 *Cell* 133: 775-87.
- 65 Sato, N., Sabzevari, H., Fu, S., Ju, W., Bamford, R.N., Waldmann, T.A., and Tagaya, Y., Development of an IL-15-Autocrine CD8 T-cell Leukemia in IL-15 Transgenic mice requires the cis-expression of IL-15R α . *Blood* 2011 in

press.

- 5 Sugamura, K., Asao, H., Kondo, M., Tanaka, N., Ishii, N., Nakamura, M., Takeshita, T., The common gamma-chain for multiple cytokine receptors. 1995 Adv. Immunol. 59: 225-277.
- 5 Sugamura, K., Asao, H., Kondo, M., Tanaka, N., Ishii, N., Ohbo, K., Nakamura, M., Takeshita, T., The interleukin-2 receptor gamma chain: its role in the multiple cytokine receptor complexes and T cell development in XSCID. 1996 Annu. Rev. Immunol. 14:179-205.
- 10 Tagaya, Y., Burton, J.D., Miyamoto, Y., Waldmann, T.A., Identification of a novel receptor/signal transduction pathway for IL-15/T in mast cells. 1996 EMBO J. 15:4928-39.
- Tagaya, Y., Memory CD8 T cells now join "Club 21". 2010 J. Leuk. Biol. 87:13-15.
- 15 Takai, K., Sawasaki, T., and Endo. Y. The Wheat- Germ Cell-Free Expression System, 2010 Curr. Pharm. Biotechnol. 11:272-8.
- 20 Tanaka, T., et al., A novel monoclonal antibody against murine IL-2 receptor beta-chain. Characterization of receptor expression in normal lymphoid cells and EL-4 cells. 1991 J. Immunol. 147:2222-28.
- 20 Takeshita, T., Asao, H., Ohtani, K., Ishii, N., Kumaki, S., Tanaka, N., Manukata, H., Nakamura, M., Sugamura, K., Cloning of the Gamma chain of the Human IL2 receptor. 1992 Science 257:379-382.
- 25 Waldmann, T.A., Anti-Tac (daclizumab, Zenapax) in the treatment of leukemia, autoimmune diseases, and in the prevention of allograft rejection: a 25-year personal odyssey. 2007 J. Clin. Immunol. 27: 1-18.

REIVINDICACIONES

1. Un péptido aislado o purificado, que comprende una secuencia de aminoácidos del núcleo de la caja γ I-K-E-F-L-Q-R-F-I-H-I-V-Q-S-I-I-N-T-S (Id. de Sec. nº: 1) (BNZ- γ), y en el que el péptido puede inhibir la actividad de una o más citocinas γ seleccionadas del grupo que consiste en: IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 o IL-21.
2. El péptido aislado o purificado de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el péptido consiste esencialmente de la secuencia de aminoácidos I-K-E-F-L-Q-R-F-I-H-I-V-Q-S-I-I-N-T-S (Id. de Sec. nº: 1) (BNZ- γ).
3. El péptido aislado o purificado de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que el péptido inhibe la actividad de IL-15 e IL-9.
4. Un método in vitro para bloquear la señalización de uno o más miembros de la familia de citocinas γ , que comprende poner en contacto una célula con el péptido aislado o purificado de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
5. Un método in vitro para inhibir la unión de citocinas γ a una subunidad γ que comprende poner en contacto una subunidad γ con el péptido aislado o purificado de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
6. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de un péptido aislado o purificado de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, y un vehículo, diluyente, excipiente farmacéuticamente aceptable o una combinación de los mismos.
7. Un péptido aislado o purificado de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, o una composición farmacéutica de la reivindicación 6 para su uso en la mejora o el tratamiento de una enfermedad mediada por citocinas γ , en la que la enfermedad mediada por citocinas γ se selecciona del grupo que consiste en: leucemia CD4, leucemia CD8, leucemia LGL, lupus eritematoso sistémico, síndrome de Sjogren, granulomatosis de Wegener, enfermedad celíaca, tiroiditis de Hashimoto, artritis reumatoide, enfermedad inflamatoria intestinal, diabetes mellitus, psoriasis, esclerosis múltiple, inflamación de los ojos, uveítis y enfermedad de injerto contra huésped (EICH).
8. Un péptido aislado o purificado de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, o una composición farmacéutica de la reivindicación 6 para su uso en la mejora o el tratamiento de una mielopatía asociada a HTLV-1 (HAM)/enfermedad asociada a paraparesia espástica tropical (TSP).
9. El péptido o la composición farmacéutica para usar de acuerdo con la reivindicación 8, en donde la enfermedad asociada a HAM/TSP se selecciona del grupo que consiste en: leucemia de células T adultas (ATL), mielopatía asociada a HTLV/paraparesia espástica tropical (HAM/TSP) y otras enfermedades inflamatorias no neoplásicas asociadas con HTLV, como uveítis (HU), artropatía, neumopatía, dermatitis, exocrinopatía y miositis.
10. Un péptido aislado o purificado de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, o una composición farmacéutica de la reivindicación 6 para su uso en la mejora o el tratamiento de una enfermedad respiratoria inflamatoria.
11. El péptido o composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 10, en donde la enfermedad respiratoria inflamatoria se selecciona del grupo que consiste en: asma, sinusitis, fiebre del heno, bronquitis, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), rinitis alérgica, otitis aguda y crónica y fibrosis pulmonar.
12. El uso de un péptido aislado o purificado de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, o una composición farmacéutica de la reivindicación 6 para un propósito cosmético, en el que el propósito cosmético se selecciona del grupo que consiste en: tratamiento de pérdida de cabello, mantenimiento de uñas y reducción en la aparición de envejecimiento.
13. Un péptido aislado o purificado de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, o una composición farmacéutica de la reivindicación 6 para su uso en la mejora o el tratamiento del acné o las quemaduras solares.
14. El péptido aislado o purificado de acuerdo con la reivindicación 2, en el que el péptido se conjuga en los extremos N, C o residuos laterales de proteínas/péptidos biológicos existentes, en donde las proteínas/péptidos biológicos existentes se seleccionan del grupo que consiste de, albúmina y región Fc de inmunoglobulina G (IgG), o el péptido aislado o purificado de acuerdo con la reivindicación 2, en donde el péptido se conjuga con el Polietilenglicol (PEG), o el péptido aislado o purificado de acuerdo con la reivindicación 2, en donde el péptido se conjuga con BSA.

Alineamiento de la secuencia de la región de la hélice D de la familia de citocinas γ C humanas

IL-15	I	K	E	F	L	Q	S	F	V	H	I	V	Q	M	F	I	N	T	S	stop		
Id. de Sec. n°:3																						
IL-2	I	V	E	F	L	N	R	W	I	T	F	C	Q	S	I	I	S	T	L	T	stop	
Id. de Sec. n°:4																						
IL-21	P	K	E	F	L	E	R	F	K	S	L	L	Q	K	M	I	H	Q	H	L	S	
Id. de Sec. n°:5																						
IL-4	L	E	N	F	L	E	R	L	K	T	I	M	R	E	K	Y	S	K	C	S	S	
Id. de Sec. n°:6																						
IL-9	A	L	T	F	L	E	S	L	L	E	L	F	Q	K	E	K	M	R	G	M	R	
Id. de Sec. n°:7																						
IL-7	D	L	C	F	L	K	R	L	-	-	L	-	Q	E	I	K	T	C	W	N	K	I
Id. de Sec. n°:8																						

Fig.1A.

Secuencia consenso para la caja γc y la caja IL-2/IL-15

caja γc			D/E	F	L	Polar E QN	Polar S/R	No polar	No polar I,K	Alifático L/I	No polar	Q	Cargado	I/K					
caja IL-2/ IL-15												Q		I	T	S			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19

Fig.1B.

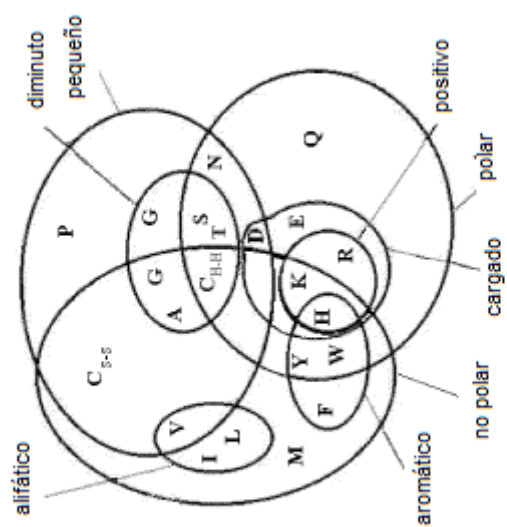


Fig.2.

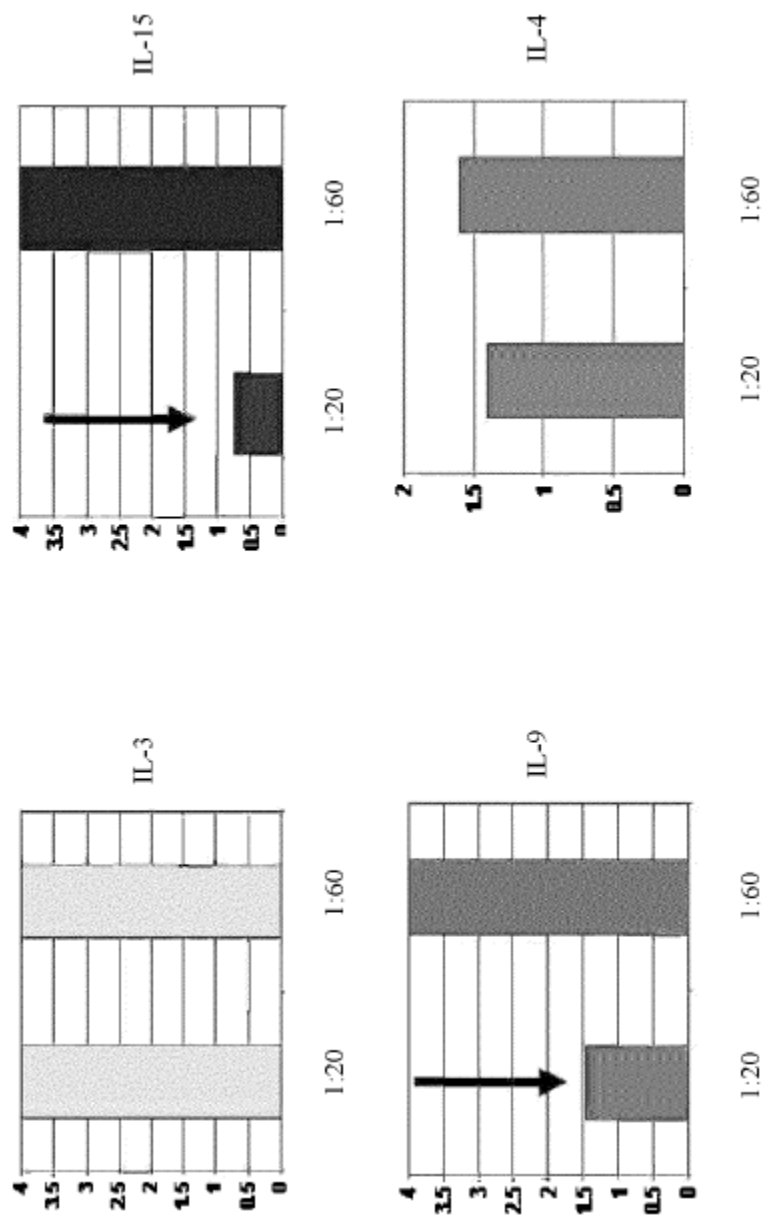


Fig.3A.

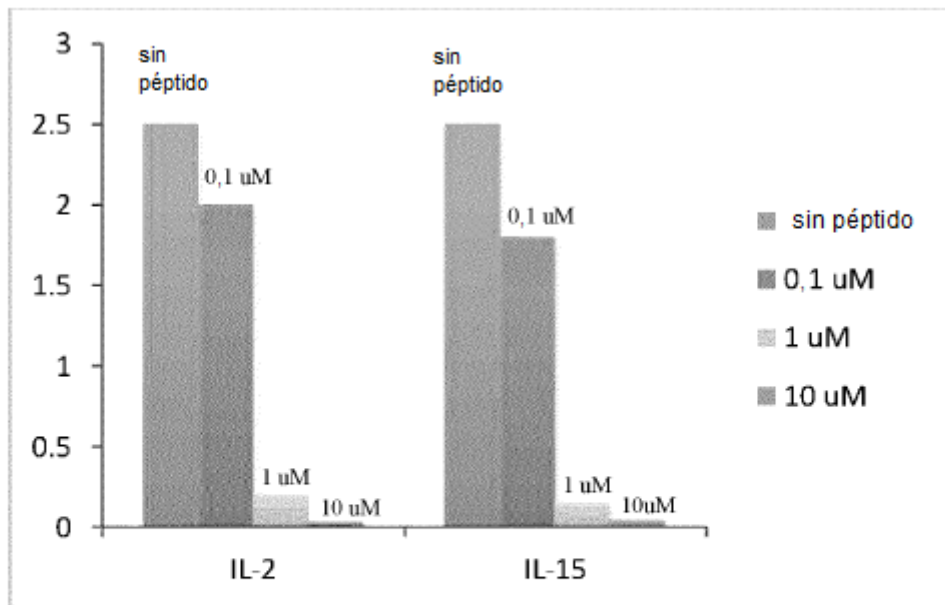


Fig. 3B



Fig. 3C

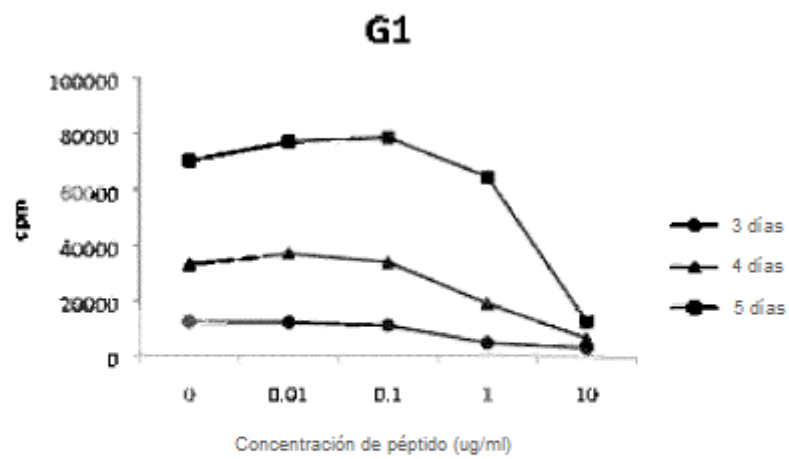


Fig. 4A

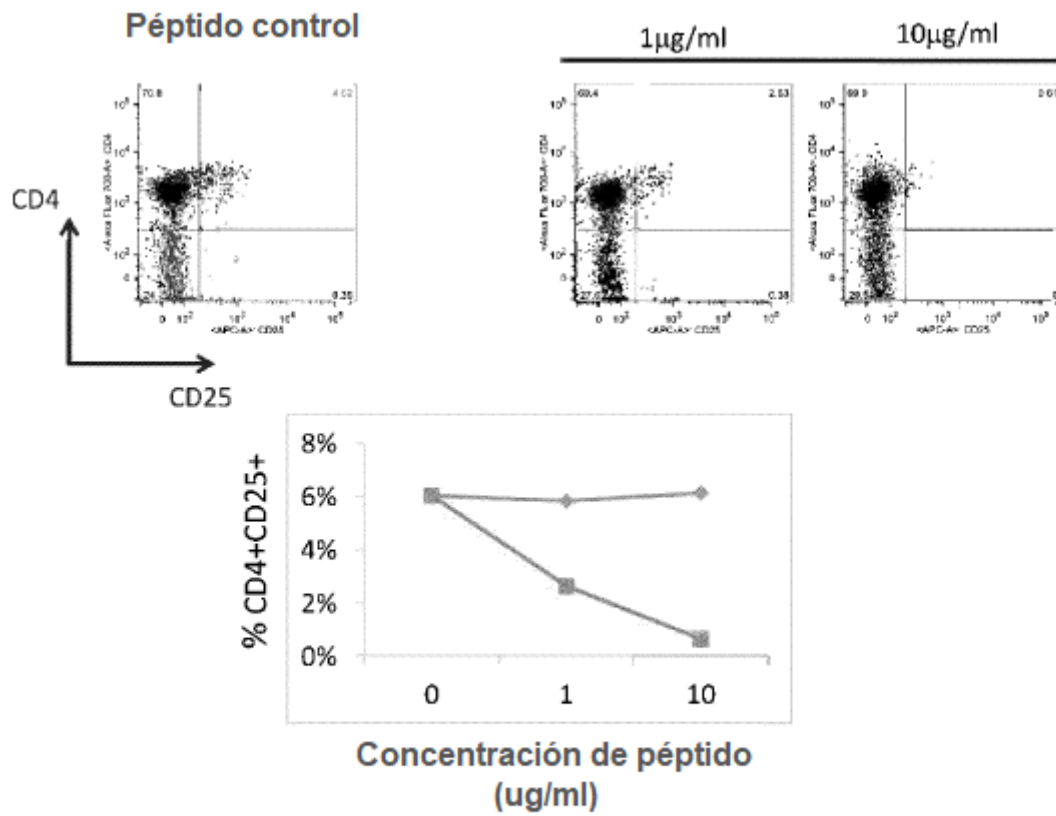


Fig. 4B

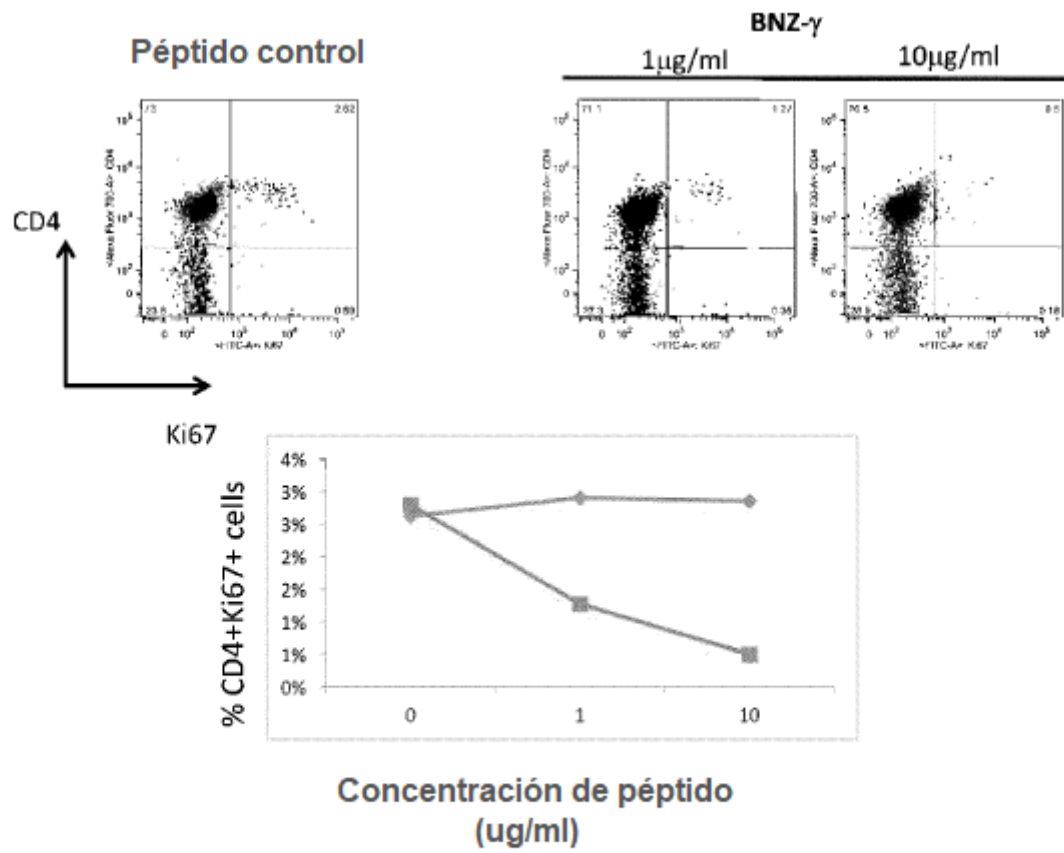


Fig. 4C

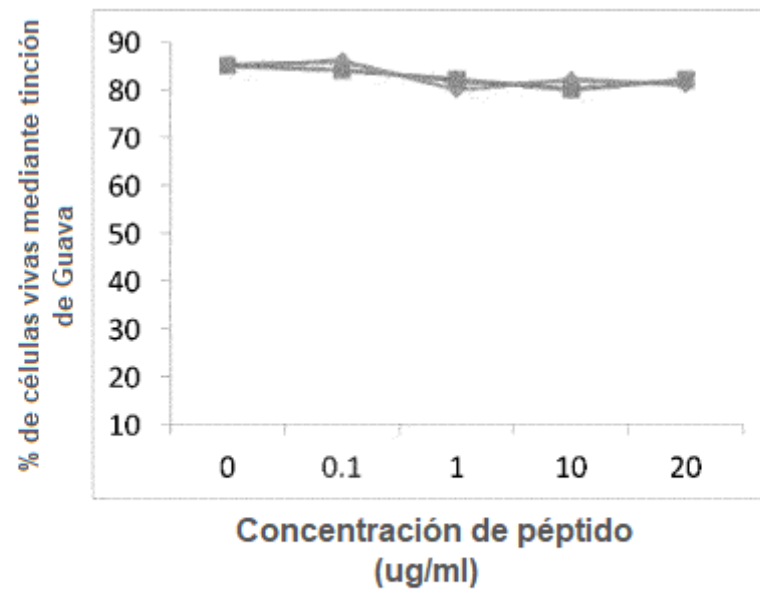


Fig. 4D