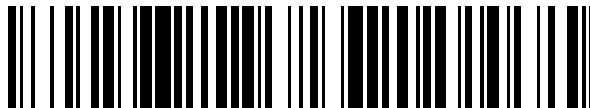


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 370 712**

51 Int. Cl.:
C12N 15/54 (2006.01) **A61K 39/395** (2006.01)
C12N 15/09 (2006.01)
C12N 15/11 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)
C12N 9/10 (2006.01)
C07K 16/40 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)
A61K 31/711 (2006.01)
A61K 31/713 (2006.01)
A61K 38/45 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03746399 .9**
96 Fecha de presentación: **15.04.2003**
97 Número de publicación de la solicitud: **1499729**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **26.01.2005**

54 Título: **DERIVADOS DE LA ENZIMA INDUCTORA DE NF-KAPPAB, SU PREPARACIÓN Y SU USO.**

30 Prioridad:
18.04.2002 IL 14921702
08.10.2002 IL 15218302

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
22.12.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
22.12.2011

73 Titular/es:
**YEDA RESEARCH AND DEVELOPMENT CO.,
LTD.
THE WEIZMANN INSTITUTE OF SCIENCE P.O.
BOX 95
76100 REHOVOT, IL**

72 Inventor/es:
**WALLACH, David;
RAMAKRISHNAN, Parameswaran y
SHMUSHKOVICH, Taisia**

74 Agente: **de Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 370 712 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

Derivados de la enzima inductora de NF-KAPPAB, su preparación y su uso

Campo de la invención

5 La invención se refiere al uso de NIK y moléculas relacionadas para la modulación de las actividades de señalización controladas por citoquinas, y algunas de tales moléculas nuevas.

Antecedentes de la invención

10 El factor nuclear κ B (NF- κ B) es una familia de complejos del factor de transcripción eucariótico inducible que participan en la regulación de la respuesta inmunitaria, el crecimiento celular, y la supervivencia [Ghosh et al. 1998]. Los factores NF- κ B son secuestrados normalmente en el compartimento citoplásmico por asociación física con una familia de inhibidores ricos en anquirina citoplásmica denominados I κ B, incluyendo I κ B α y proteínas relacionadas [Baldwin et al. 1996]. En respuesta a diversos estímulos, incluyendo las citoquinas, los mitógenos, y ciertos productos génicos virales, el I κ B es rápidamente fosforilado en las serinas 32 y 36, ubiquitinado y después degradado por el proteosoma 26S, que permite translocar al núcleo el NF- κ B liberado y participar en la transactivación del gen diana [Mercurio et al 1999, Pahl et al 1999]. Recientes estudios de clonación molecular han
15 identificado una quinasa de I κ B de múltiples subunidades que media la fosforilación inducida por la señal de I κ B. La IKK se compone de dos subunidades catalíticas, IKK α e IKK β , y una subunidad reguladora IKK γ . La actividad catalítica tanto de IKK α como de IKK β puede ser activada por una multitud de inductores de NF- κ B diferentes, incluyendo las citoquinas inflamatorias, el factor de necrosis tumoral y la interleuquina-1, el receptor de células T y la proteína co-estimuladora de las células T, CD28 [Karin et al 2000].

20 La quinasa inductora de NF- κ B, NIK, (MAP3K14) es una proteína quinasa activada por mitógeno (MAP3K) que fue descubierta por los autores de la presente solicitud en 1996 (documento WO 9737016) mientras escrutaban en busca de proteínas que se unían a la proteína adaptadora asociada al receptor TNF TRAF2 [Rothe et al. 1994, Takeuchi et al. 1996]. La activación marcada de NF- κ B tras la expresión en exceso de esta proteína quinasa, y la inhibición eficaz de la activación de NF- κ B en respuesta a una variedad de agentes inductores (LMP1, TNFR1, TNFR2, RANK, hTollR, CD3/CD28, interleuquina-1R, Tax de virus linfotrópico de células T humanas-1, LPS y otros [Mlinin et al. 1997, Sylla et al 1998, Darnay et al. 1999, Lin et al. 1999, Geleziunas et al. 1998] tras la expresión de mutantes NIK catalíticamente inactivos sugirieron que NIK participa en la señalización para la activación de NF- κ B [Mlinin et al. 1997].

30 La desorganización dirigida del gen NIK [Yin et al 2001] y el estudio de una cepa de ratón de origen natural con una mutación puntual de sentido erróneo en NIK (glicina a arginina en el codón 855 de mNIK) [Shinkaura et al. 1999] revelaron un papel esencial de NIK en el desarrollo de órganos linfoides, de este modo la cepa mutante de ratones se ha denominado ratones "con alinfoplasia (aly)". Los ratones tanto alylaly como con el gen NIK desactivado manifiestan una ausencia generalizada de ganglios linfáticos y de placas de Peyer, arquitecturas esplénicas y tímicas desorganizadas, e inmunodeficiencia cuyos rasgos más resilientes son niveles bajos de Ig en suero y carencia de rechazo a injertos [Shinkaura et al. 1999]. Estas anomalías reflejan aparentemente una señalización aberrante por una variedad de receptores. Las deficiencias evolutivas de los ratones mutantes para NIK se asemejan a aquellas encontradas en ratones carentes del receptor de LT β (LT β R) sugiriendo que NIK participa en la señalización por este receptor concreto. Se pudo demostrar que el deterioro de la capacidad proliferativa de las células B en los ratones alylaly se corresponde con una respuesta deficiente de estas células a LPS y CD40L [Garceau et al. 2000], y la presencia de cantidades excesivas de células B1 en la cavidad peritoneal de los ratones pudo ser adscrita a defectos en el alojamiento de células peritoneales en el sistema tisular linfático asociado al intestino como consecuencia de una señalización deficiente de receptor de quimioquina en el tejido linfoide secundario [Fagarasan et al. 2000].

45 Aparte de estas y probablemente otras contribuciones a la regulación del desarrollo y la función del sistema inmunitario, también parece que NIK está implicado en la regulación de diferentes funciones no inmunitarias. Los ratones alylaly (aunque no los que tienen el gen NIK desactivado) muestran un desarrollo deficiente de la glándula mamaria [Miyawaki 1994]. Por otra parte, estudios in vitro implicaron a NIK en la señalización que conduce a la diferenciación de las células de la musculatura esquelética [Canicio et al. 2001] y en la supervivencia y diferenciación de las neuronas [Foher et al 2000].

50 Coincidiendo con el papel sugerido de NIK como mediador de la activación de NF- κ B, los fibroblastos derivados de ratones alylaly y NIK-/- no lograban activar NF- κ B en respuesta a la activación de LT β R. Por otra parte, la regulación al alza por LT β R de VCAM-1, que se produce por medio de la activación de NF- κ B, es anómala en fibroblastos embrionarios murinos alylaly [Matsumoto et al. 1999]. También se ha observado una fosforilación deficiente de I κ B en respuesta a linfocitos B alylaly para la ligación a CD40. En contraste, en células dendríticas de estos ratones la fosforilación de I κ B inducida por CD40 parecía normal [Garceau et al 1998]. Las células peritoneales alylaly también son incapaces de responder a la quimioquina SLC con un incremento de la actividad de NF- κ B [Fagarasan et al. 2000]. Sin embargo, en ninguna de las células examinadas hasta ahora se encontró que el efecto de TNF o IL-1 sobre la activación de NF- κ B fuera anulado por la mutación de NIK.

La evaluación del patrón de las especies de NF- κ B en órganos linfoides de ratones alylaly indicó que, aparte de su papel en la regulación de los complejos de NF- κ B compuesto de las proteínas Rel (A+p50) e I κ B, NIK también participa en el control de la expresión/activación de otras especies de NF- κ B. Muy notablemente, los linfocitos de los ratones alylaly fueron deficientes en p52, una especie de NF- κ B que se forma específicamente en linfocitos B maduros a través del procesamiento proteolítico de un precursor inactivo, p100 (NF- κ B2), sugiriendo una deficiencia en la conversión p100-p52 [Yamada et al. 2000]. En efecto, se ha demostrado que NIK participa en la fosforilación específica del sitio de p100. Ambos terminan directamente a través de la fosforilación de IKK α , que a su vez fosforila p100. Esta fosforilación sirve como disparador molecular para la ubiquitinación y el procesamiento activo de p100 para formar p52. Se encontró que esta actividad de procesamiento de p100 era anulada por la mutación aly [Xiao et al. 2001, Senftleben et al. 2001].

A la vista de la homología estructural de NIK con las MAP3K, se han realizado algunos intentos para explorar la implicación de NIK en las otras tres principales cascadas de proteína quinasa que se sabe que implican a las MAP3K (las cascadas de MAP quinasa: cascadas ERK, JNK y p38) [Akiba et al. 1998]. Aunque en ciertas células NIK parece no participar en ninguna de estas cascadas, algunas otras células (PC12) parecen implicar a NIK en la cascada ERK [Fochr et al. 2000].

Asimismo se ha presentado la evidencia de que en ciertas células NIK puede participar en la señalización para la fosforilación de Jun, la diana aguas abajo de la cascada JNK, de un modo que es independiente de esta cascada concreta [Akiba et al. 1998, Natoli et al. 1997]. En conjunto, estos descubrimientos indican que NIK sirve en efecto como mediador de la activación de NF- κ B, pero también puede servir para otras funciones, y que ejerce estas funciones de una manera específica de la célula y del receptor.

Como otras MAP3K, NIK puede ser activada como consecuencia de la fosforilación del "bucle de activación" dentro de la molécula de NIK. En efecto, la mutación de un sitio de fosforilación dentro de este bucle (Thr-559) evita la activación de NF- κ B tras la expresión en exceso de NIK [Lin et al. 1999]. Además, la actividad de NIK parece estar regulada a través de la capacidad de las regiones aguas arriba y aguas abajo de este motivo quinasa para unirse entre sí. Se ha demostrado que la región C-terminal de NIK aguas abajo de su radical quinasa es capaz de unirse directamente a IKK α [Regnier et al. 1997] así como a p100 [Xiao et al. 2001] y a TRAF2 [Malinin et al. 1997], estas interacciones se requieren aparentemente para la función de NIK en la señalización de NF- κ B. La región N-terminal de NIK contiene un dominio regulador negativo (NRD), que está compuesto por un motivo alcalino (BR) y un motivo de repetición rico en prolina (PRR) [Xiao et al. 2000]. Aparentemente, el NRD N-terminal interacciona con la región C-terminal de NIK en cis, inhibiendo de ese modo la unión de NIK a su sustrato (IKK α y p100). La NIK expresada ectópicamente parece formar espontáneamente oligómeros en los que estas uniones de las regiones N-terminal a C-terminal en cada molécula de NIK están aparentemente desorganizadas, y presentan un elevado nivel de actividad constitutiva [Lin et al. 1999]. La unión de la región C-terminal de NIK a TRAF2 (así como a otros TRAF) participa muy probablemente en el proceso de activación de NIK. No obstante, se desconoce su modo exacto de participación.

Del mismo modo todavía existe una información limitada de los mecanismos aguas abajo en la acción de NIK. Se ha presentado la evidencia de que NIK, a través de la unión de su región C-terminal a IKK α puede activar el complejo de la quinasa de I κ B (IKK). En efecto se ha demostrado que es capaz de fosforilar la serina 176 en el bucle de activación de IKK α y de ese modo de activarla [Ling et al. 1998]. Coherentemente con este modo de acción, los estudios de los mecanismos que explican la activación deficiente de NF- κ B por LT β R en fibroblastos embrionarios murinos de ratones alylaly (MEF) indican que la mutación de NIK anula la activación del signalosoma IKK y la consiguiente fosforilación de I κ B [Matsushima et al. 2001]. Estos descubrimientos no fueron apoyados, no obstante, por el análisis de MEF derivados de ratones NIK $^{-/-}$. Aunque los MEF carentes de NIK son incapaces de manifestar activación de NF- κ B en respuesta a LT β , no parecen responder normalmente a él en términos de fosforilación y degradación de I κ B [Yin et al. 2001]. De acuerdo con estos descubrimientos, NIK puede no participar en absoluto en la activación del complejo IKK por el LT β R pero en lugar de eso está implicado, en un mecanismo todavía desconocido en el control de la acción transcripcional del complejo de NF- κ B después de su translocación al núcleo. Todavía existen dudas en cuanto al modo en el cual NIK desencadena la fosforilación y el procesamiento de p100. Su capacidad para unirse a p100 directamente a través de su región C-terminal y fosforilarla sugiere que p100 sirve como un sustrato de NIK directo [Xiao et al. 2000]. Sin embargo, un estudio reciente ha sugerido que NIK media la fosforilación de p100 de un modo indirecto, a través de la fosforilación y por lo tanto la activación de IKK α que a su vez fosforila p100 [Senftleben et al. 2001].

Yamamoto y Gaynor revisaron el papel de NF- κ B en la patogénesis de las enfermedades humanas (Yamamoto y Gaynor 2001). La activación de la ruta de NF- κ B está implicada en la patogénesis de enfermedades inflamatorias crónicas, tales como el asma, la artritis reumatoide (véase Tak y Firestein, this Perspective series, ref. Karin et al. 2000), y la enfermedad inflamatoria intestinal. Además, la regulación alterada de NF- κ B puede estar implicada en otras enfermedades tales como la aterosclerosis (véase Collins y Cybulsky, this series, ref. Leonard et al. 1995) y la enfermedad de Alzheimer (véase Mattson y Camandola, this series, ref. Lin et al. 1999), en las cuales está implicada, al menos parcialmente, la respuesta inflamatoria. Finalmente, también se observan frecuentemente anomalías en la ruta de NF- κ B en una variedad de cánceres humanos.

Varias líneas de evidencia sugieren que la activación por NF- κ B de los genes de citoquina es un importante

colaborador en la patogénesis del asma, que se caracteriza por la infiltración de las células inflamatorias y la desregulación de muchas citoquinas y quimioquinas en el pulmón (Ling et al. 1998). Del mismo modo, la activación de la ruta de NF- κ B también juega probablemente un papel en la patogénesis de la artritis reumatoide. Las citoquinas, tales como el TNF- α , que activan NF- κ B son elevadas en el fluido sinovial de los pacientes con artritis reumatoide y contribuyen a los cambios inflamatorios crónicos y la hiperplasia sinovial observada en las articulaciones de estos pacientes (Malinin et al. 1997). La administración de anticuerpos dirigidos contra el TNF- α o un receptor de TNF- α truncado que se une al TNF- α puede mejorar considerablemente los síntomas de los pacientes con artritis reumatoide.

Los incrementos en la producción de citoquinas pro-inflamatorias tanto por linfocitos como por macrófagos también han sido implicados en la patogénesis de las enfermedades inflamatorias del intestino, incluyendo la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa (Matsumoto et al. 1999). Se observa activación de NF- κ B en especímenes de biopsia de la mucosa de pacientes con enfermedad de Crohn activa y colitis ulcerosa. El tratamiento de pacientes con enfermedades inflamatorias del intestino con esteroides disminuye la actividad de NF- κ B en especímenes de biopsia y reduce los síntomas clínicos. Estos resultados sugieren que la estimulación de la ruta de NF- κ B puede estar implicada en el aumento de respuesta inflamatoria asociada con estas enfermedades.

La aterosclerosis es desencadenada por numerosas agresiones al endotelio y la musculatura lisa de la pared del vaso dañado (Matsushima et al. 2001). Un gran número de factores de crecimiento, citoquinas, y quimioquinas liberadas de las células endoteliales, la musculatura lisa, los macrófagos, y los linfocitos está implicado en este proceso inflamatorio crónico y fibroproliferativo (Matsushima et al. 2001). La regulación por NF- κ B de los genes implicados en la respuesta inflamatoria y en el control de la proliferación celular juegan probablemente un importante papel en el inicio y el progreso de la aterosclerosis.

Finalmente, las anomalías en la regulación de la ruta de NF- κ B pueden estar implicadas en la patogénesis de la enfermedad de Alzheimer. Por ejemplo, la inmunorreactividad con NF- κ B se encuentra predominantemente en y cerca de los tipos de placas neuríticas tempranas en la enfermedad de Alzheimer, mientras los tipos de placas maduras muestran una actividad de NF- κ B enormemente reducida (Mercurio et al. 1999). De este modo, la activación de NF- κ B puede estar implicada en el inicio de las placas neuríticas y la apoptosis neuronal durante las fases tempranas de la enfermedad de Alzheimer. Estos datos sugieren que la activación de la ruta de NF- κ B puede jugar un papel en numerosas enfermedades que tienen un componente inflamatorio implicado en su patogénesis.

Además de un papel en la patogénesis de las enfermedades caracterizadas por incrementos en la respuesta inmunitaria e inflamatoria del anfitrión, la activación constitutiva de la ruta de NF- κ B también ha sido implicada en la patogénesis de algunos cánceres humanos. Frecuentemente se observan anomalías en la regulación de la ruta de NF- κ B en una variedad de malignidades humanas incluyendo leucemias, linfomas, y tumores sólidos (Miyawaki et al. 1994). Estas anomalías dan como resultado niveles constitutivamente elevados de NF- κ B en el núcleo de una variedad de tumores incluyendo cánceres de mama, ovario, próstata, y colon. Probablemente la mayor parte de estos cambios se debe a alteraciones en las proteínas reguladoras que activan las rutas de señalización que conducen a la activación de la ruta de NF- κ B. No obstante, las mutaciones que inactivan las proteínas I κ B además de la amplificación y los reordenamientos de los genes que codifican los miembros de la familia de NF- κ B pueden dar como resultado un aumento de los niveles nucleares de NF- κ B observados en algunos tumores.

La IL2 es una proteína de 133 aminoácidos (15,4 kDa) con un pI ligeramente alcalino. No presenta homología de secuencia con ningún otro factor. La IL2 murina y humana presenta una homología de aproximadamente 65 por ciento. La IL2 es sintetizada en forma de una proteína precursora de 153 aminoácidos funcionando los primeros 20 aminoácidos amino terminales como una secuencia señal secretora hidrófoba. La proteína contiene un único enlace disulfuro (posiciones Cys 58/105) esencial para la actividad biológica.

La IL2 tanto de ratón como humana ocasiona la proliferación de células T de las especies homólogas con una elevada eficacia. La IL2 humana también estimula la proliferación de células T de ratón a concentraciones similares, mientras la IL2 de ratón estimula las células T humanas con una eficacia menor (seis veces a 170 veces). La implicación de IL-2 en la autoinmunidad es controvertida (revisado por O'Shea et al. 2002). Es reconocido que la administración de IL-2 está asociada con una variedad de trastornos autoinmunitarios tales como la tiroiditis inmunitaria, la artritis reumatoide y otras artropatías. Sin embargo, los ratones carentes de IL-2 producen múltiples auto-anticuerpos, incluyendo anticuerpos anti-ADN. Aproximadamente la mitad mueren de anemia hemolítica autoinmunitaria y los supervivientes desarrollan enfermedad inflamatoria intestinal. Importanamente, la patología se corrige mediante la adición de IL-2 exógena. Esto indica un papel de IL-2 en el mantenimiento de la tolerancia periférica.

La IL2 es un factor de crecimiento para todas las subpoblaciones de linfocitos T. La subunidad del receptor IL2R-alfa se expresa en la leucemia de células T adultas (LTA). Puesto que las células leucémicas recién aisladas también secretan IL2 y responden a ella, IL2 puede funcionar como un modulador del crecimiento autocrino para estas células capaces de empeorar la LTA.

La IL2 también promueve la proliferación de las células B activadas. Semejante actividad requiere la

presencia de factores adicionales, por ejemplo, IL-4. In vitro, IL-2 también estimula el crecimiento de células oligodendrogiales.

Por lo tanto, debido a sus efectos sobre las células T y las células B IL-2 es un regulador central de las respuestas inmunitarias. Asimismo juega un papel en las reacciones anti-inflamatorias en la hematopoyesis y en la vigilancia de tumores. IL2 estimula la síntesis de IFN-gama en leucocitos periféricos y también induce la secreción de IL-1, TNF-alfa y TNF-beta.

Las actividades biológicas de IL2 están mediadas por un receptor de membrana. Se distinguen tres tipos diferentes de receptores de IL2 que se expresan diferencialmente e independientemente. El receptor de IL2 de alta afinidad constituye aproximadamente un 10 por ciento de todos los receptores de IL2 expresados por las células. Este receptor es un complejo receptor de membrana que consiste en dos subunidades IL2R-alfa e IL2R-beta como dominios de unión al ligando y una cadena gamma como componente de señalización. IL2R-beta es expresado constitutivamente en linfocitos T en reposo, células NK, y otros numerosos tipos de células si bien la expresión de IL-2R-alfa se observa normalmente solo después de la activación celular. IL-2R-alfa, no obstante, es sintetizado constitutivamente por numerosas células tumorales y por células infectadas por HTLV-1.

La expresión del receptor de IL2 de monocitos es inducida por el IFN γ , de manera que estas células se vuelven citotóxicas para los tumores.

Las subunidades gamma murinas y humanas del receptor tienen aproximadamente una identidad de secuencia del 70 por ciento a los niveles de nucleótidos y aminoácidos. Esta subunidad es requerida para la generación de receptores de IL2 de afinidad elevada e intermedia pero no se une a IL2 por sí misma. Estos dos tipos de receptor consisten en un heterotrímero alfa-beta-gamma y un heterodímero beta-gamma, respectivamente. El gen que codifica la subunidad gamma del receptor de IL2 se cartografía en el cromosoma humano Xq13, abarca aproximadamente 4,2 kb y contiene ocho exones. Las relaciones con los marcadores en los estudios de ligación sugieren que este gen y SCIDX1, el gen para la inmunodeficiencia combinada severa ligada a X, tienen la misma localización. Por otra parte, en cada uno de 3 pacientes no relacionados con SCID ligada a X, se observó una mutación diferente en el gen IL2R-gamma.

La inmunodeficiencia combinada severa ligada a X (XSCID) es una enfermedad rara y potencialmente fatal causada por mutaciones de la cadena IL2R γ , el gen que codifica la cadena IL-2R γ , un componente de múltiples receptores de citoquinas que son esenciales para el desarrollo y la función de los linfocitos (Noguchi et al. 1993). Hata la fecha, se han publicado más de 100 mutaciones diferentes de IL2RG que producen XSCID. Los estudios recientes de desactivación de genes indican un papel fundamental de la *cyc* en la linfopoyesis [DiSanto et al 1995].

La cadena IL-2R γ es una subunidad de los complejos receptores de IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-13, IL-15 e IL-21 por lo que es apodada ahora como "cadena γ común" (*cyc*).

El documento EP 0578932 hace referencia a la cadena gamma común completa y especialmente al dominio N-terminal extracelular.

Coincidiendo con la implicación de IL-2 en la autoinmunidad existe la necesidad de un modulador de la actividad de IL-2 para evitar o aliviar dichas enfermedades.

Compendio de la invención

La presente invención se refiere al uso de NIK o una muteína, variante, proteína de fusión, derivado funcional, derivado permutado circularmente o fragmento del mismo, preferiblemente los fragmentos comprendidos en el SEQ ID NO: 19, el SEQ ID NO: 18, y el mutante AlyNIK, para modular la interacción entre la cadena gamma común de IL-2R (*cyc*) y NIK y preferiblemente para los fragmentos comprendidos en el SEQ ID NO: 19, el SEQ ID NO: 18, y para el mutante AlyNIK.

Además, la invención se refiere al uso de un ADN que codifica NIK de acuerdo con la invención o su antisentido, anticuerpos específicos de NIK, para modular la interacción entre la cadena gamma común de IL-2R (*cyc*) y NIK.

En otro aspecto, la presente invención hace referencia al uso de NIK o una muteína, variante, proteína de fusión, derivado funcional, derivado permutado circularmente o fragmento del mismo, preferiblemente los fragmentos comprendidos en el SEQ ID NO: 19, el SEQ ID NO: 18, y el mutante AlyNIK, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad, en la que la señalización estimuladora de citoquina a través *cyc* de IL-2R está implicada en la patogénesis de la enfermedad.

Por añadidura, la invención se refiere al uso de un ADN que codifica NIK de acuerdo con la invención o su antisentido, de anticuerpos específicos de NIK, para el tratamiento de una enfermedad, en la que la señalización estimuladora de citoquina a través de *cyc* de IL-2R está implicada en la patogénesis de la enfermedad, para inhibir la señalización a través de *cyc* de IL-2R.

La invención también proporciona métodos para el tratamiento de una enfermedad que implica la señalización de una citoquina a través de cyc de IL-2R en la patogénesis de dicha enfermedad, concretamente IL-2 o IL-15, que comprende la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de NIK o una muteína, variante, proteína de fusión, derivado funcional, derivado permutado circularmente o fragmento del mismo, preferiblemente los fragmentos comprendidos en el SEQ ID NO: 19, el SEQ ID NO: 18, y el mutante AlyNIK, en un sujeto que lo necesite

Por añadidura, la invención se refiere a los métodos para el tratamiento de una enfermedad que implica la señalización de una citoquina a través de cyc de IL-2R en la patogénesis de dicha enfermedad que comprende la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de ADN que codifica NIK de acuerdo con la invención o su antisentido o anticuerpos específicos de NIK.

Por otra parte, la presente invención hace referencia a una composición farmacéutica que comprende NIK o una muteína, variante, proteína de fusión, derivado funcional, derivado permutado circularmente o fragmento del mismo, preferiblemente los fragmentos comprendidos en el SEQ ID NO: 19 y el SEQ ID NO: 18, y el mutante AlyNIK, para modular la interacción entre la cadena gamma común de IL-2R (cyc) y NIK, donde una señalización estimuladora de citoquina a través de cyc de IL-2R está implicada en la patogénesis de la enfermedad, una señalización estimuladora de citoquina a través de cyc de IL-2R está implicada en la patogénesis de la enfermedad o la interacción entre cyc y NIK está implicada en la patogénesis de una enfermedad.

Por añadidura la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende un ADN que codifica NIK de acuerdo con la invención o su antisentido, anticuerpos específicos de NIK o una molécula pequeña obtenible escrutando productos de química combinatoria en un sistema de luciferasa, para el tratamiento de una enfermedad, donde una señalización estimuladora de citoquina a través de cyc de IL-2R está implicada en la patogénesis de la enfermedad, para modular la interacción entre la cadena gamma común de IL-2R (cyc) y NIK, donde una señalización estimuladora de citoquina a través de cyc de IL-2R está implicada en la patogénesis de la enfermedad, una señalización estimuladora de citoquina a través de cyc de IL-2R está implicada en la patogénesis de la enfermedad o la interacción entre cyc y NIK está implicada en la patogénesis de la enfermedad.

En otro aspecto, la presente invención hace referencia a un fragmento polipeptídico de NIK, que comprende el dominio de unión a la cadena gamma común de cyc de IL-2R (cyc), o una muteína, variante, proteína de fusión, derivado funcional, derivado permutado circularmente o fragmento del mismo, preferiblemente los fragmentos comprendidos en el SEQ ID NO: 19, el SEQ ID NO: 18, y el mutante AlyNIK, para modular la interacción entre la cadena gamma común de IL-2R (cyc) y NIK y preferiblemente a los fragmentos comprendidos en el SEQ ID NO: 19, o el SEQ ID NO: 18, y al mutante AlyNIK, un ADN que codifica los polipéptidos de la invención, un vector que comprende el ADN, células anfitrionas que comprenden el vector y un método para la producción de un fragmento polipeptídico de NIK de acuerdo con la invención, la célula de la invención y la recolección del polipéptido producido.

Además, la presente invención proporciona anticuerpos, policlonales o monoclonales, anticuerpos, quiméricos, anticuerpos totalmente humanizados, anticuerpos anti-Id, anticuerpos intracelulares o sus fragmentos que reconocen específicamente y se unen al fragmento polipeptídico de NIK de la invención. Adicionalmente se describen moléculas pequeñas capaces de inhibir la interacción NIK-cyc obtenibles escrutando moléculas preparadas mediante química combinatoria en un sistema de luciferasa.

Por añadidura, la invención hace referencia a una composición farmacéutica que comprende un fragmento polipeptídico de NIK, preferiblemente los fragmentos comprendidos en el SEQ ID NO: 19, y en el SEQ ID NO: 18, al ADN que codifica los fragmentos o al ADN antisentido, a un vector que comprende el ADN o a anticuerpos de la invención.

En una realización, el fármaco se proporciona para el tratamiento de una enfermedad donde la interacción de NIK y cyc está implicada en la patogénesis de dicha enfermedad mientras en otra realización el fármaco se proporciona para el tratamiento de una enfermedad en la que la actividad de una citoquina que tiene la cadena gamma común en su receptor, tal como IL-2 e IL-15, está implicada en la patogénesis de la enfermedad.

La invención también proporciona el uso de un fragmento polipeptídico de NIK de la invención, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad, donde la actividad de una citoquina que tiene la cadena gamma común en su receptor, tal como IL-2 e IL-15, o donde la interacción de NIK y cyc está implicada en la patogénesis de dicha enfermedad.

En otro aspecto, la invención proporciona el uso de un fragmento de NIK, que comprende el dominio de unión a cyc (SEQ ID NO: 18), o una muteína, variante, proteína de fusión, derivado funcional, derivado permutado circularmente o fragmento del mismo, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o prevención de una enfermedad resultante de respuestas inmunitarias excesivas, tales como artritis reumatoide, osteoartritis, enfermedad inflamatoria intestinal, asma, infarto cardíaco, enfermedad de Alzheimer, o aterosclerosis.

En otro aspecto, la invención proporciona el uso de un fragmento de NIK, que comprende el dominio de unión a cyc (SEQ ID NO: 18), o una muteína, variante, proteína de fusión, derivado funcional, derivado permutado circularmente o fragmento del mismo, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o prevención de enfermedades autoinmunitarias tales como tiroiditis inmunitaria, artritis reumatoide y otras artropatías, anemia

hemolítica autoinmunitaria y enfermedad inflamatoria intestinal.

Por añadidura, la invención proporciona un método para el tratamiento y/o la prevención de una enfermedad en la que la activación de una citoquina, que tiene la cadena gamma común en su receptor (tal como IL-2 e IL-15), está implicada en la patogénesis de la enfermedad, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un fragmento polipeptídico de NIK, que comprende el dominio de unión a cyc (SEQ ID NO: 18), o una muteína, variante, proteína de fusión, derivado funcional, derivado permutado circularmente o fragmento del mismo a un sujeto que lo necesite.

En una realización adicional, la invención proporciona un método de tratamiento y/o prevención de una enfermedad en la que está implicada la activación de NF- κ B, tal como cáncer, artritis reumatoide, osteoartritis, enfermedad inflamatoria intestinal, asma, infarto cardíaco, enfermedad de Alzheimer, o aterosclerosis, y que comprende administrar a un anfitrión que lo necesite una cantidad eficaz de un fragmento de NIK, correspondiente al dominio de unión a cyc (SEQ ID NO: 18), o una muteína, variante, proteína de fusión, derivado funcional, derivado permutado circularmente o fragmento del mismo.

Por añadidura, la invención proporciona un método de tratamiento y/o prevención de una enfermedad resultante de respuestas inmunitarias excesivas, tales como artritis reumatoide, osteoartritis, enfermedad inflamatoria intestinal, asma, infarto cardíaco, enfermedad de Alzheimer, o aterosclerosis, que comprende administrar a un anfitrión que lo necesite una cantidad terapéuticamente eficaz de un polipéptido que comprende un fragmento de NIK, correspondiente al dominio de unión a cyc (SEQ ID NO: 18), o una muteína, variante, proteína de fusión, derivado funcional, derivado permutado circularmente o fragmento del mismo.

La invención también está caracterizada por las reivindicaciones.

Breve descripción de las figuras

La **Figura 1** muestra una representación esquemática de los dominios de cyc y los residuos en los que se introdujeron codones de terminación para generar mutantes por delección. L-Líder 1-23, ECD-dominio extracelular, TM-dominio transmembrana, ICD-dominio intracelular.

La **Figura 2** muestra los resultados sobre la interacción NIK-cyc en células de mamífero controlada mediante análisis de inmunoprecipitación. Se detectaron análisis de transferencia Western con anticuerpo anti-cyc de las siguientes muestras: 1- productos lisados de células T 293 transfectadas con pcDNA3cyc e inmunoprecipitadas con anti-cyc, 2- productos lisados de células T 293 transfectadas con pcDNA3cyc e inmunoprecipitadas con anticuerpo anti-NIK. 6- productos lisados de células T 293 transfectadas con pcS3MTNIK (que expresa NIK etiquetado con myc) y pcDNA3cyc y NIK inmunoprecipitados con anticuerpo anti-myc, 3- lo mismo que en 6 cambiando solamente pcS3MTNIK por pcS3MTNIKaly. 4- productos lisados de células T 293 transfectadas con pcdnNIK (dominio C-terminal de los residuos 624-947 de NIK) e inmunoprecipitadas con anticuerpo anti-cyc y 5- productos lisados de células T 293 transfectadas con pcdnNIK y pcDNA3cyc inmunoprecipitados con anticuerpos anti-NIK (no anticuerpo anti myc como en 3 y 6).

La **Figura 3** muestra los resultados sobre la interacción NIK-cyc en células de mamífero controlada mediante análisis de inmunoprecipitación. Análisis de transferencia Western de productos inmunoprecipitados y productos lisados de células T 293 totales detectados con anticuerpo anti-NIK. Las muestras analizadas fueron las siguientes: 3- producto lisado de células transfectadas con pcS3MTNIK inmunoprecipitadas con anti-NIK. 2- producto lisado de células transfectadas con pcS3MTNIK e inmunoprecipitadas con anticuerpo anti-cyc. 1- productos lisados de células transfectadas con pcS3MTNIK y con pcDNA3cyc e inmunoprecipitadas con anticuerpo anti cyc. 5- producto lisado de células no transfectadas. 4 y 6- productos lisados de células transfectadas con pcS3MTNIK y con pcDNA3cyc o células transfectadas con pcS3MTNIK solo, respectivamente, antes de la inmunoprecipitación.

La **Figura 4** muestra el efecto dependiente de la concentración de cyc sobre la activación de NF- κ B inducida por NIK. La activación de NF- κ B es controlada por medio del análisis informador con luciferasa (para los detalles véase el Ejemplo 10). La activación de NF- κ B en células T 293 fue inducida por la expresión en exceso de NIK. La expresión de luciferasa se controló en células transfectadas con los siguientes plásmidos: plásmido vacío (muestra pc), plásmido vacío y un plásmido que codifica la luciferasa bajo el control de un promotor inducible por NF- κ B (pcDNA3luciferasa, 0,5 μ g/pocillo) (muestra pc+luc), 1 μ g de pcS3MTNIK y pcDNA3luciferasa (muestra NIK 1 mcg), 1 μ g de pcS3MTNIK, 0,1 μ g/pocillo de pcDNA3cyc y pcDNA3luciferasa (muestra NIK+cgc 0,1 mcg), 1 μ g de pcS3MTNIK, 0,5 μ g/pocillo de pcDNA3cyc y pcDNA3luciferasa (muestra NIK+cgc 0,5 mcg), y 1 μ g de pcS3MTNIK con 1 μ g/pocillo y pcDNA3cyc y pcDNA3luciferasa (muestra NIK+cgc 1 mcg).

La **Figura 5** muestra el efecto de un mutante negativo dominante de NIK (dnNIK, residuos 624-947) sobre la activación de NF- κ B intensificada por cyc. La activación de NF- κ B es controlada por medio del análisis informador con luciferasa (para los detalles véase el Ejemplo 10). La activación de NF- κ B en células T 293 fue inducida por la expresión en exceso de NIK. La expresión de luciferasa se controló en células transfectadas con los siguientes plásmidos: plásmido vacío (muestra pc), plásmido vacío y un plásmido que codifica luciferasa bajo el control de un promotor inducible por NF- κ B (pcDNA3luciferasa) (muestra pc+luc), pcS3MTNIK y pcDNA3luciferasa (muestra NIK), pcS3MTNIK, pcS3MTdnNIK y pcDNA3luciferasa (muestra NIK+dnNIK) pcDNA3cyc y pcDNA3luciferasa (muestra

cgc), pcS3MTNIK, pcDNA3cyc y pcDNA3luciferasa (muestra NIK+cgc), pcS3MTdnNIK, pcDNA3cyc y pcDNA3luciferasa (muestra cgc+dnNIK), pcS3MTNIK, pcDNA3cyc, pcS3MTdnNIK y pcDNA3luciferasa (muestra NIK+cgc+dnNIK). Se utilizaron pcS3MTdnNIK, pcS3MTNIK y pcDNA3cyc a una concentración de 1,1 y 0,1 µg/pocillo respectivamente.

5 La **Figura 6** muestra el efecto de cyc sobre la activación de NF-κB inducida por el mutante NIKaly. La activación de NF-κB es controlada por medio del análisis informador con luciferasa (para los detalles véase el Ejemplo 10). La activación de NF-κB en las células es inducida expresando en exceso NIK. La expresión de la luciferasa fue controlada en células T 293 transfectadas con los siguientes plásmidos: plásmido vacío (muestra pc), plásmido vacío y un plásmido que codifica luciferasa bajo el control de un promotor inducible por NF-κB (pcDNA3luciferasa) (muestra pc+luc), pcS3MTNIK y pcDNA3luciferasa (muestra NIK), pcDNA3luciferasa y pcDNA3cyc (muestra cgc), pcS3MTNIK, pcDNA3cyc y pcDNA3luciferasa (muestra NIK+cgc), 1 µg de pcS3MTalyNIK y pcDNA3luciferasa (muestra alyNIK) y pcS3MTalyNIK, pcDNA3cyc y pcDNA3luciferasa (muestra alyNIK+cgc). Se utilizaron pcS3MTalyNIK, pcS3MTNIK y pcDNA3cyc a una concentración de 1,1 y 0,1 µg/pocillo respectivamente.

15 La **Figura 7** muestra el efecto de un polipéptido de 41 aminoácidos derivado del extremo distal de la membrana de cyc (41MDD) sobre la activación de NF-κB inducida por NIK y la intensificación por cyc completa. La activación de NF-κB es controlada por medio del análisis de informador luciferasa (para los detalles véase el Ejemplo 10). La activación de NF-κB en células T 293 fue inducida expresando en exceso NIK. La intensificación de la inducción de NF-κB se obtiene expresando en exceso NIK y expresando la cyc completa a una baja concentración. La expresión de la luciferasa fue controlada en células transfectadas con los siguientes plásmidos: plásmido vacío (muestra pc), plásmido vacío y un plásmido que codifica luciferasa bajo el control de un promotor inducible por NF-κB (pcDNA3luciferasa) (muestra pc+luc), pcS3MTNIK y pcDNA3luciferasa (muestra NIK), pcS3MTNIK, pcDNA3cyc y pcDNA3luciferasa (muestra NIK+cgc), pcS3MTNIK, un plásmido que expresa GST (pGST) y pcDNA3luciferasa (muestra NIK+GST), pcS3MTNIK, pcDNA3cyc, pcGST y pcDNA3luciferasa (muestra NIK+GST+cgc), pcS3MTNIK, pcDNA3cyc, pcGST-41MDD y pcDNA3luciferasa (muestra NIK+cgc+41GST). Se utilizaron los plásmidos pcS3MTNIK, pcDNA3cyc, pcGST-41MDD y pcDNA3luciferasa a concentraciones de 0,5, 0,05, 2 y 0,5 µg/ml respectivamente.

20 La **Figura 8** muestra el efecto de los mutantes por delección de cyc, suprimidos en el extremo C-terminal de la proteína, y sobre la activación de NF-κB inducida por NIK. La activación de NF-κB es controlada por medio del análisis de informador de luciferasa (para los detalles véase el Ejemplo 10). La activación de NF-κB en células Hela fue inducida expresando en exceso NIK. La expresión de la luciferasa fue controlada en células transfectadas con los siguientes plásmidos: plásmido vacío y un plásmido que codifica luciferasa bajo el control de un promotor inducible por NF-κB (pcDNA3luciferasa) (muestra pc+luc), pcS3MTNIK y pcDNA3luciferasa (muestra NIK), pcS3MTNIK, pcDNA3cyc y pcDNA3luciferasa (muestra NIK+cgc), pcS3MTNIK, pcDNA3cyc357 y pcDNA3luciferasa (muestra NIK+1-357), pcS3MTNIK, pcDNA3cyc341 y pcDNA3luciferasa (muestra NIK+1-341), pcS3MTNIK, pcDNA3cyc325 y pcDNA3luciferasa (muestra NIK+1-325) y pcS3MTNIK, pcDNA3cyc303 y pcDNA3luciferasa (muestra NIK+1-303). Los plásmidos pcS3MTNIK, pcDNA3cyc/suprimido, pcDNA3luciferasa, fueron utilizados todos a la misma concentración de 0,5 g/ml. La cantidad total de ADN utilizada fue normalizada con plásmido vacío pcDNA3.

30 La **Figura 9** muestra el efecto de cyc sobre la actividad quinasa in vitro de NIK. Las células T 293 fueron transfectadas con 10 µg de pcDNA3cyc (Línea 1), 10 µg de pcDNA3cyc y 10 µg de pcS3MTNIK (Línea 2), 10 µg de pcS3MTNIK (Línea 3) o 10 µg de pcS3MTNIK y 10 µg de un plásmido que codifica la quinasa IKK1 (pIKK1) (Línea 4). Veinticuatro horas más tarde, las células fueron cosechadas, lisadas y la inmunoprecipitación se llevó a cabo con anticuerpo anti-NIK de conejo pre-adsorbido en cuentas de proteína A-sefarosa. La reacción con quinasa se realizó con 5 µci de ATPγ como se ha descrito previamente (Uhlík et al. 1998).

35 La **Figura 10** muestra el efecto de la expresión en exceso del ICD completo de cyc o su dominio distal de la membrana de 41 aminoácidos sobre la activación de NF-κB inducida por medio del receptor de LTβ. La activación de NF-κB es controlada por medio del análisis del informador de luciferasa (para los detalles véase el Ejemplo 10). La activación de NF-κB en fibroblastos embrionarios de ratón fue inducida con LTβ. La expresión de luciferasa fue controlada en células transfectadas con los siguientes plásmidos: plásmido vacío (muestra pc), un plásmido que expresa GST (pcGST) y pcDNA3luciferasa (muestra pcGST+luc), un plásmido que codifica la proteína de fusión de GST con el dominio intracelular de cyc (pGSTICcyc) y pcDNA3luciferasa (muestra GSTICcgc+luc) y un plásmido que codifica la fusión de GST con el polipéptido 41 del dominio distal de la membrana de cyc (pGST41MDD) y pcDNA3luciferasa (muestra GST-41MDD+luc). Los plásmidos pGSTICcyc, pGST41MDD, se utilizaron a 1 µg/pocillo y pcDNA3luciferasa se utilizó a una concentración de 0,5 µg/pocillo. El plásmido vacío, pcDNA3 se utilizó como portador para normalizar la concentración total de ADN a 2 µg/pocillo. Los niveles de actividad luciferasa se expresan en unidades de luz relativa (ULR).

La **Figura 11** muestra la secuencia de aminoácidos del dominio intracelular de cyc.

La **Figura 12** muestra la secuencia de aminoácidos del polipéptido de 41 aminoácidos desde el dominio distal de la membrana de cyc (41MDD).

La **Figura 13** muestra la secuencia de nucleótidos del dominio intracelular de *cyc* (*cyclCD*).

La **Figura 14** muestra la secuencia de nucleótidos del polipéptido 41 desde el dominio distal de la membrana de *cyc* (41MDD).

La **Figura 15** muestra la secuencia de 12 aminoácidos en el extremo C de *cyc* implicada en la unión a NIK.

5 La **Figura 16A** muestra la interacción de NIK y *cyc* endógenas. Se incubaron células mononucleares de sangre periférica (PMBC) (500×10^6 células) en presencia de IL-2 o IL-15, se lisaron y se sometieron a inmunoprecipitación (IP) con anticuerpos anti-*cyc* (para la inmunoprecipitación véase el Ejemplo 9). Las proteínas inmunoprecipitadas simultáneamente unidas a *cyc* fueron detectadas en transferencias Western (WB) utilizando anticuerpos relevantes. Los anticuerpos utilizados en las WB para detectar la inmunoprecipitación simultánea con *cyc* fueron ANTI-NIK, ANTI-IKK α (IKK-1), ANTI-IKK β (IKK2), y ANTI-IKK γ (NEMO). Las proteínas inmunoprecipitadas simultáneamente estaban en productos lisados de células sometidos a ensayo con una incubación entre 0 y cuatro horas con IL-2 y entre 0 y una hora con IL-15. Se utilizó una IgG no relevante para la inmunoprecipitación (IP) como control.

15 La **Figura 16B** demuestra que el signalosoma inmunoprecipitado simultáneamente con *cyc* es activo. Los productos inmunoprecipitados preparados como en la Figura 16A fueron sometidos a ensayo en un análisis de quinasa (véanse los detalles en el Ejemplo 11) utilizando GST-IKB α 1-54 como sustrato para la fosforilación.

Descripción detallada de la invención

La invención se refiere a la modulación de la interacción de la cadena gamma común de IL-2R (*cyc*) y NIK en las patologías que implican dicha interacción.

20 La invención se basa en el descubrimiento de que *cyc* y NIK interactúan, y de que esta interacción tiene un efecto sobre la actividad de NIK.

La interacción de *cyc* y NIK se detectó utilizando un fragmento C-terminal de NIK (624-947) como cebo en un escrutinio de doble híbrido de una genoteca de ADNc de médula ósea. Esta interacción fue confirmada mediante estudios de inmunoprecipitación simultánea llevados a cabo en productos lisados de células de mamífero que expresaban en exceso NIK y *cyc* y también mediante estudios de inmunoprecipitación simultánea en células que expresaban naturalmente NIK y *cyc*. Los estudios de inmunoprecipitación revelaron que *cyc* resulta eficazmente precipitada simultáneamente con el extremo C de NIK (624-947) o con la totalidad de NIK.

30 Se demostró que la interacción de *cyc* y NIK se produce no solamente en células de mamífero transfectadas que expresan en exceso NIK y *cyc*, sino también en células mononucleares de sangre periférica no transfectadas con NIK y *cyc* endógenas.

35 Se generaron múltiples mutantes por delección tanto de *cyc* como de NIK para definir los dominios de unión en ambas proteínas. Las interacciones fueron sometidas a ensayo por medio de ensayos de doble híbrido en levaduras y/o estudios de inmunoprecipitación (véanse los ejemplos de más abajo). Se encontraron dominios de *cyc* responsables de la unión a NIK en el dominio proximal de la membrana (MPD) de *cyc* que comprendía 44 residuos de aminoácido (desde el residuo 282 al 325), denominado 44MPD (véase el SEQ ID NO: 17) y, en el dominio distal de la membrana (MDD) que comprendía 41 aminoácidos (desde el residuo 329 al 369), denominado 41MDD (véanse el SEQ ID NO: 2 y la Figura 12). Cuando se suprimieron 12 aminoácidos en el extremo de *cyc* (residuos 358-369 de *cyc*, Fig 15, SEQ ID NO: 3 secuencia de nucleótidos en el SEQ ID NO: 4) del dominio intracelular de *cyc* (*cyclCD*), la unión a NIK disminuye en 50% indicando que estos residuos juegan un papel principal en la unión.

40 Además, se llevó a cabo la mutagénesis en los residuos localizados dentro del 41MDD, para definir los aminoácidos específicos que interactúan con NIK. La interacción de los motivos ricos en prolina en las proteínas de señalización con sus dominios cognados está bien documentada (Kay BK, Williamson MP, Sudol M. FASEB J 2000 Feb 14 (2): 231-421). El 20% de los aminoácidos de los 41 aminoácidos de *cyc* distales de la membrana son prolinas. Por lo tanto, se mutaron dos prolinas consecutivas a alanina en dos sitios diferentes de los 41 aminoácidos de *cyc* distales de la membrana: 1-PP 336, 337AA y 2-PP360, 361AA y sometió a ensayo el efecto de la mutación sobre la unión de NIK mediante el análisis de doble híbrido. Los resultados obtenidos de la mutagénesis de *cyc* demuestran que las prolinas de los residuos 360 y 361 son importantes para la unión a NIK. De este modo las muteínas de la presente invención conservan prolinas en los residuos 360 y 361.

50 Se demostró que un dominio de NIK, responsable de la unión a *cyc*, comprende 81 residuos de aminoácido desde el extremo C de NIK (desde el residuo 624 al 947), denominado NIK640-720 (véase el SEQ ID NO: 18). Se demostró que la interacción de *cyc* y NIK era funcionalmente significativa. Los análisis con genes informadores demostraron que *cyc* modula la activación de NF- κ B inducida por NIK. Es posible, en condiciones experimentales, inducir la activación de NF- κ B expresando en exceso NIK. La activación de NF- κ B puede ser controlada en células transfectadas con un constructo que codifica luciferasa bajo el control de un promotor inducible por NF- κ B. Utilizando este sistema de luciferasa, se controló la activación de NF- κ B en células que expresaban en exceso NIK solo o junto con diferentes concentraciones de *cyc* (para los detalles véanse los ejemplos de más abajo). Se encontró que la

modulación de NF- κ B depende de la concentración de NIK con respecto a la concentración de *cyc* dentro de las células (NIK/*cyc*). Por ejemplo, se observó la intensificación de la activación de NF- κ B mediada por NIK cuando NIK/*cyc* era mayor de 1, mientras se observó una inhibición de la activación de NF- κ B mediada por NIK cuando NIK/*cyc* era aproximadamente igual o inferior a 1.

5 Los estudios llevados a cabo con un mutante dominante negativo de NIK demostraron que la actividad intensificadora de NF- κ B de *cyc* es ejercida específicamente a través de NIK.

10 Uno de los fragmentos de *cyc* que comprendía el dominio de unión a NIK, 41MDD, fue sometido a ensayo para determinar la interferencia con la interacción de *cyc*-NIK y por lo tanto para modular la activación de NF- κ B mediada por NIK en el sistema de luciferasa. Para este fin, se midió la expresión de luciferasa (o la activación de NF- κ B) en células transfectadas que expresaban en exceso NIK y *cyc* a una razón superior a 1. En estas condiciones, *cyc* intensifica la activación de NF- κ B inducida por NIK. Se controló el efecto de 41MDD, que contenía la región de unión a NIK, en células que expresaban en exceso NIK y *cyc*. Se encontró que la expresión en exceso de 41MDD podía inhibir la activación de NF- κ B mediada por NIK, probablemente inhibiendo la interacción *cyc*-NIK.

15 Alternativamente, la expresión en exceso del extremo C de NIK (residuos 624-947), que comprende el dominio de unión a *cyc*, junto con *cyc* y NIK mostró efectos similares a los de 41MDD.

20 La activación de NIK parece tener requerimientos estructurales estrictos. Se encontró que un mutante de NIK, AlyNIK (glicina por arginina en el codón 860 en humano y en el codón 855 en ratón) se unía a *cyc* pero era incapaz de incrementar la activación de NF- κ B mediada por NIK. De este modo, incluso aunque tanto Aly-NIK como NIK de tipo salvaje mostraran unión a *cyc* y niveles similares de activación de NF- κ B tras la expresión en exceso, la expresión simultánea de *cyc* no intensificaba la activación de NF- κ B por Aly-NIK.

Estos resultados indican que se pueden utilizar AlyNIK o sus fragmentos para regular la interacción NIK-*cyc*.

25 La *cyc* sometida a delección progresiva en el dominio distal de la membrana, 1-357, 1-341, 1-325, 1-303, fue sometida a ensayo para determinar su capacidad para modular NF- κ B mediado por NIK en el sistema de luciferasa. Para este fin, se midieron la expresión de la luciferasa y la activación de NF- κ B en células transfectadas que expresaban en exceso NIK y *cyc* o mutantes por delección de *cyc* una razón de aproximadamente 1. En estas condiciones *cyc* inhibe la activación de NF- κ B inducida por NIK. Se encontró que la *cyc* completa y los fragmentos 1-357, 1-341 eran capaces de inhibir la activación de NF- κ B mediada por NIK mientras los mutantes que carecían del dominio de unión a NIK tales como 1-325 y 1-303 no tuvieron efecto alguno sobre la actividad de activación de NF- κ B mediada por NIK. La carencia de efecto de 1-325 y 1-303 confirma la implicación del dominio distal de la membrana de la interacción *cyc*-NIK y el papel de esta interacción en la modulación de NF- κ B.

30 Como se ha mencionado antes, la interacción de NIK y *cyc* conduce a la modulación de la actividad de NF- κ B. Un posible mecanismo que subyace a la modulación de la actividad de NIK por *cyc*, puede ser el aumento de fosforilación de NIK tras la interacción *cyc*/NIK. El análisis de quinasa *in vitro* mostró un aumento de tres veces por *cyc* de la auto-fosforilación y de la fosforilación por IKK1 de NIK. De este modo, el resultado obtenido en el análisis de quinasa *in vitro* apoya la hipótesis de que la modulación de la actividad de NIK por *cyc* puede ser intensificada por la fosforilación de NIK tras la interacción *cyc*/NIK.

35 La inducción del receptor de linfotóxina beta (LT β) por medio de este ligando da como resultado la activación de NF- κ B. Se ha sugerido en la literatura que NIK es activada induciendo el receptor LT β con su ligando. El efecto de la expresión en exceso del dominio intracelular del polipéptido *cyc* (*cyclCD*) o su dominio distal de la membrana 41 (41MDD) se sometió a ensayo cuando se activó NF- κ B disparando el receptor LT β y se cree que esta activación está mediada por la NIK endógena. La expresión de *ICDcyc* aumentó la activación de NF- κ B por LT β 2,5 veces, mientras la expresión de 41MDD inhibió un 50% la activación de NF- κ B por LT β . Estos resultados sugieren que la estimulación por linfotóxina y la modulación de NF- κ B implican la interacción *cyc*-NIK. Estos resultados sugieren que la estimulación por linfotóxina y la modulación de NF- κ B implican la interacción *cyc*-NIK. Estos resultados demuestran que el polipéptido *cyclCD* o 41 MDD pueden modular la señalización desencadenada por medio del receptor LT β y demuestran, una vez más, que el polipéptido *ICD* o sus fragmentos pueden servir como candidatos para el diseño de fármacos basado en péptidos. Tales fármacos pueden modular la acción de NIK y por lo tanto son valiosos en la prevención o el alivio de enfermedades en cuya patogénesis está implicada la acción de NIK. Se ha demostrado que NIK induce la activación de NF- κ B, de este modo se pueden utilizar los fragmentos de *cyc* de la invención para tratar y/o prevenir enfermedades en cuya patogénesis está implicado NF- κ B.

40 Los resultados obtenidos revelaron que la señalización por medio de *cyc* implica a NIK y el reclutamiento de proteínas del signalosoma y por consiguiente la modulación de NF- κ B. Por lo tanto los fragmentos de NIK, por ejemplo aquellos que comprenden el extremo C (desde el residuo 624 al 947) y NIK640-720, el dominio de unión a *cyc*, se podrían utilizar para modular la señalización a través de *cyc*.

55 Como se ha mencionado antes, la interacción de NIK endógena y *cyc* fue demostrada en células mononucleares de sangre periférica. Se encontró que en células mononucleares NIK está asociada constitutivamente con *cyc*, y tras la inducción por IL-2, los componentes del signalosoma IKK-1, IKK-2, y IKK-3 son

reclutados hacia el receptor de IL-2 a través de *cyc*. Se encontró que la cadena γ común del receptor de IL-2 se unía a NIK en una localización diferente, distinta de la región de unión a IKK-1. Se obtuvieron resultados similares tras la estimulación de las células con IL-15.

5 Se demostró que los componentes del signalosoma inmunoprecipitados simultáneamente con *cyc* tras la estimulación con IL-2 eran activos en un análisis de quinasa. De este modo, estos resultados demuestran que en condiciones fisiológicas, se produce la unión de *cyc* endógena a NIK, y que esta interacción está implicada en la actividad de NIK y en la activación de NF- κ B dependiente de NIK. Por lo tanto, la inhibición de la interacción de *cyc* y NIK puede llevar a la inhibición de la activación de NF- κ B.

10 Los resultados obtenidos demuestran que se requiere la interacción de NIK y los componentes del signalosoma con *cyc* para la señalización de IL-2. Por lo tanto, la inhibición de la interacción de *cyc* y NIK puede inhibir la señal de IL-2. De este modo, el dominio de unión a *cyc* de NIK, NIK640-720 o una muteína, proteína de fusión, derivado funcional, derivado permutado circularmente o fragmento del mismo pueden ser utilizados para inhibir la señalización de IL-2. Se obtuvieron resultados similares estimulando células mononucleares de sangre periférica con IL-15. De este modo los polipéptidos de la invención se pueden utilizar para tratar cualquier enfermedad en cuya patogénesis está implicada la activación de una citoquina, que tiene la cadena γ común en sus receptores o cualquier enfermedad en cuya patogénesis está implicada una señalización estimuladora de citoquina a través de *cyc*.

20 Alternativamente, estos polipéptidos de la invención se pueden utilizar para aumentar la actividad de las citoquinas para tratar cualquier enfermedad en la cual la activación de una citoquina, que tiene la cadena γ común en sus receptores puede curar o aliviar la enfermedad.

Los ejemplos de las citoquinas que utilizan *cyc* para la transducción de señales son IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-13, IL-15 e IL-21.

25 La invención se refiere al uso de NIK y a sus fragmentos y sus sales, derivados funcionales, precursores y fracciones activas así como sus mutantes activos, esto es, otras proteínas o polipéptidos en los que uno o más aminoácidos de la estructura son eliminados o sustituidos por otros aminoácidos o uno o más aminoácidos son añadidos a la secuencia con el fin de obtener polipéptidos o proteínas que tienen la misma actividad, tal como la modulación de la interacción *cyc*-NIK y/o la activación de NF- κ B y/o la señalización de *cyc* y comprende también las correspondientes "proteínas de fusión", esto es, polipéptidos que comprenden dichos polipéptidos o una mutación de los mismos fusionada con otra proteína. Dichos polipéptidos se pueden fusionar por lo tanto con otra proteína tal como, por ejemplo, una inmunoglobulina.

30 El término "sales" en la presente memoria hace referencia tanto a sales de grupos carboxilo como a sales de adición de ácido de grupos amino de dichos polipéptidos de la invención o muteínas de los mismos. Las sales de un grupo carboxilo se pueden formar mediante métodos conocidos en la técnica e incluyen sales inorgánicas, por ejemplo, sales de sodio, calcio, amonio, férricas o de cinc, y similares, y sales con bases orgánicas como las formadas, por ejemplo, con aminas, tales como trietanolamina, arginina o lisina, piperidina, procaína y similares. Las sales de adición de ácido incluyen, por ejemplo, sales con ácidos minerales tales como, por ejemplo, ácido clorhídrico o ácido sulfúrico, y sales con ácidos orgánicos tales como, por ejemplo, ácido acético o ácido oxálico. Por supuesto, cualquiera de tales sales debe tener una actividad esencialmente similar a la de dichos polipéptidos de la invención o sus muteínas, por ejemplo permitir la modulación de la interacción *cyc*-NIK y/o la activación de NF- κ B y/o la señalización de *cyc*.

35 La definición "derivados funcionales" según se utiliza en la presente memoria hace referencia a derivados que pueden ser preparados a partir de los grupos funcionales presentes en las cadenas laterales de los radicales de aminoácido o en los grupos N o C terminales de acuerdo con los métodos conocidos y están comprendidos en la invención cuando son farmacéuticamente aceptables, esto es, cuando no destruyen la actividad de la proteína o no confieren toxicidad a las composiciones farmacéuticas que los contienen. Tales derivados incluyen por ejemplo ésteres o amidas alifáticas de los grupos carboxilo y derivados N-acilados de grupos amino libres o derivados O-acilados de los grupos hidroxilo libres y se forman con grupos acilo como por ejemplo grupos alcanilo o grupos aroilo.

40 "Fragmento" de la proteína de la presente invención hace referencia a cualquier fragmento o precursor de la cadena polipeptídica del propio compuesto, solo o combinado con moléculas relacionadas o residuos unidos a ella, por ejemplo residuos de azúcares o fosfatos, o productos agregados de la molécula de polipéptido cuando tales fragmentos o precursores muestran la misma actividad de dichos polipéptidos de la invención, por ejemplo, permiten la modulación de la interacción *cyc*-NIK y/o la activación de NF- κ B y/o la señalización de *cyc*.

45 El término "permutado circularmente" según se utiliza en la presente memoria hace referencia a una molécula lineal en la cual los extremos se han unido entre sí, ya sea directamente o por medio de un conector, para producir una molécula circular, y después la molécula circular se abre en otra localización para producir una nueva molécula lineal con extremos diferentes de los extremos de la molécula original. Las permutaciones circulares incluyen aquellas moléculas cuya estructura es equivalente a una molécula que ha sido circularizada y después

abierta. De este modo, una molécula permutada circularmente puede ser sintetizada de novo en forma de una molécula lineal y nunca pasar por una etapa de circularización y apertura. La permutación circular concreta de una molécula se designa por medio de corchetes que contienen residuos de aminoácido entre los cuales se elimina el enlace peptídico. Las moléculas permutadas circularmente, que pueden incluir ADN, ARN, y proteína, son moléculas de cadena sencilla, que tienen sus extremos normales fusionados, a menudo con un conector, y contienen extremos nuevos en otra posición. Véase Goldenberg, et al. *J. Mol. Biol.*, 165: 407-413 (1983) y Pan et al. *Gene* 125: 111-114 (1993). La permutación circular es funcionalmente equivalente a tomar una molécula de cadena lineal, fusionar los extremos para formar una molécula circular, y después cortar la molécula circular en una localización diferente para formar una nueva molécula de cadena lineal con extremos diferentes. La permutación circular tiene de este modo el efecto de conservar esencialmente la secuencia y la identidad de los aminoácidos de una proteína mientras se generan nuevos extremos en diferentes localizaciones.

Los términos dicho "polipéptido y/o proteína" de la invención son intercambiables y hacen referencia a NIK y fragmentos de NIK que comprenden regiones responsables de la unión a *cyc* tales como el dominio C terminal y NIK640-720 y AlyNIK.

La presente invención también se refiere a muteínas de polipéptidos de invención, cuyas muteínas conservan esencialmente la misma actividad biológica de dicha proteína de la invención, por ejemplo, permiten la modulación de la interacción *cyc*-NIK y/o la activación de NF- κ B y/o la señalización de *cyc*, teniendo esencialmente solo las secuencias de origen natural de dichas proteínas de la invención. Tales "muteínas" pueden ser aquellas en las que hasta aproximadamente el 25% y preferiblemente menos del 12% de los residuos de aminoácido pueden ser suprimidos, añadidos o sustituidos por otros en el polipéptido, de manera que las modificaciones de este tipo no cambien esencialmente la actividad biológica de la muteína de la proteína con respecto a la propia proteína, por ejemplo, permitir la modulación de la interacción *cyc*-NIK y/o la activación de NF- κ B y/o la señalización de *cyc*.

Estas muteínas se preparan mediante síntesis conocidas y/o técnicas de mutagénesis dirigida al sitio, o cualquier otra de sus técnicas conocidas adecuadas.

Cualquiera de tales muteínas tiene preferiblemente una secuencia de aminoácidos suficientemente duplicada con respecto a la de NIK básica y los fragmentos de NIK que comprenden regiones responsables de la unión a *cyc* tales como el dominio C-terminal (desde el residuo 624 al 947), NIK640-720 y el mutante AlyNIK de manera que tengan una actividad esencialmente similar a ésta. De este modo, se puede determinar si cualquier muteína dada tiene esencialmente la misma actividad que la proteína básica de la invención por medio de la experimentación rutinaria que comprende someter dicha muteína a ensayos de actividad biológica mostrados en los Ejemplos de más abajo.

Las muteínas de la proteína que se pueden utilizar de acuerdo con la presente invención, o el ácido nucleico de las mismas, incluyen un grupo finito de NIK y fragmentos de NIK que comprenden regiones responsables de la unión de *cyc* tales como el dominio C-terminal y las secuencias correspondientes a NIK640-720 y AlyNIK como péptidos o polinucleótidos de sustitución que pueden ser obtenidos rutinariamente por un experto normal en la técnica, sin una experimentación indebida, basándose en las enseñanzas y pautas presentadas en la presente memoria. Para una descripción detallada de la química y la estructura de las proteínas, véanse Schulz, G. E. et al., *Principles of Protein Structure*, Springer-Verlag, Nueva York, 1978; y Creighton, T. E., *Proteins: Structure and Molecular Properties*, W. H. Freeman & Co., San Francisco, 1983. Para una presentación de las sustituciones de la secuencia de nucleótidos, tales como las preferencias de codones, véanse Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publications and Wiley Interscience, Nueva York, NY, 1987-1995; Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1989.

Los cambios preferidos para las muteínas de acuerdo con la presente invención son los que se conocen como sustituciones "conservativas". Las sustituciones conservativas de aminoácidos de la proteína son aquellas que tienen esencialmente las mismas secuencias de dicha proteína de origen natural de la invención, pueden incluir aminoácidos sinónimos de un grupo, que tienen propiedades fisicoquímicas suficientemente similares a la sustitución entre los miembros del grupo que conservan la función biológica de la molécula, véase Grantham, *Science*, Vol. 185, págs. 862-864 (1974). Está claro que también se pueden realizar inserciones y deleciones de aminoácidos en la secuencia anteriormente definida sin alterar su función, concretamente si las inserciones o deleciones implican solamente unos pocos aminoácidos, p. ej., menos de 25%, y preferiblemente menos de 12% y no eliminan ni desplazan aminoácidos que son críticos para una conformación funcional, p. ej., residuos de cisteína, Anfinsen, "Principles That Govern The Folding of Protein Chains", *Science*, Vol. 181, págs. 223-230 (1973). Las muteínas producidas por tales deleciones y/o inserciones entran dentro del ámbito de la presente invención.

Preferiblemente, los grupos de aminoácidos sinónimos son los definidos en la Tabla A. Más preferiblemente, los grupos de aminoácidos sinónimos son los definidos en la Tabla B; y muy preferiblemente, los grupos de aminoácidos sinónimos son los definidos en la Tabla C.

TABLA A Grupos Preferidos de Aminoácidos Sinónimos

Aminoácido	Grupo Sinónimo
Ser	Ser, Thr, Gly, Asn
Arg	Arg, Gln, Lys, Glu, His
5 Leu	Ile, Phe, Tyr, Met, Val, Leu
Pro	Gly, Ala, Thr, Pro
Thr	Pro, Ser, Ala, Gly, His, Gln, Thr
Ala	Gly, Thr, Pro, Ala
Val	Met, Tyr, Phe, Ile, Leu, Val
10 Gly	Ala, Thr, Pro, Ser, Gly
Ile	Met, Tyr, Phe, Val, Leu, Ile
Phe	Trp, Met, Tyr, Ile, Val, Leu, Phe
Tyr	Trp, Met, Phe, Ile, Val, Leu, Tyr
Cys	Ser, Thr, Cys
15 His	Glu, Lys, Gln, Thr, Arg, His
Gln	Glu, Lys, Asn, His, Thr, Arg, Gln
Asn	Gln, Asp, Ser, Asn
Lys	Glu, Gln, His, Arg, Lys
Asp	Glu, Asn, Asp
20 Glu	Asp, Lys, Asn, Gln, His, Arg, Glu
Met	Phe, Ile, Val, Leu, Met
Trp	Trp

25

TABLA B Grupos Más Preferidos de Aminoácidos Sinónimos

	Aminoácido	Grupo Sinónimo
	Sers	Sers
	Arc	His, Lys, Arg
5	Leu	Ile, Phe, Met, Leu
	Pro	Ala, Pro
	Thr	Thr
	Ala	Pro, Ala
	Val	Met, Ile, Val
10	Gly	Gly
	Ilea	Ile, Met, Phe, Val, Leu
	Phe	Met, Tyr, Ile, Leu, Phe
	Try	Phi, Try
	Cys	Ser, Cys
15	His	Arg, Gln, His
	Gln	Glu, His, Gln
	Asn	Asp, Asn
	Lys	Arg, Lys
	Asp	Asn, Asp
20	Glu	FLN, Glu
	Met	Phe, Ile, Val, Leu, Met
	Trp	Trp

TABLA C Grupos Muy Preferidos de Aminoácidos Sinónimos

	Aminoácido	Grupo Sinónimo
	Sers	Sers
	Arc	Arc
5	Leu	Ile, Met, Leu
	Pro	Pro
	Thr	Thar
	Alan	Alan
	Val	Val
10	Gly	Gly
	Ilea	Ile, Met, Leu
	Phi	Phi
	Try	Tyr
	Cys	Ser, Cys
15	His	His Gln Gln
	Asn	Asn
	Lys	Lys
	Asp	Asp
	Glu	Glu
20	Met	Ile, Leu, Met
	Trp	Trp

25 Los ejemplos de producción de sustituciones de aminoácidos en las proteínas que pueden ser utilizadas para obtener muteínas de la proteína para su uso en la presente invención incluyen cualquiera de las etapas de los métodos conocidos, tales como los presentados en las patentes de los Estados Unidos RE 33.653, 4.959.314, 4.588.585 y 4.737.462, de Mark et al; 5.116.943 de Koths et al., 4.965.195 de Namen et al; 4.879.111 de Chong et al; y 5.017.691 de Lee et al; y proteínas sustituidas con lisina presentadas en la patente de los Estados Unidos Núm. 4.904.584 (Straw et al).

30 En otra realización preferida de la presente invención, cualquier muteína de dicha proteína para su uso en la presente invención tiene una secuencia de aminoácidos esencialmente correspondiente a la de la proteína de la invención indicada antes, por ejemplo: NIK y fragmentos de NIK que comprenden regiones responsables de la unión a cyc tales como el dominio C-terminal y NIK 640-720 y la proteína AlyNIK o sus fragmentos. Se pretende que el término "esencialmente correspondiente a" abarque las muteínas con cambios mínimos en la secuencia de la proteína básica que no afectan a sus características básicas, concretamente en la medida en la que resultan afectadas sus capacidades con respecto a dicha proteína de la invención. El tipo de cambios que se considera 35 generalmente que encajan en la expresión "esencialmente correspondiente a" son aquellos que resultarían de técnicas de mutagénesis convencionales del ADN que codifica dicha proteína de la invención, dando como resultado unas pocas modificaciones mínimas, y escrutando en busca de la actividad deseada, por ejemplo, permitir la modulación de la interacción de cyc-NIK y/o la activación de NF-κB y/o la señalización de cyc.

40 También se describen en la presente memoria las variantes de dichas proteínas de la invención. Se describen variantes que tienen una identidad de aminoácidos de al menos 80%, las variantes que tienen una identidad de al menos 90% y las variantes que tienen una identidad de al menos 95% con dichas proteínas de la invención.

45 El término "identidad de secuencia" según se utiliza en la presente memoria significa que las secuencias de

5 aminoácidos se comparan por medio de alineamiento de acuerdo con Hanks y Quinn (1991) con un refinamiento de las regiones de baja homología utilizando el programa Clustal-X, con la interfaz de Windows para el programa de alineamiento de múltiples secuencias ClustalW (Thompson et al., 1994). El programa Clustal-X se encuentra disponible en internet en <ftp://ftp-igbmc.u-strasbg.fr/pub/clustalx/>. Por supuesto, se debe entender que si el enlace se inactiva, los expertos en la técnica encontrarían versiones de este programa en otros enlaces utilizando mecanismos de búsqueda en internet convencionales sin la experimentación indebida. A menos que se especifique de otro modo, la versión más reciente de cualquier programa referido en la presente memoria, a la fecha de presentación efectiva de la presente solicitud, es la que se utiliza con el fin de poner en práctica la presente invención.

10 Otro método para determinar la "identidad de secuencia" es el siguiente. Las secuencias se alinean utilizando la Versión 9 del Genetic Computing Group's GDAP (programa de alineamiento global), utilizando la matriz por defecto (BLOSUM62) (valores -4 a +11) con una penalización por apertura del espacio de -12 (para el primer nulo de un espacio) y una penalización por extensión del espacio de -4 (por cada nulo consecutivo adicional en el espacio). Después del alineamiento, se calcula el porcentaje de identidad expresando el número de emparejamientos como el porcentaje del número de aminoácidos en la secuencia reivindicada.

15 Las muteínas de acuerdo con la presente invención incluyen aquellas codificadas por un ácido nucleico, tal como ADN o ARN, que hibrida con ADN o ARN en condiciones restrictivas y que codifica dicha proteína de acuerdo con la presente invención, que comprenden esencialmente todas las secuencias de origen natural que codifican por ejemplo NIK y fragmentos de NIK que comprenden las regiones responsables de la unión a cyc tales como el dominio C-terminal y NIK640-720 y el mutante AlyNIK.

20 El término "hibridación" según se utiliza en la presente memoria incluirá cualquier procedimiento por medio del cual una hebra de ácido nucleico se une con una hebra complementaria a través de un emparejamiento de bases (Coombs J, 1994, Dictionary of Biotechnology, Stockton Press, Nueva York NY). La "amplificación" se define como la producción de copias adicionales de una secuencia de ácido nucleico y se lleva a cabo generalmente utilizando la tecnología de la reacción en cadena de la polimerasa bien conocida en la técnica (Dieffenbach y Dveksler, 1995, PCR Primer, a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Plainview NY).

25 La "restricción" se produce típicamente en un intervalo de Tm de aproximadamente 5°C (5°C por debajo de la temperatura de fusión de la sonda) a aproximadamente 20°C a 25°C por debajo de la Tm.

30 El término "condiciones restrictivas" hace referencia a las condiciones de hibridación y posterior lavado, a las que los expertos en la técnica hacen referencia convencionalmente como "restrictivas". Véase Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publications and Wiley Interscience, Nueva York, NY, 1987-1995; Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1989.

35 Según se utiliza en la presente memoria, las condiciones restrictivas son una función de la temperatura utilizada en el experimento de hibridación, la molaridad de los cationes monovalentes y el porcentaje de formamida en la disolución de hibridación. Para determinar el grado de restricción implicado en cualquier conjunto dado de condiciones, primero se utiliza la ecuación de Meinkoth et al. (1984) para determinar la estabilidad de los híbridos de una identidad de 100% expresada como la temperatura de fusión Tm del híbrido de ADN-ADN:

$$Tm = 81,5 C + 16,6 (\text{Log}M) + 0,41 (\% \text{ GC}) - 0,61 (\% \text{ form}) - 500/L$$

40 donde M es la molaridad de los cationes monovalentes, % GC es el porcentaje de los nucleótidos G y C en el ADN, % form es el porcentaje de formamida en la solución de hibridación, y L es la longitud del híbrido en pares de bases. Por cada 1°C que se reduce la Tm desde la calculada para un híbrido con una identidad de 100%, la cantidad de emparejamientos erróneos permitida se incrementa aproximadamente un 1%. De este modo, si la Tm utilizada para cualquier experimento de hibridación dado a las concentraciones de sal y formamida especificadas es 10°C inferior a la Tm calculada para un híbrido al 100% de acuerdo con la ecuación de Meinkoth, se producirá hibridación incluso si hay hasta aproximadamente un 10% de emparejamientos erróneos.

45 Según se utiliza en la presente memoria, "condiciones altamente restrictivas" son aquellas que proporcionan una Tm que no es más de 10°C menor que la Tm que existiría para un dúplex perfecto con la secuencia diana, ya sea calculada mediante la fórmula anterior o medida realmente. Las condiciones "moderadamente restrictivas" son aquellas que proporcionan una Tm, que no es más de 20°C menor que la Tm que existiría para un dúplex perfecto con la secuencia diana, ya sea calculada mediante la fórmula anterior o medida realmente. Sin limitación, los ejemplos de las condiciones altamente restrictivas (5-10°C por debajo de la Tm calculada o medida del híbrido) y moderadamente restrictivas (15-20°C por debajo de la Tm calculada o medida del híbrido) utilizan una solución de lavado de 2 X SSC (citrato salino convencional) y SDS al 0,5% (dodecilsulfato de sodio) a la temperatura apropiada por debajo de la Tm calculada del híbrido. La restricción final de las condiciones se debe principalmente a las condiciones de lavado, concretamente si las condiciones de hibridación utilizadas son aquellas que permiten que se formen híbridos menos estables junto con híbridos estables. Las condiciones de lavado a mayor restricción separan después los híbridos menos estables. Una condición de hibridación común que se puede utilizar con las condiciones de lavado altamente restrictivas a moderadamente restrictivas descritas antes

es la hibridación en una solución de 6 X SSC (o 6 X SSPE (solución salina convencional-fosfato-EDTA), 5 X reactivo de Denhardt, SDS al 0,5%, 100 µg/ml de ADN de esperma de salmón fragmentado, desnaturalizado a una temperatura aproximadamente 20 a 25°C por debajo de la T_m. Si se utilizan sondas mezcladas, es preferible utilizar cloruro de tetrametilamonio (TMAC) en lugar de SSC (Ausubel, 1987,1999).

5 Un fragmento de NIK640-720 puede servir como candidato para el diseño de fármacos basado en péptidos. Se pueden diseñar moléculas orgánicas, basadas en la estructura de estos fragmentos de unión, que pueden interferir en la unión de cyc a NIK. Tales moléculas orgánicas pueden ser utilizadas como fármacos que pueden modular la acción de NIK y serán valiosas en la prevención de respuestas inflamatorias y otros trastornos en cuya patogénesis está implicada la interacción de NIK y cyc.

10 Los "anticuerpos intracelulares" son anticuerpos específicos que son transducidos en una célula y son capaces de inhibir una reacción asociada no deseada tal como la interacción de NIK y cyc, donde dicho anticuerpo, cuando sea expresado, se unirá en la célula a una molécula diana y/o ligando implicado en la reacción asociada no deseada, expresando el anticuerpo y dejando que dicho anticuerpo se una a dicho receptor diana y/o ligando. El uso de anticuerpos intracelulares se describe en el documento W0 9914353.

15 Se pueden preparar anticuerpos contra NIK 640-720 y transducirlos en células para inhibir las interacciones de NIK y cyc en una enfermedad en cuya patogénesis está implicada la actividad de NIK.

La activación de NF-κB implica la migración al núcleo de la célula y la activación de un gran número de genes pro-inflamatorios.

20 En trastornos tales como la artritis reumatoide (en caso de inflamación), la osteoartritis, el asma, el infarto cardíaco, la enfermedad de Alzheimer, o la aterosclerosis, NF-κB es activado por encima del nivel normal. La inhibición de NF-κB también es beneficiosa en la terapia contra el cáncer, puesto que es empleada en ella para el refuerzo de la terapia citostática.

25 Los polipéptidos de la invención pueden ser producidos en sistemas de expresión eucarióticos, intracelularmente, periplásmicamente o pueden ser secretados al medio. La NIK producida tal como 41MDD y 44MPD, 1-357 y 1-341 y/o la NIK y los fragmentos de NIK que comprenden las regiones responsables de la unión a cyc tales como el dominio C-terminal (desde el residuo 624 al 947), NIK640-720 y el mutante AlyNIK, pueden ser recuperados en forma soluble o insoluble (cuerpos de inclusión).

Se podría utilizar un vector que comprendiera ADN que codificara dichos polipéptidos de la invención para la expresión de dichos polipéptidos en sistemas procarióticos o eucarióticos.

30 Un vector de expresión que codifica un péptido señal eficaz, tal como el péptido señal de la hormona de crecimiento humana, fusionado al ADN que codifica p. ej., NIK y los fragmentos de NIK que comprenden las regiones responsables de la unión de cyc tales como el dominio C-terminal (desde el residuo 624 al 947), NIK640-720 y el mutante AlyNIK puede ser utilizado para la expresión y la secreción eucarióticas.

35 La presente invención proporciona NIK y fragmentos de NIK que comprenden las regiones responsables de la unión a cyc tales como el dominio C-terminal (desde el residuo 624 al 947), NIK640-720 y el mutante AlyNIK, péptidos derivados de los mismos, o una muteína, proteína de fusión, derivado funcional, derivado permutado circularmente o fragmento del mismo, o una de sus sales para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de enfermedades inflamatorias.

40 El uso terapéutico o asociado a la investigación de estas herramientas requiere su introducción en las células de un organismo vivo. Para este fin, se desea mejorar la permeabilidad de membrana de péptidos, proteínas y oligonucleótidos. Se puede utilizar la derivatización con estructuras lipofílicas en la creación de péptidos y proteínas con una mayor permeabilidad de membrana. Por ejemplo, la secuencia de un péptido membranotrópico conocido como se ha indicado más arriba puede ser añadida a la secuencia del péptido o proteína. Adicionalmente, el péptido o proteína puede ser derivatizado por medio de estructuras parcialmente lipofílicas tales como las cadenas hidrocarbonadas indicadas más arriba, que están sustituidas al menos con un grupo polar o cargado. Por ejemplo, Muranishi et al., 1991, han descrito derivados lauroílicos de péptidos. Otras modificaciones de péptidos y proteínas comprenden la oxidación de residuos de metionina para crear de ese modo grupos sulfóxido, como describen Zacharia et al. 1991. Zacharia y colaboradores también describen péptidos o derivados en los que el enlace peptídico relativamente hidrófobo es sustituido por su isoéster cetometilénico (COCH₂). Estas y otras modificaciones conocidas por los expertos en la técnica de la química de las proteínas y los péptidos aumentan la permeabilidad de la membrana.

50 Otro modo de aumentar la permeabilidad de membrana es la utilización de receptores, tales como receptores de virus, sobre superficies celulares con el fin de inducir la absorción celular del péptido o la proteína. Este mecanismo es utilizado frecuentemente por los virus, que se unen específicamente a ciertas moléculas de la superficie celular. Tras la unión, la célula absorbe el virus hacia su interior. La molécula de la superficie celular es denominada receptor de virus. Por ejemplo, las moléculas de integrina CAR y AdV han sido descritas como receptores de virus para Adenovirus, véase Hemmi et al. 1998, y sus referencias. Las moléculas CD4, GPR1,

GPR15, y STRL33 han sido identificadas como receptores/co-receptores para HIV, véase Edinger et al. 1998 y sus referencias.

De este modo, la conjugación de péptidos, proteínas u oligonucleótidos con moléculas que son conocidas por unirse a receptores de la superficie celular, aumentará la permeabilidad de membrana de dicho péptidos, proteínas u oligonucleótidos. Los ejemplos de los grupos adecuados para formar productos conjugados son los azúcares, las vitaminas, las hormonas, las citoquinas, la transferrina, la asialoglicoproteína, y moléculas similares. Low et al., documento USP 5.108.921, describe el uso de estas moléculas con el fin de aumentar la permeabilidad de membrana de péptidos, proteínas y oligonucleótidos, y la preparación de dichos productos conjugados.

Low y colaboradores ilustran adicionalmente que moléculas tales como folato o biotina pueden ser utilizadas para dirigir el producto conjugado a una multitud de células en un organismo, debido a la expresión abundante e inespecífica de los receptores para estas moléculas.

El uso anterior de proteínas de la superficie celular para aumentar la permeabilidad de membrana de un péptido, proteína u oligonucleótido de la invención se puede emplear también en el direccionamiento de dicho péptido, proteína u oligonucleótido de la invención a ciertos tipos celulares o tejidos. Por ejemplo, si se desea elegir como diana células cancerosas, es preferible utilizar una proteína de la superficie celular que sea expresada más abundantemente sobre la superficie de esas células. Los ejemplos son el receptor de folato, los antígenos de mucina MUC1, MUC2, MUC3, MUC4, MUC5AC, MUC5B, y MUC7, los antígenos glicoproteicos KSA, el antígeno carcinoembrionario, el antígeno de membrana específico de próstata (PSMA), HER-2/neu, y la gonadotropina-beta coriónica humana.

La publicación de Wang et al., 1998, indicada anteriormente, ilustra el uso de folato para elegir como diana células cancerosas, y Zhang et al. 1998, ilustra la relativa abundancia de cada uno de los otros antígenos indicados más arriba en diferentes tipos de cáncer y en células normales.

La proteína, péptido u oligonucleótido de la invención pueden por lo tanto, utilizando las técnicas de conjugación descritas más arriba, ser dirigidos a cierto tipo celular según se desee. Por ejemplo, si se desea inhibir la activación de NIK en células del linaje linfocítico, se pueden dirigir NIK y fragmentos de NIK que comprenden las regiones responsables de la unión a cyc tales como el dominio C-terminal (desde el residuo 624 al 947), NIK640-720 y AlyNIK, sus fragmentos mutantes y derivados de la invención a tales células, por ejemplo, utilizando las moléculas de clase II del MHC que son expresadas en estas células. Esto se puede lograr acoplando un anticuerpo, o el sitio de unión al antígeno del mismo, dirigido contra la región constante de la molécula de clase II del MHC a la proteína o péptido de la invención. Adicionalmente, se han descrito numerosos receptores de la superficie celular para diferentes citoquinas y otras moléculas de comunicación celular, y muchas de estas moléculas son expresadas de una manera más o menos restringida al tipo de tejido o célula. De este modo, cuando se desea dirigir un subgrupo de células T, se puede utilizar la molécula de la superficie de las células T CD4 para producir el producto conjugado de la invención. Las moléculas que se unen a CD4 son proporcionadas por el virus VIH, cuyo antígeno de superficie gp42 es capaz de unirse específicamente a la molécula de CD4.

Las proteínas, péptidos y secuencias antisentido de la invención pueden ser introducidos en las células mediante el uso de un vector viral. El uso del vector vaccinia para este fin se detalla en el capítulo 16 de Current Protocols in Molecular Biology. El uso de vectores de adenovirus ha sido descrito p. ej. por Teoh et al., 1998, Narumi et al, 1998, Pederson et al, 1998, Guang-Lin et al., 1998, y sus referencias, Nishida et al., 1998, Schwarzenberger et al., 1998, y Cao et al., 1998. La transferencia retroviral de secuencias antisentido ha sido descrita por Daniel et al. 1998.

Cuando se utilizan virus como vectores, se utilizan generalmente las proteínas de la superficie viral para dirigir el virus. Como muchos virus, tales como el adenovirus anterior, son bastante inespecíficos en su tropismo celular, puede ser deseable conferir una especificidad adicional utilizando un promotor específico del tipo de célula o tejido. Griscelli et al., 1998 ilustran el uso del promotor de la cadena ligera 2 de miosina cardíaca específica del ventrículo para el direccionamiento específico al corazón de un gen cuya transferencia está mediada por adenovirus.

Alternativamente, el vector viral puede ser diseñado para expresar una proteína adicional sobre su superficie, o se puede cambiar la proteína de superficie del vector viral para incorporar una secuencia peptídica deseada. De este modo se puede diseñar el vector viral para expresar uno o más epítopos adicionales, que se pueden utilizar para dirigir dicho vector viral. Por ejemplo, se pueden utilizar epítopos de citoquinas, péptidos de unión a la clase II del MHC, o epítopos derivados de moléculas de alojamiento para dirigir el vector viral de acuerdo con la enseñanza de la invención.

La presente invención abarca composiciones farmacéuticas que comprenden una o más sustancias activas seleccionadas entre uno o más NIK y fragmentos de NIK que comprenden las regiones responsables de la unión a cyc tales como el dominio C-terminal (desde el residuo 624 al 947), NIK640-720 y AlyNIK y/o ADN o vectores que albergan sus secuencias o antisentido.

La presente invención abarca las composiciones farmacéuticas que comprenden anticuerpos específicos capaces de reconocer y unirse a NIK y fragmentos de NIK que comprenden las regiones responsables de la unión a

cyc.

Se pretende que el término "anticuerpo" incluya anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales (Mab), anticuerpos quiméricos, anticuerpos anti-idiotípicos (anti-Id) para anticuerpos que pueden estar marcados en forma soluble o unida, y anticuerpos humanizados así como sus fragmentos proporcionados mediante cualquier mecanismo conocido, tal como, pero no limitado a, escisión enzimática, síntesis peptídica o mecanismos recombinantes.

Un anticuerpo monoclonal contiene una población esencialmente homogénea de anticuerpos específicos para los antígenos, cuyas poblaciones contienen sitios de unión a epítopos esencialmente similares. Los Mab se pueden obtener mediante métodos conocidos por los expertos en la técnica. Véanse, por ejemplo Kohler y Milstein, *Nature*, 256: 495-497 (1975); la Patente de los Estados Unidos Núm. 4.376.110; Ausubel et al., eds., Harlow y Lane *ANTIBODIES : A LABORATORY MANUAL*, Cold Spring Harbor Laboratory (1988); y Colligan et al., eds., *Current Protocols in Immunology*, Greene Publishing Assoc. and Wiley Interscience N. Y., (1992-1996). Tales anticuerpos pueden ser de cualquier clase de inmunoglobulina incluyendo IgG, IgM, IgE, IgA, GILD y cualquiera de sus subclases. Se puede cultivar *in vitro*, *in situ* o *in vivo* un hibridoma que produce un mAb de la presente invención. La producción de elevados títulos de Mabs *in vivo* o *in situ* hacen de este el método de producción preferido en la actualidad.

Los anticuerpos quiméricos son moléculas cuyas diferentes porciones derivan de diferentes especies animales, tales como aquellas que tienen la región variable derivada de un Mab murino y una región constante de inmunoglobulina humana. Los anticuerpos quiméricos se utilizan principalmente para reducir la inmunogenicidad en su aplicación y para aumentar los rendimientos de producción, por ejemplo, cuando los Mab murinos tienen rendimientos superiores a partir de hibridomas pero una inmunogenicidad mayor en seres humanos, de manera que se utilizan Mab quiméricos humano/murino. Los anticuerpos quiméricos y los métodos para su producción son conocidos en la técnica (Cabilly et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 3273-3277 (1984); Morrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 6851-6855 (1984); Boulianne et al., *Nature* 312: 643-646 (1984); Cabilly et al., *Solicitud de Patente Europea* 125023 (publicada el 14 de Noviembre de 1984); Neuberger et al., *Nature* 314: 268-270 (1985); Taniguchi et al., *Solicitud de Patente Europea* 171496 (publicada el 19 de Febrero de 1985); Morrison et al., *Solicitud de Patente Europea* 173494 (publicada el 5 de Marzo de 1986); Neuberger et al., *Solicitud PCT* WO 8601533, (publicada el 13 de Marzo de 1986); Kudo et al., *Solicitud de Patente Europea* 184187 (publicada el 11 de Junio de 1986); Sahagan et al., *J. Immunol.* 137: 1066-1074 (1986); Robinson et al., *Solicitud de Patente Internacional* Núm. W0 8702671 (publicada el 7 de Mayo de 1987); Liu et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 3439-3443 (1987); Sun et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 214-218 (1987); Better et al., *Science* 240: 1041-1043 (1988); Riechmann et al., *Nature* 332: 323-327, y Harlow y Lane, *ANTIBODIES : A LABORATORY MANUAL*, supra.

Los "anticuerpos totalmente humanizados" son moléculas que contienen tanto la región variable como la constante de la inmunoglobulina humana. Los anticuerpos totalmente humanizados pueden ser utilizados potencialmente para uso terapéutico, donde se requieren tratamientos repetidos para enfermedades crónicas y con recaída tales como las enfermedades autoinmunitarias. Un método para la preparación de anticuerpos totalmente humanos consiste en la "humanización" del sistema inmunitario humoral de ratón, esto es, la producción de cepas de ratón capaces de producir Ig humana (Xenomice), por medio de la introducción de loci de inmunoglobulina humana (Ig) en ratones en los cuales se han inactivado los genes de la Ig endógena. Los loci de Ig son sumamente complejos en términos tanto de su estructura física como de la reordenación de los genes y de los procedimientos de expresión requeridos para producir por último una amplia respuesta inmunitaria. La diversidad de anticuerpos se genera principalmente mediante reordenación combinatoria entre diferentes genes V, D, y J presentes en los loci de Ig. Estos loci también contienen los elementos reguladores intercalados, que controlan la expresión de los anticuerpos, la exclusión alélica, el cambio de clase y la maduración de la afinidad. La introducción de transgenes de Ig humana no reordenados en ratones ha demostrado que la maquinaria de recombinación de ratón es compatible con los genes humanos. Además, los hibridomas que secretan hu-mAb específicos de antígenos de diferentes isotipos pueden ser obtenidos mediante inmunización de Xenomice con antígeno.

Los anticuerpos totalmente humanizados y los métodos para su producción son conocidos en la técnica (Méndez et al., *Nature Genetics* 15: 146-156 (1997); Buggemann et al., *Eur. J. Immunol.* 21: 1323-1326 (1991); Tomizuka et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 722-727 (2000) Patente WO 98/24893.

Un anticuerpo anti-idiotípico (anti-Id) es un anticuerpo, que reconoce determinantes únicos asociados generalmente con el sitio de unión al antígeno de un anticuerpo. Se puede preparar un anticuerpo Id inmunizando un animal de la misma especie y tipo genético (p. ej. cepa de ratón) que la fuente del Mab para el cual se está preparando un anti-Id. El animal inmunizado reconocerá y responderá a los determinantes idiotípicos del anticuerpo inmunizante produciendo un anticuerpo para estos determinantes idiotípicos (el anticuerpo anti-Id). Véase, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos Núm. 4.699.880.

El anticuerpo anti-Id también se puede utilizar como "inmunógeno" para inducir una respuesta inmunitaria en otro animal más, produciendo lo que se denomina un anti-anticuerpo anti-Id. El anti-anti-Id puede ser epitópicamente idéntico al Mab original, que indujo el anti-Id. De este modo, utilizando anticuerpos para los determinantes idiotípicos de un Mab, es posible identificar otros clones que expresan anticuerpos de especificidad

idéntica.

Por consiguiente, se pueden utilizar los Mab generados contra NIK, sus isoformas, análogos, fragmentos o derivados de la presente invención para inducir anticuerpos anti-Id en animales adecuados, tales como ratones BALB/c. Las células de bazo de tales ratones inmunizados se utilizan para producir hibridomas anti-Id que secretan Mab anti-Id. Adicionalmente, los Mab anti-Id se pueden acoplar a un portador tal como la hemocianina de lapa ojo de cerradura (KLH) y utilizar para inmunizar ratones BALB/c adicionales. Los sueros de estos ratones contendrán anti-anticuerpos anti-Id que tendrán las propiedades de unión del Mab original específico de un epítipo de la proteína NIK anterior, o sus análogos, fragmentos y derivados.

Los Mab anti-Id tienen de este modo sus propios epítopos idiotípicos, o "idiotopos" estructuralmente similares al epítipo que está siendo evaluado. También se pretende que el término "anticuerpo monoclonal" incluya tanto las moléculas intactas como sus fragmentos, tales como, por ejemplo, Fab y F(ab')₂, que son capaces de unirse al antígeno. Los fragmentos Fab y F(ab')₂ carecen del fragmento Fc del anticuerpo intacto, se aclaran más rápidamente de la circulación, y pueden tener una unión al tejido no específica menor que un anticuerpo intacto (Wahl et al., J. Nucl. Med. 24: 316-325 (1983)).

Se dice que un anticuerpo monoclonal es "capaz de unirse" a una molécula si es capaz de reaccionar específicamente con la molécula para unir de ese modo la molécula al anticuerpo. Se pretende que el término "epítipo" haga referencia a aquella porción de cualquier molécula capaz de ser unida por un anticuerpo, que también puede ser reconocida por ese anticuerpo. Los epítopos o "determinantes antigénicos" consisten normalmente en agrupamientos de superficie químicamente activos de moléculas tales como aminoácidos o azúcares y tienen características estructurales tridimensionales específicas así como características de carga específicas.

Un "antígeno" es una molécula o una porción de una molécula susceptible de ser unida por un anticuerpo, cuyo antígeno es adicionalmente capaz de inducir que un animal produzca anticuerpo susceptible de unirse a un epítipo de ese antígeno. Un antígeno puede tener un epítipo o más de uno. Se pretende que la reacción específica referida más arriba indique que el antígeno reaccionará, de una manera altamente selectiva, con un epítipo en su correspondiente anticuerpo y no con la multitud de otros anticuerpos, que pueden ser evocados por otros antígenos.

Se pretende que la definición "farmacéuticamente aceptable" incluya cualquier portador, que no interfiera en la eficacia de la actividad biológica del ingrediente activo y que no sea tóxico para el anfitrión al cual se administre. Por ejemplo, para la administración parenteral, las proteínas activas se pueden formular en una forma de dosificación unitaria para la inyección en vehículos tales como solución salina, solución de dextrosa, albúmina de suero y solución de Ringer.

Los ingredientes activos de la composición farmacéutica de acuerdo con la invención se pueden administrar a un individuo en una variedad de formas. Las rutas de administración incluyen las rutas intradérmica, transdérmica (p. ej. en formulaciones de liberación lenta), intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, subcutánea, oral, intracraneal, epidural, tópica, e intranasal. Se puede utilizar cualquier otra ruta de administración terapéuticamente eficaz, por ejemplo la absorción a través de tejidos epiteliales o endoteliales o por medio de terapia génica donde una molécula de ADN que codifica el agente activo es administrada al paciente (p. ej. a través de un vector), lo que hace que el agente activo sea expresado y secretado *in vivo*. Además, las proteínas de acuerdo con la invención pueden ser administradas junto con otros componentes de agentes biológicamente activos tales como tensioactivos, excipientes, portadores, diluyentes y vehículos farmacéuticamente aceptables.

La invención se refiere al uso de anticuerpos específicos capaces de reconocer NIK y/o fragmentos de NIK que comprenden las regiones responsables de la unión a *cyc*, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad, donde una citoquina estimuladora de la señalización a través de *cyc* de IL-2R está implicada en la patogénesis de la enfermedad.

La invención se refiere a un método para el tratamiento de una enfermedad que implica la señalización de una citoquina a través de *cyc* de IL-2R en la patogénesis de dicha enfermedad, que comprende la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de anticuerpos específicos capaces de reconocer y unirse a NIK, o fragmentos de NIK que comprenden las regiones responsables de la unión a *cyc*, a un sujeto que lo necesite.

Para la administración parenteral (p. ej. intravenosa, subcutánea, intramuscular), las proteínas activas pueden ser formuladas en forma de una solución, suspensión, emulsión o polvo liofilizado asociados con un vehículo parenteral farmacéuticamente aceptable (p. ej. agua, solución salina, solución de dextrosa) y aditivos que mantienen la isotonicidad (p. ej. manitol) o la estabilidad química (p. ej. conservantes y tampones). La formulación se esteriliza por medio de técnicas utilizadas comúnmente.

La biodisponibilidad de las proteínas activas de acuerdo con la invención también puede ser mejorada utilizando procedimientos de conjugación que incrementen la vida media de la molécula en el organismo humano, por ejemplo uniendo la molécula a polietilenglicol, como se describe en la Solicitud de Patente PCT WO 92/13095.

La presente invención hace referencia a un método de intensificación o inhibición de la respuesta de NIK en

un paciente que lo necesite, p. ej. un paciente que padezca una enfermedad inflamatoria y/o cáncer, que comprende la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de NIK y fragmentos de NIK que comprenden las regiones responsables de la unión a cyc tales como el dominio C-terminal (desde el residuo 624 al 947), NIK640-720 y AlyNIK, una muteína, proteína de fusión, derivado funcional, derivado permutado circularmente o fragmento del mismo.

Una "cantidad terapéuticamente eficaz" es aquella que cuando es administrada, los polipéptidos mencionados de la invención producen la modulación de la actividad biológica de NIK, NF- κ B y/o la señalización de cyc. La dosificación administrada, en forma de una sola o de múltiples dosis, a un individuo puede variar dependiendo de una variedad de factores, incluyendo la ruta de administración, las condiciones y características del paciente (sexo, edad, peso corporal, salud, tamaño), el grado de los síntomas, los tratamientos concurrentes, la frecuencia del tratamiento y el efecto deseado. El ajuste y la manipulación de los intervalos de dosificación establecidos se encuentran en el conocimiento práctico de los expertos en la técnica, así como los métodos *in vitro* e *in vivo* de determinación de la actividad de NIK, la señalización de cyc y sus fragmentos.

Se puede utilizar NIK en un análisis para escrutar las moléculas terapéuticamente valiosas potenciales que modulan la interacción cyc-NIK. Las células que expresan NIK, cyc y el gen informador de luciferasa bajo un promotor inducible por NF- κ B, se tratan con moléculas pequeñas individuales. La expresión de luciferasa (o la activación de NF- κ B) se compara en las células tratadas con respecto a células de control. Se seleccionan los compuestos orgánicos candidato capaces de modular la expresión de la luciferasa (esto es, la actividad de NF- κ B). Los compuestos sometidos a ensayo pueden ser obtenidos no solamente a través de la química combinatoria, sino también por medio de otros métodos de síntesis de alto rendimiento. Las técnicas automatizadas permiten la síntesis rápida de bancos de moléculas, grandes colecciones de compuestos discretos, que pueden ser escrutados. La producción de bancos de compuestos más grandes y más diversos incrementa la probabilidad de descubrir un fármaco útil dentro del banco. Para un escrutinio de alto rendimiento, se pueden utilizar robots para someter a ensayo la inhibición del reclutamiento o la desorganización de la formación del signalosoma por miles de compuestos.

Además se describe un escrutinio de moléculas generadas por medio de la química combinatoria, que inhiben la interacción de NIK y la cadena y común de IL-2R, que comprende un polipéptido que comprende el dominio intracelular de la cyc o una muteína, proteína de fusión, derivado funcional, fracción activa, derivado permutado circularmente o fragmento del mismo que comprende: recubrir o capturar (por medio de un anticuerpo específico unido a la placa) una de las proteínas (p. ej. NIK o NIK640-720) en una placa y detectar la unión de la otra proteína (p. ej. cyc, ICDcyc o sus fragmentos) unida a la placa con anticuerpo específico en presencia o ausencia de compuestos orgánicos.

La invención se ilustrará ahora por medio de los siguientes ejemplos no limitantes.

EJEMPLOS

Ejemplo 1

Detección de proteínas que interactúan con NIK mediante el método del sistema de doble híbrido:

Se ha utilizado el método del sistema de doble híbrido en levaduras, ampliamente empleado para detectar la interacción proteína-proteína *in vivo*, para escrutar una genoteca de expresión de ADN para encontrar e identificar las proteínas que interactúan con NIK (véanse los detalles en el Ejemplo 8). Se ha seleccionado una genoteca de médula ósea humana basándose en la evidencia que indica un papel fundamental de NIK en el desarrollo y la función del sistema linfoide.

La región N-terminal de NIK contiene un dominio regulador negativo (NRD), que interactúa con la región C-terminal de NIK, inhibiendo de ese modo la unión de NIK a sus sustratos (IKK alfa y p100). La interacción entre la región C- y N-terminal de NIK evita la unión de NIK a sus sustratos. Se descubrió que el dominio C-terminal de NIK era responsable de la unión de NIK a varias proteínas reguladoras clave tales como TRAF-2, IKK-1 y a P100, sugiriendo que este dominio se puede unir a proteínas adicionales, que son importantes para la modulación de sus actividades. Por lo tanto, la introducción de la molécula completa, como cebo en el sistema de doble híbrido no es deseable puesto que el dominio C-terminal puede ser ocluido por el NRD. De este modo, el extremo C de NIK (aminoácidos 624-947) ha sido utilizado como cebo en el escrutinio de doble híbrido (para los detalles véase el Ejemplo 8).

Aparecieron más de 5.000 clones sobre las placas de selección. Aproximadamente la mitad de los clones resistentes fueron analizados por medio de un análisis α -gal y aproximadamente 60% de ellos resultaron positivos variando la intensidad del color azul. Se aislaron los plásmidos y se purificaron a partir de 800 colonias. Los insertos de ADN de 400 plásmidos de los 800 (seleccionados de acuerdo con la intensidad de color que es indicativa de la afinidad de la unión) se amplificaron, por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando cebadores correspondientes a las secuencias contiguas de los insertos en la genoteca de ADNc, y se secuenciaron. La mayor parte de las presas detectadas, resultaron ser no específicas, p. ej.: 80% de los insertos de ADN correspondían a regiones 3' y 5' no traducidas de diferentes genes y 10% a insertos de ADN que codificaban

5 inmunoglobulinas. El 10% restante correspondía a segmentos que codificaban regiones de proteínas. Algunas de las colonias positivas se volvieron azules 4-8 días después de la siembra, algunas después de aproximadamente 8-12 días, y otras se colorearon tarde, hasta 12-16 días después de la siembra. La velocidad de desarrollo de color en las colonias positivas es indicativa de la intensidad de la interacción proteína-proteína, esto es, cuanto más rápido aparece el color, más fuerte es la interacción.

Una de las proteínas de unión encontradas, el receptor de la cadena gamma de IL-2R, fue seleccionada para un análisis adicional. La cadena gamma común de IL-2R es una subunidad de los complejos receptores de IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-13, IL-15 e IL-21, por lo tanto es comúnmente apodada como cadena gamma común (cyc).

Ejemplo 2

10 Evaluación de las interacciones de la cadena gamma común de IL-2R - NIK en un entorno de mamífero:

La detección de una interacción específica entre dos proteínas de mamífero diferentes en un sistema de doble híbrido en levadura no implica necesariamente que exista una interacción correspondiente entre las proteínas en un entorno de mamífero nativo. Por lo tanto, con el fin de verificar la interacción de NIK y cyc en un entorno de mamífero, se llevaron a cabo estudios de inmunoprecipitación simultánea de NIK y cyc en productos lisados de células T 293 que expresaban en exceso estas proteínas (para los detalles véase el Ejemplo 9).

20 Para expresar en exceso NIK y cyc, se co-transfectaron células T 293 con cantidades iguales de plásmidos de expresión de NIK y cyc (pcS3MTNIK, etiqueta myc en su extremo N y pcDNA3 cyc respectivamente, teniendo ambos plásmidos un peso molecular similar). Las proteínas expresadas en exceso fueron inmunoprecipitadas con anticuerpos específicos para una de las proteínas (p. ej. NIK) y se detectó la presencia de una proteína precipitada simultáneamente (p. ej. cyc) mediante análisis de transferencia Western.

25 La Figura 2 resume los resultados del análisis de transferencia Western de los productos inmunoprecipitados detectados con los anticuerpos anti-cyc. Las muestras analizadas fueron las siguientes: 1- un producto lisado de células que expresan en exceso cyc e inmunoprecipitadas con anti-cyc. Esta muestra es el control positivo para el método de inmunoprecipitación. Se observó una fuerte señal correspondiente al peso molecular de cyc. 2- un producto lisado de células que expresan en exceso cyc solo e inmunoprecipitadas con anticuerpo anti-NIK. Esta muestra del experimento se llevó a cabo para verificar la inmunoprecipitación simultánea de cyc con proteína NIK endógena, que está presente a concentraciones mínimas y probablemente en forma inactiva, y también para verificar la especificidad de los anticuerpos anti-NIK. No se detectó en la transferencia una proteína con un peso molecular correspondiente a cyc. 6- un producto lisado de células que expresan en exceso tanto NIK etiquetada con myc como cyc e inmunoprecipitadas con anticuerpo anti-myc. Cyc también es inmunoprecipitada junto con NIK, demostrando que la interacción cyc-NIK se produce también en el entorno nativo. 3- lo mismo que 6 con la diferencia de que se cambia NIK por el mutante aly de NIK (la mutación en seres humanos es G860R correspondiente a la mutación aly en ratón G855R). Cyc es inmunoprecipitada simultáneamente con el mutante aly de NIK indicando que el mutante es capaz de una unión a cyc tan eficiente como NIK de tipo salvaje. 4- un producto lisado de células que expresan en exceso el extremo C de NIK (aminoácidos 624-947), el mismo fragmento de NIK empleado como cebo en el sistema de doble híbrido. No se detectó una banda correspondiente a cyc en la transferencia. 5- un producto lisado de células que expresan en exceso tanto el extremo C de NIK como cyc e inmunoprecipitadas con anticuerpo anti-NIK. Cyc precipitaba simultáneamente con el extremo C de NIK.

40 Estos resultados demuestran que cyc es precipitada simultáneamente de manera eficaz con el extremo C de NIK (utilizado como cebo en el sistema de doble híbrido en el cual se había identificado cyc) o con NIK completa.

45 La Figura 3 resume los resultados del análisis de transferencia Western de productos inmunoprecipitados y productos lisados celulares totales detectados con un anticuerpo anti-NIK. Las muestras analizadas fueron las siguientes: 3- un producto lisado de células que expresan en exceso NIK sola inmunoprecipitada con anti-NIK. Esta muestra es el control positivo para el método de inmunoprecipitación. Se observó una fuerte señal del peso molecular correspondiente a NIK. 2- un producto lisado de células que expresan en exceso NIK sola e inmunoprecipitadas con anticuerpo anti-cyc. No se pudo detectar una proteína con un peso molecular correspondiente a NIK. Este resultado demuestra también la especificidad de los anticuerpos de cyc.

50 1- productos lisados de células que expresan en exceso tanto NIK como cyc inmunoprecipitadas con anticuerpo anti-cyc. Los resultados demuestran que NIK es inmunoprecipitada simultáneamente de manera eficaz con cyc. 5- es un producto lisado de células no transfectadas, 4 y 6 son productos lisados de células que expresan en exceso tanto NIK como cyc o células que expresan en exceso NIK sola respectivamente antes de la inmunoprecipitación. Se observó una fuerte banda correspondiente al peso molecular de NIK en la transferencia, demostrando que estaba expresada en exceso.

55 Los resultados obtenidos por medio de los análisis de transferencia Western de los productos inmunoprecipitados demostró una precipitación bi-direccional de NIK y cyc demostrando que su interacción también se produce en células de mamífero. El dominio C-terminal de NIK, NIK completa y el mutante NIKaly (NIK- G860R) son todos inmunoprecipitables simultáneamente por cyc.

Ejemplo 3

Cartografiado de la región de *cyc* responsable de la unión a NIK:

Para definir el dominio de *cyc* responsable de la unión a NIK, se han creado mutantes por delección de *cyc* y se ha analizado su unión a NIK (Figura 1).

5 Los mutantes por delección fueron creados mediante la introducción sucesiva de codones de terminación en el dominio citoplásmico de *cyc*, en espacios de 10-20 aminoácidos. Se introdujeron el ADN que codifica *cyc* completa o sus mutantes por delección en el vector presa pGADT7 (Clontech) para someter a ensayo su unión a NIK en la cepa de levadura heteróloga SFY526 por medio del análisis de doble híbrido. La cepa de levadura SFY526 es prototrófica para TRP y Leu. Los plásmidos pGBKT (vector cebo) tienen el gen *Trp1* de tipo salvaje y pGAD tiene el gen *Leu2* de tipo salvaje. De este modo, solamente la levadura doblemente transflectada crecerá sobre medio Leu Trp selectivo. Se restaurará GAL4 funcional en levadura doblemente transflectada cuando las proteínas quiméricas fusionadas a los dominios GAL4 interaccionen, poniendo en íntima proximidad el dominio de activación y el dominio de unión a ADN de GAL4. El nivel de expresión de LAC-Z es indicativo de la intensidad de la interacción proteína-proteína. La actividad Lac-Z fue evaluada por medio del análisis de recogida de colonias con beta-gal en filtros (Clontech, Yeast Protocol Handbook, Capítulo VI).

15 Puesto que la introducción de *cyc* y de mutantes en el vector presa pGADT7 para evaluar su unión a NIK como cebo manifestó una no especificidad elevada, las interacciones se sometieron a ensayo en orientación inversa: esto es, los mutantes por delección se clonaron en el vector cebo y NIK o el extremo C de NIK (residuos 624-947) en el vector presa. Los resultados resumidos en la Tabla 1 demuestran que ninguna de las delecciones, excepto el dominio citoplásmico de *cyc* (ICD) solo, mostró una unión fuerte tanto a NIK como al extremo C de NIK. La unión de la mayor parte de ICD (que carece del aminoácido 5 desde su dominio de membrana proximal) tanto a NIK como al extremo C de NIK fue más fuerte que la de la molécula de *cyc* completa. Se observó una reducción del 50% en la afinidad para NIK suprimiendo 12 aminoácidos o 44 aminoácidos en el extremo distal de la membrana de *cyc*ICD.

Tabla 1.

Residuos de aminoácido de <i>cyc</i>	NIK624-947 (dominio C-terminal)	NIK	Lamina
Completa (1-369)	+/-	-	-
1-357	-	-	*
1-325	-	-	*
1-303	-	-	*
1-282	-	-	*
289-369 (la mayor parte de ICD)	++++	+++	-
289-357 (12 aa suprimidos del dominio distal de la membrana)	++	*	*
289-325 (44 aa suprimidos del ICD)	++	*	*

25 * No sometido a ensayo

Los resultados obtenidos con los diferentes mutantes por delección indican que el dominio distal de la membrana de *cyc* está implicado en la unión a NIK. De este modo, se analizó la unión de un polipéptido de 41 aminoácidos del dominio distal de membrana de *cyc*, correspondiente a los residuos 329-369 (apodado 41 MDD).

Tabla 2.

Cebo	Presa		
	cyc 329-369 (polipéptido 41 MDD)	NIK624-947 (Extremo C de NIK)	NIK
NIK624-947 (extremo C)	+++	*	*
NIK	+	*	*
cyc 329-369 (polipéptido 41 MDD)	*	+/-	+/-
Lamina	-	-	-

5 La unión del polipéptido 41 MDD a NIK completa o al extremo C de NIK se sometió a ensayo en ambas orientaciones (esto es, 41 MDD como presa y NIK como cebo y viceversa). Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 2. La interacción es relativamente débil cuando NIK sirve como presa, pero fuerte cuando NIK sirve como cebo. La interacción de 41 MDD es más fuerte con el extremo C de NIK que con NIK completa. Estos resultados confirmaron que el polipéptido 41 MDD está implicado en la unión a NIK.

10 De un modo similar, se llevaron a cabo dos experimentos híbridos con constructos que comprendían fragmentos intracelulares localizados cerca del dominio proximal a la membrana (MPD) de cyc. Los resultados sugirieron que una región de 44 aminoácidos, que abarcaba los residuos de aminoácido 282-235 (44MPD) también se puede unir a NIK.

15 Los estudios de inmunoprecipitación simultánea confirmaron estos resultados. Se expresaron en exceso 44MPD fusionado a GST y mycNIK en las células, se lisaron las células y se inmunoprecipitaron con anti-GST (véase el Ejemplo 9). Los productos inmunoprecipitados se analizaron mediante transferencias western. La NIK unida se detectó con anticuerpos anti-myc. Los resultados demostraron que el fragmento 44MPD también se une a NIK (no mostrado).

20 Se llevaron a cabo estudios de mutagénesis en ICDcyc, en residuos localizados en el 41 MDD, con el fin de definir los aminoácidos específicos que interaccionan con NIK. La interacción de motivos ricos en prolina en las proteínas de señalización con sus dominios cognados está bien documentada (Kay BK, Williamson MP, Sudol M. FASEB J 2000 Feb 14 (2): 231-421). Un 20% de los aminoácidos en los aminoácidos de 41 MDD son prolinas. Por lo tanto, se mutaron dos prolinas consecutivas a alaninas en dos sitios diferentes dentro de 41 MDD, se mutaron: 1-PP 336, 337AA y 2-PP360, 361AA.

25 Las mutaciones se llevaron a cabo empleando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando los siguientes cebadores:

Para la generación de los mutantes PP336, 337AA se utilizaron los siguientes cebadores:

5' ctgctcagtgagattgccgcaaaaggagggcccttg (SEQ ID NO: 7)

5' caagggcccctctttgctggcaatctcactgacgag (SEQ ID NO: 8)

Para la generación de los mutantes PP360, 361AA se utilizaron los siguientes cebadores:

30 5' gccctactgggcccgcgcatgttacaccctaaag (SEQ ID NO: 9)

5' ctttaggggttaacatgctggcgcccagtaggggc (SEQ ID NO: 10)

Además, se llevaron a cabo mutaciones en 41 MDD en residuos diferentes de prolina p. ej.

K338, E344 y W358.

35 Para la generación del mutante K338A se utilizaron los siguientes cebadores:

5' gtcagtgagattccccagcaggagggcccttggggag (SEQ ID NO: 11)

5' ctcccaagggcccctctgctgggggaatctcactgac (SEQ ID NO: 12)

Para la generación del mutante E344A se utilizaron los siguientes cebadores:

5' ggaggggcccttggggcgggcctggggcctcc (SEQ ID NO: 13)

5' ggagggcccagggcccggcccaaggccctcc (SEQ ID NO: 14)

5 Para la generación del mutante W358A se utilizaron los siguientes cebadores:

5' cagcatagcccctacgcgccccccatgttac (SEQ ID NO: 15)

5' gtaacatggggggccgctaggggctatgctg (SEQ ID NO: 16)

10 La versión mutada de cycICD se utilizó como cebo y se sometió a ensayo su interacción con el extremo C de NIK en el sistema de doble híbrido como se describe en el Ejemplo 8.

Tabla 3.

Cebo	Presa-NIK624-947 (extremo C)
cyc 289-369 (ICD)	++++
cyc 289-369 (PP 336, 337AA)	+++
cyc 289-369 (PP 360, 361AA)	++
cyc 289-369 K338A	+++
cyc 289-369 E344A	+++
cyc 289-369 W358A	+++
Lamina	-
TRAF2	+

15 Los resultados se resumen en la Tabla 3. La sustitución de prolinas por alanina en los residuos 360 y 361 redujo la afinidad hacia NIK en 50%, en contraste con otras sustituciones, que no lograron mostrar un efecto sustancial.

Los resultados obtenidos por medio de la mutagénesis de cyc demuestran que las prolinas de los residuos 360 y 361, que estaban localizadas en la región 41MDD, son importantes para la unión a NIK.

Ejemplo 4

20 **Efecto de cyc y sus mutantes por delección sobre la inducción de NF-κB mediada por la expresión en exceso de NIK:**

Un modo experimental de inducir la activación de NF-κB en células es por medio de la expresión en exceso de NIK.

25 Para verificar el efecto de cyc sobre la activación de NF-κB mediada por NIK, se transfectaron transitoriamente las células con el plásmido informador que codificaba la luciferasa bajo el control de un promotor inducible por NF-κB (pcDNA3 luciferasa) y plásmidos de expresión que codificaban NIK sola (pcS3MTNIK) o junto con un plásmido de expresión que codificaba cyc (pcDNA3cyc). La activación de NF-κB se controló por medio del análisis de informador de luciferasa (para los detalles véase el Ejemplo 10).

30 Se transfectaron células T 293 con pcS3MTNIK y pcDNA3 luciferasa. La activación de NF-κB se midió indirectamente midiendo la actividad luciferasa presente en las células. Para evaluar el efecto de cyc sobre la activación de NF-κB mediada por NIK se transfectó simultáneamente pcDNA3cyc con pcS3MTNIK y pcDNA3 luciferasa. Se llevaron a cabo varias transfecciones simultáneas para someter a ensayo el efecto de diferentes concentraciones de pcDNA3cyc con una concentración constante de pcS3MTNIK y pcDNA3 luciferasa. A las 24 horas de la transfección se cosecharon las células, se lisaron y se controló la actividad luciferasa.

Los resultados de este experimento se resumen en la Figura 4. La expresión en exceso de NIK sola induce la expresión de la actividad luciferasa indicando que NF- κ B es activado. Este incremento en la actividad luciferasa no se observó en células transfectadas o bien con el plásmido vacío solo (pc) o bien con el gen informador y el plásmido vacío (pc+luc). Se encontró que el efecto de *cyc* sobre la activación de NF- κ B dependía de su concentración con respecto a NIK, p. ej. si *cyc* se expresaba a concentraciones inferiores que NIK, potenciaba el efecto de NIK (NIK 1 μ g y *cyc* 0,1 μ g de ADN plasmídico), mientras si estaba presente a una concentración igual o superior, inhibía el efecto de NIK (NIK 1 μ g y *cyc* 1 μ g de ADN plasmídico). La transfección del plásmido *cyc* solo no dio como resultado la activación de NF- κ B (Fig 5).

El extremo C de NIK (residuos 624-947) puede ser considerado como un mutante negativo dominante (dnNIK) puesto que se puede unir a sustratos y a *cyc* (véase el Ejemplo 2), pero es catalíticamente inactivo. Se controló el efecto de la expresión en exceso de dnNIK sobre el aumento de la activación de NF- κ B observado en células que expresan una baja concentración de *cyc* y expresan en exceso NIK. Los resultados se resumen en la Figura 5. Como se ha mostrado previamente, la expresión en exceso de NIK sola inducía la activación de NF- κ B como evidenciaba el incremento de actividad luciferasa. La expresión en exceso de dnNIK junto con NIK inhibía esta activación de NF- κ B. Se observó un aumento adicional en la activación de NF- κ B mediada por NIK cuando se expresaba *cyc* a una concentración baja. No obstante, este aumento de la activación de NF- κ B fue bloqueado por la expresión en exceso de dnNIK. Este resultado confirma que el efecto inductivo de NF- κ B de *cyc* es ejercido por medio de NIK.

Se ha demostrado que el mutante AlyNIK humano (la mutación en ser humano es G860R correspondiente a la mutación aly en ratón G855R) se une a *cyc* mediante el método de doble híbrido (Ejemplo 2). La expresión en exceso de este mutante solo indujo la activación de NF- κ B tan eficazmente como NIK de tipo salvaje (Figura 6). El efecto de *cyc* sobre la activación de NF- κ B mediada por el mutante aly NIK se sometió a ensayo y se resume en la Figura 6. La expresión de *cyc* no aumentó la inducción de NF- κ B mediada por alyNIK. De este modo, a pesar de que el mutante alyNIK es capaz de unirse a *cyc*, su actividad inductora de NF- κ B no resulta afectada por *cyc*.

Como se ha mostrado más arriba, el efecto de *cyc* completa sobre la activación de NF- κ B mediada por la expresión en exceso de NIK es dependiente de la concentración, p. ej. para inhibir la activación de NF- κ B mediada por NIK se requieren concentraciones mayores o iguales de *cyc* con respecto a NIK. Por el contrario, para intensificar la activación de NF- κ B mediada por NIK, se requiere una baja concentración de *cyc* con respecto a NIK.

Se sometió a ensayo el efecto de la expresión en exceso de 41 MDD (41 residuos en el dominio distal de la membrana de *cyc*, que se ha demostrado que se unen a NIK) sobre la activación de NF- κ B inducida por NIK e intensificada por *cyc*.

La expresión de *cyc* intracelular y sus fragmentos en células de mamífero mediante transfección no logra producir una cantidad apreciable de proteína como se evidencia por medio del análisis de transferencia Western (no mostrado). Esto puede ser debido a la inestabilidad impuesta por la delección del dominio transmembrana y el dominio extracelular. El dominio intracelular contiene un dominio PEST, que podría estar expuesto en *cyc*CD y sus fragmentos y ser propenso a las proteasas presentes en las células. Para resolver este problema se generó la fusión con GST de 41 MDD para estabilizarlo y se sometió a ensayo el efecto de la proteína de fusión 41MDD-GST sobre la activación de NF- κ B inducida por NIK y *cyc*.

Se sembraron 150.000 células T 293 por pocillo en placas de 6 pocillos. A las 24 horas las células fueron transfectadas con una concentración de ADN total de 3 μ g/pocillo (ADN portador pcDNA). Se utilizó pcDNA*cyc* a una concentración de 50 ng/pocillo para inducir el aumento de actividad de NF- κ B mediada por NIK. Se utilizaron PcGST y un plásmido que codificaba la proteína de fusión GST-41MDD a una concentración elevada de 2 μ g/pocillo, pcS3MTNIK y pcDNA3luciferasa a 0,5 μ g/pocillo. A las 24 horas de la transfección, las células se cosecharon en 100 μ l de tampón de extracción y se lisaron mediante congelación y descongelación repetidas. Los productos lisados se pre-aclararon mediante centrifugación (14.000 rpm, microcentrifuga 1 min.). Se analizó la actividad luciferasa de 10 μ l del producto lisado en 360 μ l de tampón de análisis. Los resultados se resumen en la Figura 7. La inducción de NF- κ B es aumentada por la expresión en exceso de NIK y la baja expresión de *cyc*. No obstante, en una muestra en la que la proteína de fusión GST-41 MDD es expresada simultáneamente con NIK y *cyc*, los niveles de activación de NF- κ B son inferiores a los niveles observados después de la expresión en exceso de NIK sola. Este resultado indica que 41 MDD, de un modo similar a *cyc* completa, inhibe la activación de NF- κ B dependiente de NIK cuando está presente a concentraciones superiores con respecto a NIK.

Se sometió a ensayo el efecto de *cyc* y diferentes mutantes con el extremo C-terminal de *cyc* suprimido (Figura 1) sobre la activación de NF- κ B inducida por NIK. La concentración de plásmido que codificaba *cyc* y los mutantes de *cyc* utilizada fue de 0,5 μ g/ml, la misma concentración que el plásmido que codificaba NIK. En estas condiciones, se espera que *cyc* completa cause la inhibición de la activación de NF- κ B mediada por NIK.

Se sembraron 150.000 células HeLa por pocillo en placas de 6 pocillos. A las 24 horas de la transfección se realizó el mantenimiento del ADN total constante a 2 μ g/pocillo (se utilizó pcDNA3 como ADN portador). Se utilizaron plásmidos que codificaban *cyc* en toda su longitud y todos sus mutantes de delección a una concentración de 0,5 μ g/pocillo. También se utilizaron NIK y los plásmidos que codificaban la luciferasa a 0,5 μ g/pocillo. A las 24 horas de

la transfección, se cosecharon las células en 100 µl de tampón de extracción y se lisaron mediante congelación y descongelación repetidas. Los productos lisados se pre-aclararon mediante centrifugación (14.000 rpm en una microcentrífuga, 1 min.). Se analizaron las actividades de luciferasa de los productos lisados en 360 µl de tampón de análisis.

5 Los resultados se resumen en la Fig. 8. La *cyc* completa expresada a la misma concentración que NIK inhibe la actividad de NF-κB. La expresión de *cyc* que tenía delecciones progresivas en el dominio distal de la membrana (Figura 1), un dominio que se había demostrado que participaba en la unión a NIK, dio como resultado una disminución concomitante de la actividad de NF-κB. Los mutantes por delección con codones de terminación en los residuos 325 y 303 no afectaron a la actividad de NIK.

10 Estos resultados confirman que los residuos presentes en el dominio distal de la membrana de *cyc* (desde los residuos 325 a 369) participan en la unión de NIK y son importantes para modular su actividad.

Ejemplo 5

Efecto de *cyc* sobre la actividad quinasa de NIK:

15 En los ejemplos previos se ha demostrado que *cyc* se une a NIK y modula su actividad. Un posible mecanismo que subyace a esta regulación puede ser intensificado por medio de la fosforilación de NIK que se produce después de la interacción *cyc*/NIK.

20 Para someter a ensayo la hipótesis anterior, se analizó la fosforilación de NIK *in vitro* en muestras de células que expresan en exceso *cyc* sola (Fig 9 calle 1), NIK sola (Fig 9 calle 3 desde la izquierda), o NIK junto con *cyc* (Fig 9 calle 2 desde la izquierda), o NIK junto con la quinasa IKK (Fig 9 calle 4 desde la izquierda) lisadas e inmunoprecipitadas con anticuerpos anti-NIK (Para los detalles véase el Ejemplo 11).

25 La reacción con quinasa se llevó a cabo con 5 µci de P^{32} -ATP como se ha descrito previamente (Uhlik et al. 1998). Los resultados de la Figura 9 demuestran que *cyc* sola no presentaba actividad quinasa alguna (Fig 9 calle 1 desde la izquierda). Se observó un incremento de tres veces en la auto-fosforilación y en la fosforilación por IKK1 de NIK en presencia de *cyc* (comparar las líneas 2 y 3). Este resultado indica que *cyc* puede modular la actividad de NIK induciendo esta fosforilación.

Ejemplo 6

Efecto de *cyc* en la modulación de la señal transducida a través del receptor de LTβ:

30 La inducción del receptor de LTβ por su ligando, da como resultado la activación de NF-κB. Se ha sugerido en la literatura que NIK participa en la señalización a través del receptor de LTβ. De este modo, se sometió a ensayo el efecto de expresar en exceso la totalidad del polipéptido *cyc* citoplásmico o el dominio distal 41 (329-369) sobre la activación de NF-κB mediada por el receptor de LTβ. La activación de NF-κB se controló por medio del análisis de informador de luciferasa (para los detalles véase el Ejemplo 10).

35 Se preparó una línea celular a partir de fibroblastos embrionarios de ratón, que se sabe generalmente que expresan el receptor de LTβ. Se sembraron 10^5 células de la línea anterior por pocillo en placas de 6 pocillos. A las 24 horas se realizó la transfección (con reactivo de transfección Gene Porter, sistemas de terapia Gene) con el plásmido pcGST ICgc que expresaba el dominio intracelular de *cyc* (*cyc* IDC) fusionado a GST o con pcGST41MDD que expresaba el dominio distal 41 de *cyc* fusionado a GST y el plásmido de expresión que codificaba la proteína informadora de luciferasa bajo el control de un promotor inducible por NF-κB (pcDNA3 luciferasa). La activación de NF-κB se midió indirectamente midiendo la actividad luciferasa presente en las células.

40 La concentración de ADN total se normalizó a 2 µg/pocillo con vector vacío (pcDNA3). Se utilizaron pcGST ICgc y pcGST41MDD a una concentración de aproximadamente 1 µg/pocillo. A las 24 horas de la transfección, las células se estimularon con 50 ng/ml de LTβ recombinante (Núm. cat. L-5162, Sigma) durante 1 hora.

45 Los resultados se resumen en la Figura 10. La expresión del dominio intracelular de *cyc*, aumentó la activación de NF-κB por LTβ 2,5 veces, mientras la expresión de los 41 aminoácidos distales de la membrana inhibió un 50% la activación de NF-κB por LTβ.

50 Los resultados anteriores sugieren que la *cyc* puede estar implicada en la señalización a través del receptor de LTβ. El dominio distal 41 de *cyc* inhibe la señalización a través del receptor de LTβ, indicando que este polipéptido o sus fragmentos pueden servir como candidatos para el diseño de fármacos basado en péptidos. Tales fármacos pueden modular la acción de NIK y por lo tanto son valiosos en la prevención o el alivio de las respuestas inflamatorias o en la modulación de los procesos inmunorreguladores.

Ejemplo 7

Cartografiado de la región en NIK implicada en la interacción con *cyc*:

Se determinó la región de unión en NIK sometiendo a ensayo una serie de mutantes por delección de NIK con *cyc* empleando el sistema de doble híbrido de levadura. Los mutantes truncados de NIK fueron clonados en el vector cebo de doble híbrido pGBT9 y *cyc* fue clonado en el vector presa pGADT7. La unión fue sometida a ensayo en la cepa de levadura heteróloga SFY526, mediante análisis con beta-gal.

Cebo	Intensidad de la interacción con la Presa		
	<i>cyc</i>	Traf2	Lamina
NIK624-947	++++	+++	-
NIK	-/+	+	-
NIK 1-367	-	*	*
NIK 1-769	-	*	*
NIK 1-820	++	*	*
Lamina	-	-	*

5

* No sometido a ensayo

Los resultados demuestran que la región de unión a *cyc* en NIK reside en 196 aminoácidos en el extremo C (residuos 624-820).

10

Para definir más precisamente el dominio de NIK responsable de la unión a *cyc*, se crearon más mutantes por delección de NIK y se analizó su unión a *cyc* mediante inmunoprecipitación simultánea. Se transfectaron células T 293 con vector que codificaba *cyc* y mutantes por delección de NIK etiquetados con His y se sometió a ensayo la unión de los diferentes mutantes por delección a *cyc* mediante inmunoprecipitación simultánea (véanse los detalles en el Ejemplo 9). Se utilizó anticuerpo contra *cyc* para la inmunoprecipitación y se utilizaron anticuerpos anti-His para detectar los mutantes por delección de His-NIK del material inmunoprecipitado en las transferencias Western. Los resultados se resumen en la Tabla 4.

15

Tabla 4.

Constructo	Unión a <i>cyc</i>
NIK 1-947 (completa)	+
NIK 1-821	+
NIK 1-771	+
NIK 1-720	+
NIK 1-640	-

Los resultados indican que un dominio de NIK que comprende 81 residuos aminoácido, localizado entre los aminoácidos 640 y 720 (SEQ ID NO: 18), es responsable de la unión a *cyc*.

20

Ejemplo 8

El método del sistema de doble híbrido:

25

El sistema de doble híbrido utilizado para el escrutinio fue Matchmaker versión III (Clontech). En este sistema el gen cebo (gen NIK) es expresado como una fusión al dominio de unión al ADN de GAL4 (DNA-BD), mientras los genes presa o la genoteca de ADNc es expresada como una fusión al dominio de activación de GAL4 (AD). Cuando el DNA-BD y el AD se encuentran en íntima proximidad, se activa la transcripción de cuatro genes informadores (que codifican HIS, ADE, lacZ y α -gal).

Se ha seleccionado como presa una genoteca de médula ósea humana (Clontech Núm. cat. HY4053AH), basándose en evidencias que indican un papel fundamental de NIK en el desarrollo y la función del sistema linfóide.

30

Los clones se hacen crecer sobre placas en condiciones de alta restricción esto es, en placas sin LEU (marcador de selección para el plásmido que codifica el cebo), TRP (marcador de selección para el plásmido que codifica la presa), HIS y ADE y se impregnan con sustratos para la detección de la expresión de α -gal. Los

plásmidos se purificaron a partir de los clones positivos mediante lisis de las células de levadura (con detergente y estrés mecánico) seguido de extracción con fenol y precipitación con etanol del ADN. Los insertos de ADNc en los plásmidos se amplificaron mediante PCR con cebadores contiguos específicos para el vector de la genoteca pACT2. Los ADNc amplificados individuales se clonaron directamente en un vector de expresión de mamífero para un análisis bioquímico adicional.

Ejemplo 9

Método de Inmunoprecipitación:

Para la transfección, se sembraron 1,5 millones de células T 293 en placas de 10 cm. A las 24 horas, se llevó a cabo la transfección simultánea asistida por fosfato de calcio (Molecular Cloning 2ª edición 15.33) con los plásmidos de expresión de NIK y *cyc* etiquetadas con *myc*, manteniendo una concentración de ADN total de 20 µg por placa. A las 30 horas, las células se cosecharon y se lisaron en tampón de lisis NP-40 al 1% (NP-40 al 0,5%, Tris 10 mM (pH 7,5), NaCl 150 mM, EDTA 1 mM). Las inmunoprecipitaciones se llevaron a cabo incubando 16 horas con los respectivos anticuerpos (policlonal de conejo de Santa Cruz) dirigidos contra los extremos C de *cyc* o dirigidos contra NIK que habían sido previamente adsorbidos con proteína A escasa (policlonal de conejo) o proteína G escasa (monoclonal de ratón). Los productos inmunoprecipitados se lavaron tres veces con tampón de lisis y una vez con solución salina tamponada. Las cuentas se hirvieron en 40 µl de tampón para muestra de Laemmli y se cargaron 20 µl SDS/PAGE al 10%. Las proteínas se transfirieron desde el gel a una membrana de PVDF y se sondearon con anti-*cyc* y anti-NIK, seguido de anticuerpo anti-conejo de cabra conjugado con peroxidasa de rábano picante. Las transferencias se revelaron por medio de Enhanced Chemi Luminiscence (ECL) utilizando Luminol (cat. A8511, Sigma) como sustrato.

Ejemplo 10

Análisis de activación de NF-κB mediado por NIK:

Se transfectaron células T 293 (1,5 x 10⁵ por pocillo en placas de 6 pocillos) con una cantidad de ADN total de 3 µg por pocillo. Cuando fue necesario se utilizó el vector vacío pcDNA como ADN portador. Las transfecciones simultáneas se llevaron a cabo como se ha descrito en el Ejemplo 9 con 1 µg de pcS3MTNIK y 0,5 µg de vector pcDNA3 que expresaba la luciferasa bajo el control de HIV-LTR (Largas repeticiones terminales del virus de la Inmunodeficiencia humana), un promotor regulado al alza por NF-κB. El ADN que codificaba la *cyc* (pcDNA *cyc*) se introdujo en pcDNA y se utilizó en una proporción de 1/10, 1/2, y 1/1 de la concentración de vector de expresión de NIK (los vectores tienen aproximadamente el mismo peso molecular) 24 horas después de la transfección, las células se cosecharon en 100 µl de tampón de extracción (fosfato de potasio 0,1 M, pH 7,8, DTT 1 mM) y se lisaron por medio de congelación y descongelación repetidas (Nitrógeno líquido y 1 min. a 22 C). Los productos lisados se aclararon previamente mediante centrifugación (14.000 rpm, microcentrifuga, 1 min.). Se analizó la actividad luciferasa de 5 µl de producto lisado en 360 µl de tampón (fosfato de potasio 20 mM, Glicil-Glicina 20 mM, Sulfato de magnesio 8,5, µM, EGTA 2 mM, DTT 1 mM, ATP 1 mM y D-luciferina 5 µM (cat L-6882, Sigma).

Ejemplo 11

Análisis de quinasas:

Se transfectaron células T 293 (2 x 10⁶ por placa de 10 cm) por medio del método con fosfato de calcio con 10 µg de pcS3MTNIK y 10 µg de pcDNACyc o IKK1 etiquetada con His (pcHISIKK1) manteniendo la concentración de ADN total de 20 µg por placa utilizando pcDNA vacío como ADN portador. A las 24 horas, se cosecharon las células y se lisaron en tampón de lisis NP-40 al 1% y se llevó a cabo la inmunoprecipitación durante 8 horas con anticuerpo anti-NIK de conejo adsorbido previamente en cuentas de sefarosa-proteína A. Se llevó a cabo la reacción de quinasas con 5 µci de γ³²P-ATP como se ha descrito previamente (Uhlík et al. 1998).

Ejemplo 12

Preparación y escrutinio de pequeñas moléculas no peptídicas que inhiben la interacción NIK-cyc:

Se preparó un banco de moléculas no peptídicas pequeñas por medio de química combinatoria. El diseño de la tecnología de química combinatoria es bien conocida en la técnica y es descrita p. ej. por Hermkens et al. (1996). Las células que expresan NIK, *cyc* y el plásmido informador que codifica la luciferasa bajo el control de un promotor inducible por NF-κB (pcDNA3 luciferasa) se exponen a compuestos orgánicos sintéticos individuales y se somete a ensayo la activación de NF-κB como se ha descrito en el ejemplo 4.

Los compuestos capaces de inhibir la activación de NF-κB se seleccionan para un ensayo adicional.

Alternativamente, las células son transfectadas transitoriamente con *cyc* y el plásmido informador que codifica la luciferasa bajo el control de un promotor inducible por NF-κB (pcDNA3 luciferasa) y expuestas a compuestos orgánicos sintéticos individuales. Tras la exposición a compuestos sintéticos, se somete a ensayo la activación de NF-κB como se ha descrito en el ejemplo 6, cuando la NIK endógena es activada por la unión del

ligando al correspondiente receptor.

Los compuestos capaces de inhibir la activación de NF- κ B se seleccionan para un ensayo futuro.

Ejemplo 13

Interacción de NIK y *cyc* endógenas.

5 Se demostró la interacción de NIK y *cyc* en un entorno de células de mamífero, en productos lisados de células T 293 que expresan en exceso estas proteínas (véase el Ejemplo 4). El siguiente experimento se llevó a cabo con proteínas endógenas, en células que expresan naturalmente estas proteínas. De este modo, se incubaron células mononucleares de sangre periférica (PMBC) (500×10^6 células) con IL-2, se lisaron y se inmunoprecipitaron con anticuerpos anti-*cyc* (para la inmunoprecipitación véase el Ejemplo 9). Las proteínas inmunoprecipitadas simultáneamente unidas a *cyc* se detectaron en transferencias Western utilizando anticuerpos relevantes. Las proteínas candidato sometidas a ensayo para la inmunoprecipitación simultánea con *cyc* fueron aquellas proteínas normalmente presentes en el signalosoma, tales como NIK, IKK α (IKK-1), IKK β (IKK2), IKK γ (NEMO). Las proteínas inmunoprecipitadas simultáneamente se sometieron a ensayo en productos lisados de células sometidas a ensayo en el momento 0 y después de cuatro horas de incubación con IL-2. Los resultados resumidos en la Figura 16 A demuestran que NIK es precipitada simultáneamente con *cyc* antes y después de la estimulación con IL-2. Por lo tanto, NIK se encontraba asociada constitutivamente con *cyc*. Se encontraron trazas de IKK-1 a nivel basal y después de 4 horas de incubación con IL-2, otros componentes del signalosoma, esto es, IKK-2 y NEMO fueron reclutados por el receptor de IL-2 a través de *cyc*. Los resultados indican que la cadena gamma común del receptor de IL-2 está unida a NIK en una localización diferente a la región de unión a IKK-1. Se obtuvieron resultados similares tras la estimulación de las células con IL-15 (figura 16A panel derecho).

Para verificar si el signalosoma inmunoprecipitado simultáneamente con *cyc* era activo, se sometieron a ensayo los productos inmunoprecipitados anteriores en un análisis de quinasa (véanse los detalles en el Ejemplo 11) que controla la fosforilación de GST-IK β α 1-54. Los resultados resumidos en la Figura 16 B indicaron que solamente los productos inmunoprecipitados de células estimuladas con IL-2 son capaces de fosforilar GS-IK β α 1-54.

25 De este modo estos resultados demuestran que en condiciones fisiológicas, NIK está asociada constitutivamente con *cyc*, y que esta interacción está implicada en la señalización de IL-2 y la activación de NF- κ B dependiente de NIK. Por lo tanto la inhibición de la interacción de *cyc* y NIK dará como resultado la inhibición de las actividades de señalización de IL-2 y la inhibición de la activación de NF- κ B inducida por NIK.

REFERENCIAS

- 5 Akiba, H., Nakano, H., Nishinaka, S., Shindo, M., Kobata, T., Atsuta, M., Morimoto, C., Ware, C. F., Malinin, N. L., Wallach, D., Yagita, H., y Okumura, K. (1998). CD27, a member of the tumor necrosis factor receptor superfamily, activates NF-kappaB and stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase via TRAF2, TRAF5, and NF- kappaB-inducing kinase. *J Biol Chem* 273, 13353-8.
- Baldwin, A. S., Jr. (1996). The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. *Annu Rev Immunol* 14, 649-83.
- 10 Canicio, J., Ruiz-Lozano, P., Carrasco, M., Palacin, M., Chien, K., Zorzano, A., y Kaliman, P. (2001). Nuclear factor kappa B-inducing kinase and Ikappa B kinase-alfa signal skeletal muscle cell differentiation. *J Biol Chem* 276, 20228-33.
- Darnay, B. G., Ni, J., Moore, P. A., y Aggarwal, B. B. (1999). Activation of NF-kappaB by RANK requires tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF) 6 and NF- kappaB-inducing kinase. Identification of a novel TRAF6 interaction motif *J Biol Chem* 274, 7724-31.
- 15 DiSanto, J. P., Muller, W., Guy-Grand, D., Fischer, A., y Rajewsky, K. (1995). Lymphoid development in mice with a targeted deletion of the interleukin 2 receptor gamma chain. *Proc Natl Acad Sci USA* 92, 377-81.
- Fagarasan, S., Shinkura, R., Kamata, T., Nogaki, F., Ikuta, K., Tashiro, K., Y Honjo, T. (2000). A lymphoplasia (aly) - type nuclear factor kappaB-inducing kinase (NIK) causes defects in secondary lymphoid tissue chemokine receptor signaling and homing of peritoneal cells to the gut-associated lymphatic tissue system. *J Exp Med* 191, 1477-86.
- 20 Fields, S. y Song, O. (1989). A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* 340, 245-6.
- Foehr, E. D., Bohuslav, J., Chen, L. F., DeNoronha, C., Geleziunas, R., Lin, X., O'Mahony, A., y Greene, W. C. (2000). The NF-kappa B-inducing kinase induces PC12 cell differentiation and prevents apoptosis. *J Biol Chem* 275, 34021-4.
- 25 Garceau, N., Kosaka, Y., Masters, S., Hambor, J., Shinkura, R., Honjo, T., y Noelle, R. J. (2000). Lineage-restricted function of nuclear factor kappaB-inducing kinase (NIK) in transducing signals via CD40. *J Exp Med* 191,381-6.
- Geleziunas, R., Ferrell, S., Lin, X., Mu, Y., Cunningham, E. T., Jr., Grant, M., Connelly, M. A., Hambor, J. E., Marcu, K. B., y Greene, W. C. (1998). Human T-cell leukemia virus type 1 Tax induction of NF-kappaB involves activation of the IkappaB kinase alfa (IKKalfa) and IKKbeta cellular kinases. *Mol Cell Biol* 18, 5157-65.
- 30 Ghosh, S., May, M. J., y Kopp, E. B. (1998). NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol* 16, 225-60.
- Hermkens PH y Adang AE, (1996). The contribution of combinatorial chemistry to lead generation: an interim analysis. *Curr Med Chem* 2001 Jul; 8 (9): 985-98
- 35 Karin, M. y Ben-Neriah, Y. (2000). Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF- [kappa] B activity. *Annu Rev Immunol* 18, 621-63.
- Leonard, W. J., Shores, E. W., y Love, P. E. (1995). Role of the common cytokine receptor gamma chain in cytokine signaling and lymphoid development. *Immunol Rev* 148, 97-114.
- 40 Lin, X., Cunningham, E. T., Jr., Mu, Y., Geleziunas, R., y Greene, W. C. (1999). The proto- oncogene Cot kinase participates in CD3/CD28 induction of NF-kappaB acting through the NF-kappaB-inducing kinase and IkappaB kinases. *Immunity* 10, 271-80.
- Ling, L., Cao, Z., y Goeddel, D. V. (1998). NF-kappaB-inducing kinase activates IKK-alfa by phosphorylation of Ser-176. *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 3792-7.
- Malinin, N. L., Boldin, M. P., Kovalenko, A. V., y Wallach, D. (1997). MAP3K-related kinase involved in NF-kappaB induction by TNF, CD95 and IL-1. *Nature* 385, 540-4.
- 45 Matsumoto, M., Iwamasa, K., Rennert, P. D., Yamada, T., Suzuki, R., Matsushima, A., Okabe, M., Fujita, S., y Yokoyama, M. (1999). Involvement of distinct cellular compartments in the abnormal lymphoid organogenesis in lymphotoxin-alfa- deficient mice and alymphoplasia (aly) mice defined by the chimeric analysis. *J Immunol* 163, 1584-91.
- 50 Matsushima, A., Kaisho, T., Rennert, P. D., Nakano, H., Kurosawa, K., Uchida, D., Takeda, K., Akira, S., y Matsumoto, M. (2001). Essential role of nuclear factor (NF)- kappaB-inducing kinase and inhibitor of kappaB

- (IkappaB) kinase alfa in NF-kappaB activation through lymphotoxin beta receptor, but not through tumor necrosis factor receptor I. *J Exp Med* 193, 631-6.
- Mercurio, F. y Manning, A. M. (1999). Multiple signals converging on NF-kappaB. *Curr Opin Cell Biol* 11, 226-32.
- 5 Miyawaki, S., Nakamura, Y., Suzuka, H., Koba, M., Yasumizu, R., Ikehara, S., y Shibata, Y. (1994). A new mutation, aly, that induces a generalized lack of lymph nodes accompanied by immunodeficiency in mice. *Eur Immunol* 24, 429-34.
- 10 Natoli, G., Costanzo, A., Moretti, F., Fulco, M., Balsano, C., y Levrero, M. (1997). Tumor necrosis factor (TNF) receptor 1 signaling downstream of TNF receptor-associated factor 2. Nuclear factor kappaB (NFkappaB) - inducing kinase requirement for activation of activating protein 1 and NFkappaB but not of c-Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase. *J Biol Chem* 272, 26079-82.
- Noguchi, M., Yi, H., Rosenblatt, H. M., Filipovich, A. H., Adelstein, S., Modi, W. S., McBride, O. W., y Leonard, W. J. (1993). Interleukin-2 receptor gamma chain mutation results in X-linked severe combined immunodeficiency in humans. *Cell* 73, 147-57.
- Pahl, H. L. (1999). Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene* 18, 6853-66.
- 15 Regnier, C. H., Song, H. Y., Gao, X., Goeddel, D. V., Cao, Z., y Rothe, M. (1997). Identification and characterization of an IkappaB kinase. *Cell* 90, 373-83.
- Rothe, M., Wong, S. C., Henzel, W. J., y Goeddel, D. V. (1994). A novel family of putative signal transducers associated with the cytoplasmic domain of the 75 kDa tumor necrosis factor receptor. *Cell* 78, 681-92.
- 20 Senftleben, U., Cao, Y., Xiao, G., Greten, F. R., Krahn, G., Bonizzi, G., Chen, Y., Hu, Y., Fong, A., Sun, S. C., y Karin, M. (2001). Activation by IKKalpha of a second, evolutionary conserved, NF-kappa B signaling pathway. *Science* 293, 1495-9.
- Shinkura, R., Kitada, K., Matsuda, F., Tashiro, K., Ikuta, K., Suzuki, M., Kogishi, K., Serikawa, T., y Honjo, T. (1999). Alymphoplasia is caused by a point mutation in the mouse gene encoding NF-kappa b-inducing kinase. *Nat Genet* 22, 74-7.
- 25 Smith, G. P. (1985). Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science* 228, 1315-7.
- Sylla, B. S., Hung, S. C., Davidson, D. M., Hatzivassiliou, E., Malinin, N. L., Wallach, D., Gilmore, T. D., Kieff, E., y Mosialos, G. (1998). Epstein-Barr virus-transforming protein latent infection membrane protein 1 activates transcription factor NF-kappaB through a pathway that includes the NF-kappaB-inducing kinase and the IkappaB kinases IKKalpha and IKKbeta. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 10106-11.
- 30 Takeuchi, M., Rothe, M., y Goeddel, D. V. (1996). Anatomy of TRAF2. Distinct domains for nuclear factor-kappaB activation and association with tumor necrosis factor signaling proteins. *J Biol Chem* 271, 19935-42.
- Uhlik, M., Good, L., Xiao, G., Harhaj, E. W., Zandi, E., Karin, M., y Sun, S. C. (1998). NF- kappaB-inducing kinase and IkappaB kinase participate in human T-cell leukemia virus I Tax-mediated NF-kappaB activation. *J Biol Chem* 273, 21132-6.
- 35 Xiao, G., Harhaj, E. W., y Sun, S. C. (2001). NF-kappaB-inducing kinase regulates the processing of NF-kappaB2 p100. *Mol Cell* 7, 401-9.
- Xiao, G. y Sun, S. C. (2000). Negative regulation of the nuclear factor kappa B-inducing kinase by a cis-acting domain. *J Biol Chem* 275, 21081-5.
- 40 Yamada, T., Mitani, T., Yorita, K., Uchida, D., Matsushima, A., Iwamasa, K., Fujita, S., y Matsumoto, M. (2000). Abnormal immune function of hemopoietic cells from alymphoplasia (aly) mice, a natural strain with mutant NF-kappa B-inducing kinase. *J Immunol* 165, 804-12.
- Yamamoto y Gaynor. *The Journal of Clinical Investigation* (2001) 107: 135-142.
- 45 Yin, L., Wu, L., Wesche, H., Arthur, C. D., White, J. M., Goeddel, D. V., y Schreiber, R. D. (2001). Defective lymphotoxin-beta receptor-induced NF-kappaB transcriptional activity in NIK-deficient mice. *Science* 291, 2162-5.

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> Yeda Research and Development Co. Ltd.
- 5 Wallach, David
Shmushkovich, Taisia
Ramakrishnan, Parameswaran
- 10 <120> Derivados de NIK, su producción y uso
<130> 814
<150> 149217
15 <151> 18-04-2002
<150> 152183
<151> 08-10-2002
- 20 <160> 19
<170> PatentIn versión 3.1
- 25 <210> 1
<211> 86
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 1
- Glu Arg Thr Met Pro Arg Ile Pro Thr Leu Lys Asn Leu Glu Asp Leu
1 5 10 15
- Val Thr Glu Tyr His Gly Asn Phe Ser Ala Trp Ser Gly Val Ser Lys
20 25 30
- Gly Leu Ala Glu Ser Leu Gln Pro Asp Tyr Ser Glu Arg Leu Cys Leu
35 40 45
- 30 Val Ser Glu Ile Pro Pro Lys Gly Gly Ala Leu Gly Glu Gly Pro Gly
50 55 60
- Ala Ser Pro Cys Asn Gln His Ser Pro Tyr Trp Ala Pro Pro Cys Tyr
65 70 75 80
- Thr Leu Lys Pro Glu Thr
85
- <210> 2
35 <211> 41
<212> PRT
<213> Homo sapiens

ES 2 370 712 T3

<400> 2

Leu Cys Leu Val Ser Glu Ile Pro Pro Lys Gly Gly Ala Leu Gly Glu
 1 5 10 15

Gly Pro Gly Ala Ser Pro Cys Asn Gln His Ser Pro Tyr Trp Ala Pro
 20 25 30

Pro Cys Tyr Thr Leu Lys Pro Glu Thr
 35 40

5 <210> 3
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 3

10 Trp Ala Pro Pro Cys Tyr Thr Leu Lys Pro Glu Thr
 1 5 10

15 <210> 4
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 4

tgggccccc catgttacac cctaaagcct gaaacctga 39

20 <210> 5
 <211> 261
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

25 <400> 5

gaacggacga tgccccgaat tcccaccctg aagaacctag aggatcttgt tactgaatac 60
cacgggaact tttcggcctg gagggtgtg tctaaggac tggctgagag tctgcagcca 120
gactacagtg aacgactctg cctcgtcagt gagattcccc caaaaggagg ggccttggg 180
gaggggcctg gggcctcccc atgcaaccag catagccct actgggcccc cccatgttac 240
accctaaagc ctgaaacctg a 261

30 <210> 6
 <211> 126
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 6

ctctgcctcg tcagtgagat tccccaaaa ggaggggccc ttggggaggg gcctggggcc 60
tccccatgca accagcatag cccctactgg gccccccat gttaccct aaagcctgaa 120
acctga 126

35 <210> 7
 <211> 37
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

40 <400> 7

ctcgtcagtg agattgccgc aaaaggagg ggccttg 37

	<210> 8 <211> 37 <212> ADN <213> Homo sapiens	
5	<400> 8 caagggcccc tccttttgcg gcaatctcac tgacgag	37
10	<210> 9 <211> 35 <212> ADN <213> Homo sapiens	
15	<400> 9 gccccctactg ggccgcccga tgttacaccc taaag	35
20	<210> 10 <211> 35 <212> ADN <213> Homo sapiens	
25	<400> 10 ctttaggggtg taacatgcgg cggcccagta ggggc	35
30	<210> 11 <211> 39 <212> ADN <213> Homo sapiens	
35	<400> 11 gtcagtgaga ttccccagc aggagggggcc cttgggggag	39
40	<210> 12 <211> 39 <212> ADN <213> Homo sapiens	
45	<400> 12 ctccccaaagg gccccctctg ctgggggaat ctcactgac	39
50	<210> 13 <211> 33 <212> ADN <213> Homo sapiens	
55	<400> 13 ggagggggccc ttggggcggg gcctggggcc tcc	33
60	<210> 14 <211> 33 <212> ADN <213> Homo sapiens	
65	<400> 14 ggaggcccca ggccccgccc caagggcccc tcc	33
70	<210> 15 <211> 33 <212> ADN <213> Homo sapiens	

ES 2 370 712 T3

<400> 15
cagcatagcc cctacgcggc cccccatgt tac 33

5 <210> 16
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

10 <400> 16
gtaacatggg ggggccgcgt aggggctatg ctg 33

15 <210> 17
 <211> 44
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 17
Trp Leu Glu Arg Thr Met Pro Arg Ile Pro Thr Leu Lys Asn Leu Glu
1 5 10 15

Asp Leu Val Thr Glu Tyr His Gly Asn Phe Ser Ala Trp Ser Gly Val
20 25 30

Ser Lys Gly Leu Ala Glu Ser Leu Gln Pro Asp Tyr
35 40

20 <210> 18
 <211> 81
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

25 <400> 18
His Arg Val Ser Ala Ala Glu Leu Gly Gly Lys Val Asn Arg Ala Leu
1 5 10 15

Gln Gln Val Gly Gly Leu Lys Ser Pro Trp Arg Gly Glu Tyr Lys Glu
20 25 30

Pro Arg His Pro Pro Pro Asn Gln Ala Asn Tyr His Gln Thr Leu His
35 40 45

Ala Gln Pro Arg Glu Leu Ser Pro Arg Ala Pro Gly Pro Arg Pro Ala
50 55 60

Glu Glu Thr Thr Gly Arg Ala Pro Lys Leu Gln Pro Pro Leu Pro Pro
65 70 75 80

Glu

30 <210> 19
 <211> 324
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

ES 2 370 712 T3

<400> 19

Pro Leu Thr Ala Gln Ala Ile Gln Glu Gly Leu Arg Lys Glu Pro Ile
 1 5 10 15

His Arg Val Ser Ala Ala Glu Leu Gly Gly Lys Val Asn Arg Ala Leu
 20 25 30

Gln Gln Val Gly Gly Leu Lys Ser Pro Trp Arg Gly Glu Tyr Lys Glu
 35 40 45

Pro Arg His Pro Pro Pro Asn Gln Ala Asn Tyr His Gln Thr Leu His
 50 55 60

Ala Gln Pro Arg Glu Leu Ser Pro Arg Ala Pro Gly Pro Arg Pro Ala
 65 70 75 80

Glu Glu Thr Thr Gly Arg Ala Pro Lys Leu Gln Pro Pro Leu Pro Pro
 85 90 95

ES 2 370 712 T3

Glu Pro Pro Glu Pro Asn Lys Ser Pro Pro Leu Thr Leu Ser Lys Glu
 100 105 110

Glu Ser Gly Met Trp Glu Pro Leu Pro Leu Ser Ser Leu Glu Pro Ala
 115 120 125

Pro Ala Arg Asn Pro Ser Ser Pro Glu Arg Lys Ala Thr Val Pro Glu
 130 135 140

Gln Glu Leu Gln Gln Leu Glu Ile Glu Leu Phe Leu Asn Ser Leu Ser
 145 150 155 160

Gln Pro Phe Ser Leu Glu Glu Gln Glu Gln Ile Leu Ser Cys Leu Ser
 165 170 175

Ile Asp Ser Leu Ser Leu Ser Asp Asp Ser Glu Lys Asn Pro Ser Lys
 180 185 190

Ala Ser Gln Ser Ser Arg Asp Thr Leu Ser Ser Gly Val His Ser Trp
 195 200 205

Ser Ser Gln Ala Glu Ala Arg Ser Ser Ser Trp Asn Met Val Leu Ala
 210 215 220

Arg Gly Arg Pro Thr Asp Thr Pro Ser Tyr Phe Asn Gly Val Lys Val
 225 230 235 240

Gln Ile Gln Ser Leu Asn Gly Glu His Leu His Ile Arg Glu Phe His
 245 250 255

Arg Val Lys Val Gly Asp Ile Ala Thr Gly Ile Ser Ser Gln Ile Pro
 260 265 270

Ala Ala Ala Phe Ser Leu Val Thr Lys Asp Gly Gln Pro Val Arg Tyr
 275 280 285

Asp Met Glu Val Pro Asp Ser Gly Ile Asp Leu Gln Cys Thr Leu Ala
 290 295 300

Pro Asp Gly Ser Phe Ala Trp Ser Trp Arg Val Lys His Gly Gln Leu
 305 310 315 320

Glu Asn Arg Pro

REIVINDICACIONES

- 5 1. El fragmento polipeptídico de la quinasa inductora de NF-κB (NIK) que consiste en el extremo C de NIK desde el residuo 624 al residuo 947 como se muestra en el SEQ ID NO: 19, o una muteína del mismo en el que hasta 25% de los residuos de aminoácido son suprimidos, añadidos o sustituidos por otros residuos de aminoácido o un derivado permutado circularmente del mismo, o un fragmento del mismo, donde dicho fragmento polipeptídico de NIK, muteína, derivado permutado circularmente o fragmento del mismo es capaz de unirse a la cadena gamma común (cyc) de IL-2R.
2. El fragmento polipeptídico de NIK de la reivindicación 1, que comprende NIK640 a 720 (SEQ ID NO: 18).
- 10 3. Una muteína del fragmento polipeptídico de NIK de la reivindicación 1, donde el codón correspondiente al codón 860 de NIK humana codifica arginina en lugar de glicina.
4. Un ADN que codifica el polipéptido de la reivindicación 1 o 2.
5. Un vector que comprende el ADN de la reivindicación 4.
6. Una célula que comprende el vector de la reivindicación 5.
- 15 7. Un método para la producción del polipéptido de la reivindicación 1 o 2, que comprende cultivar la célula de la reivindicación 6 y recoger el polipéptido producido.
8. Un anticuerpo o un fragmento del mismo que reconoce y se une específicamente al polipéptido de la reivindicación 1 o 2 y es capaz de inhibir la interacción NIK-cyc.
9. El anticuerpo de la reivindicación 8, que es policlonal o monoclonal, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo totalmente humanizado, un anticuerpo anti-Id o un anticuerpo intracelular.
- 20 10. Una composición farmacéutica que comprende un fragmento polipeptídico de NIK, o una muteína, un derivado permutado circularmente o un fragmento del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, el ADN de la reivindicación 4 o el ADN antisentido de este, el vector de la reivindicación 5 o un vector que comprende dicho ADN antisentido, o el anticuerpo de la reivindicación 8 o 9.
- 25 11. Una composición farmacéutica que comprende NIK, o un fragmento polipeptídico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, el ADN de la reivindicación 4 o el ADN antisentido de este, el vector de la reivindicación 5 o un vector que comprende dicho ADN antisentido, o el anticuerpo de la reivindicación 8 o 9 para su uso en el tratamiento o la prevención del cáncer, la artritis reumatoide y otras artropatías, la osteoartritis, la enfermedad inflamatoria intestinal, el asma, el infarto cardíaco, la enfermedad de Alzheimer o la aterosclerosis, la tiroiditis inmunitaria y la anemia hemolítica autoinmunitaria.
- 30 12. El uso de NIK, un fragmento polipeptídico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, el ADN de la reivindicación 4 o el ADN antisentido de este, el vector de la reivindicación 5 o un vector que comprende dicho ADN antisentido, o el anticuerpo de la reivindicación 8 o 9 para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento o la prevención del cáncer, la artritis reumatoide y otras artropatías, la osteoartritis, la enfermedad inflamatoria intestinal, el asma, el infarto cardíaco, la enfermedad de Alzheimer o la aterosclerosis, la tiroiditis inmunitaria y la anemia hemolítica autoinmunitaria.
- 35

Figura 1

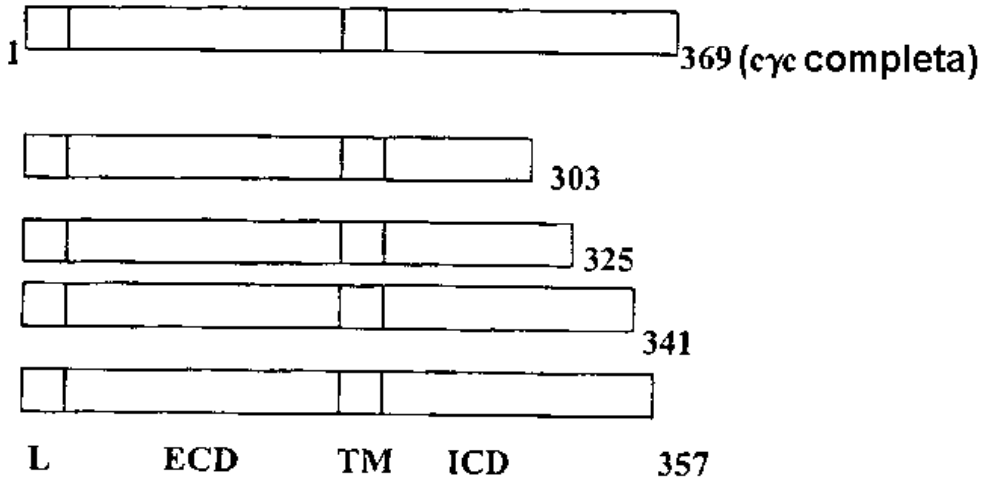


Figura 2



Figura 3

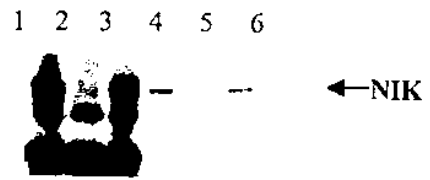


Figura 4

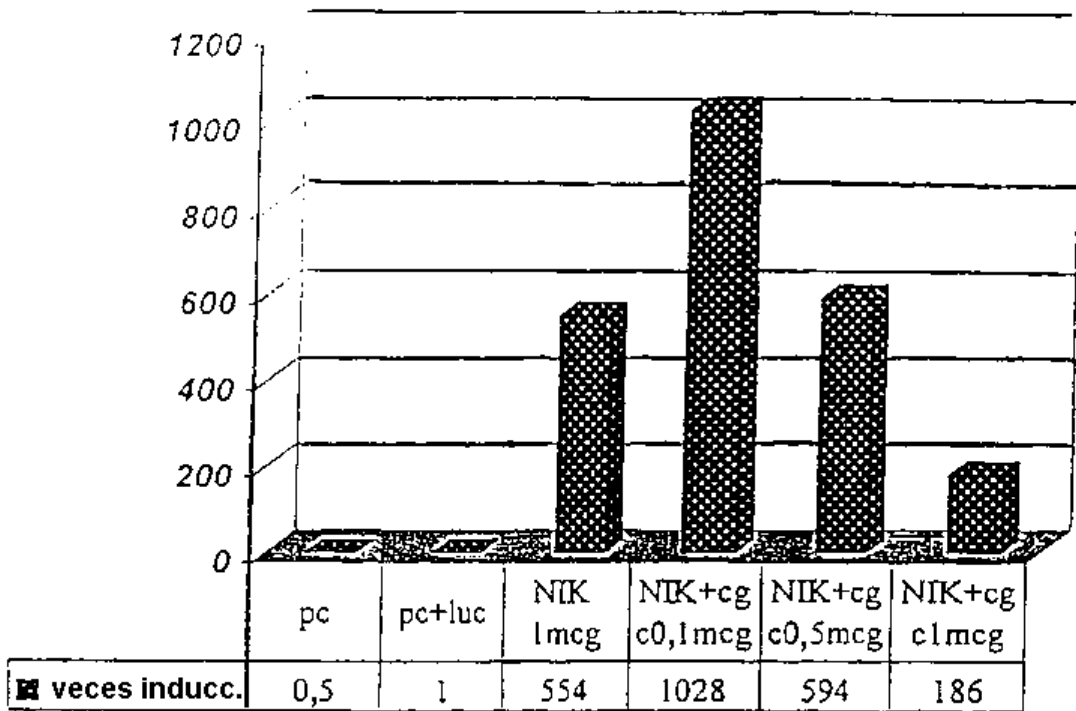


Figura 5

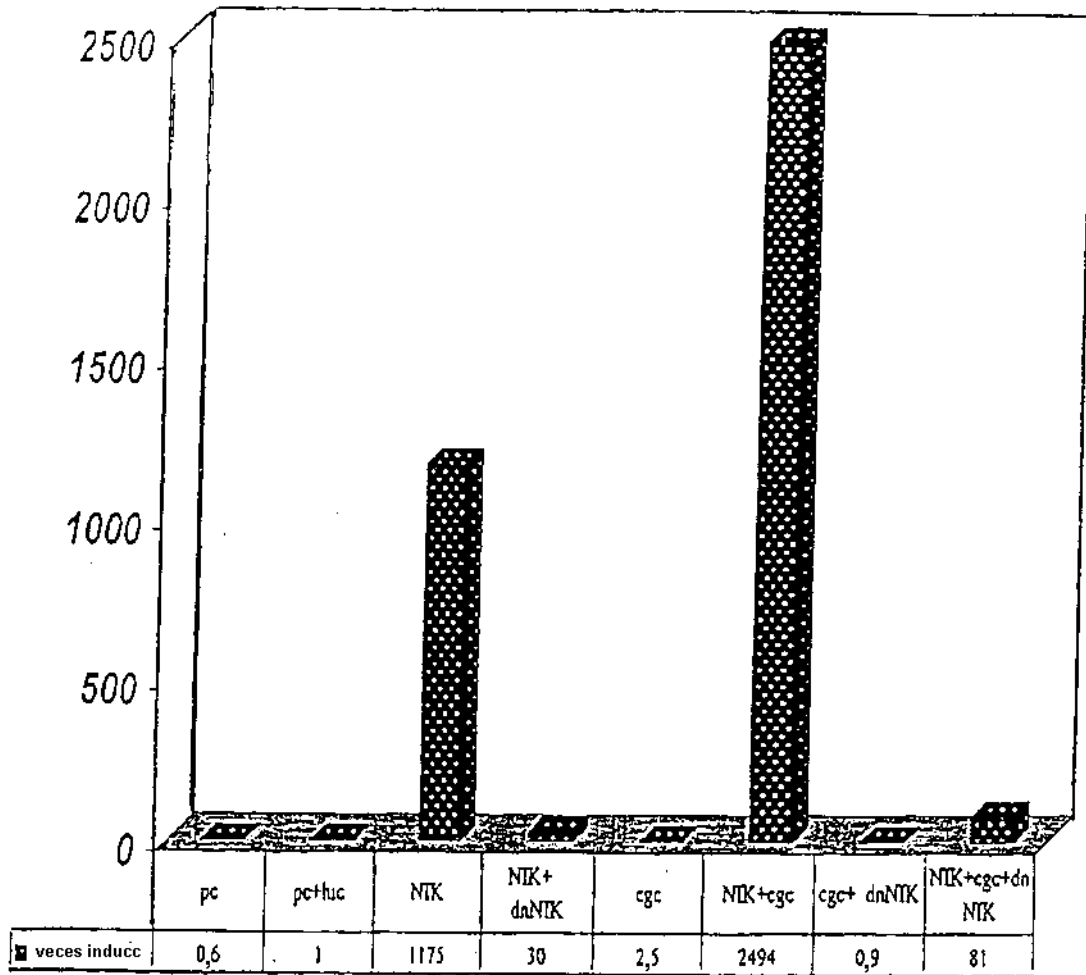


Figura 6

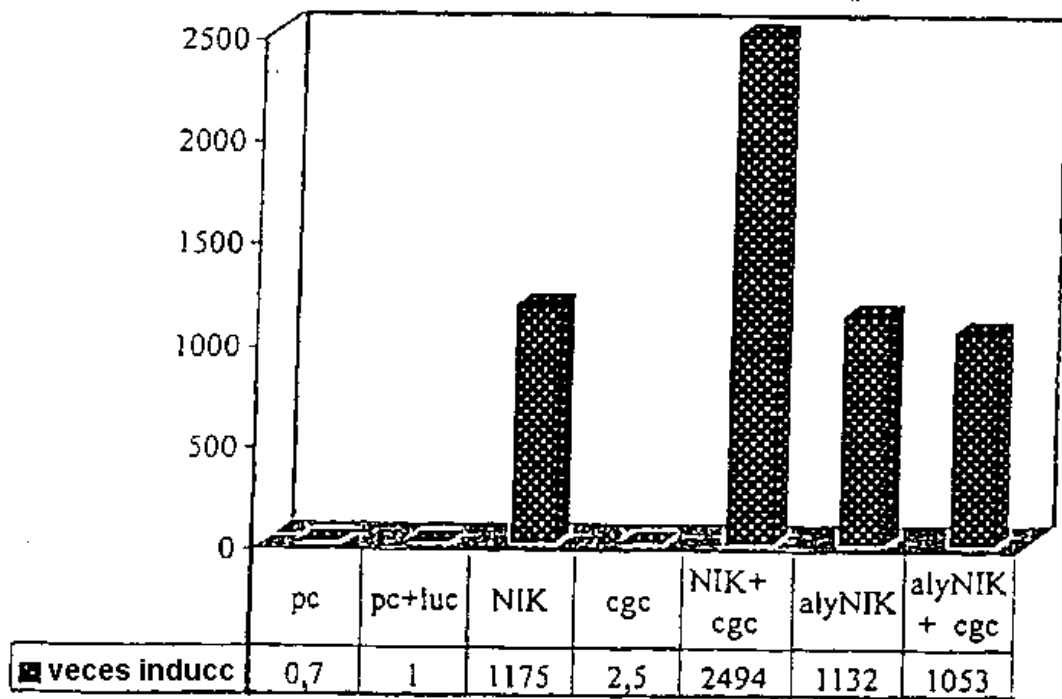


Figura 7

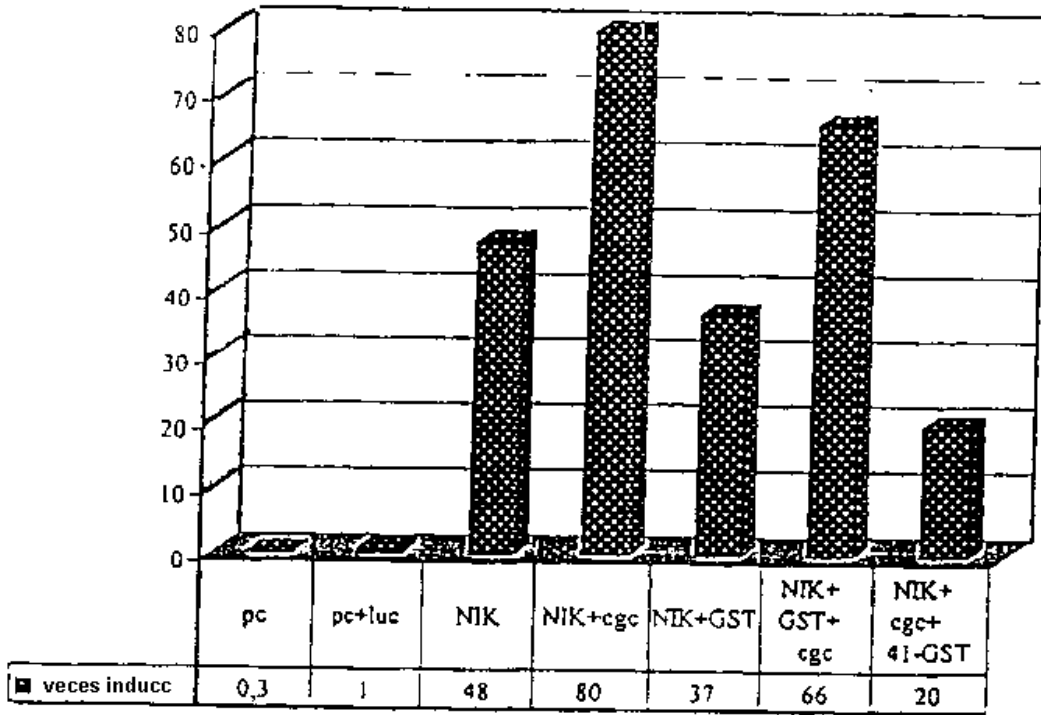


Figura 8

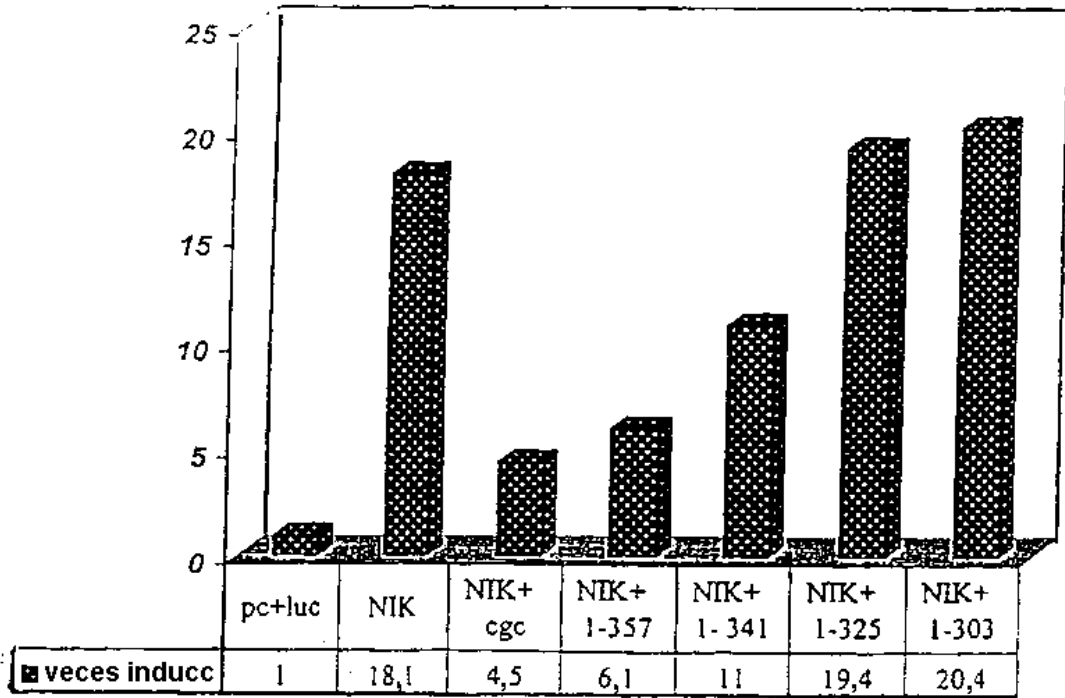


Figura 9



Figura 10

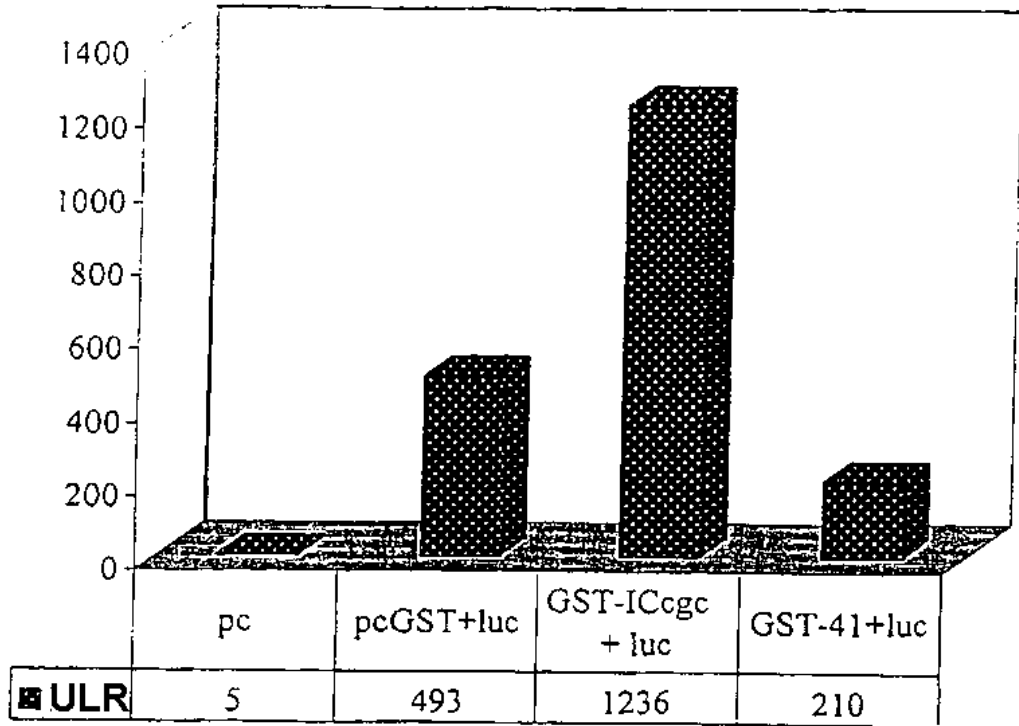


Figura 11

ERTMPRIPTLKNLEDLVTEYHGNFSAWSGVSKGLAESLQPDYSERLCLVSEIPPK
GGALGEGPGASPCNQHSPYWAPPCYTLKPET

Figura 12

LCLVSEIPPKGGALGEGPGASPCNQHSPYWAPPCYTLKPET

Figura 13

GAACGGACGATGCCCCGAATTCCCACCCTGAAGAACCTAGAGGATCTTGTTA
CTGAATACCACGGGAACTTTTCGGCCTGGAGTGGTGTGTCTAAGGGACTGGC
TGAGAGTCTGCAGCCAGACTACAGTGAACGACTCTGCCTCGTCAGTGAGATT
CCCCAAAAGGAGGGGCCCTTGGGGAGGGGCCTGGGGCCTCCCCATGCAACC
AGCATAGCCCCTACTGGGCCCCCCCATGTTACACCCTAAAGCCTGAAACCTG
A

Figura 14

CTCTGCCTCGTCAGTGAGATTCCCCAAAAGGAGGGGCCCTTGGGGAGGGGC
CTGGGGCCTCCCCATGCAACCAGCATAGCCCCTACTGGGCCCCCCCATGTTAC
ACCCTAAAGCCTGAAACCTGA

Figura 15

WAPPCYTLKPET

RECLUTAMIENTO DE IKK INDUCIDO POR CITOQUINA HACIA C_γC Y ACTIVACIÓN

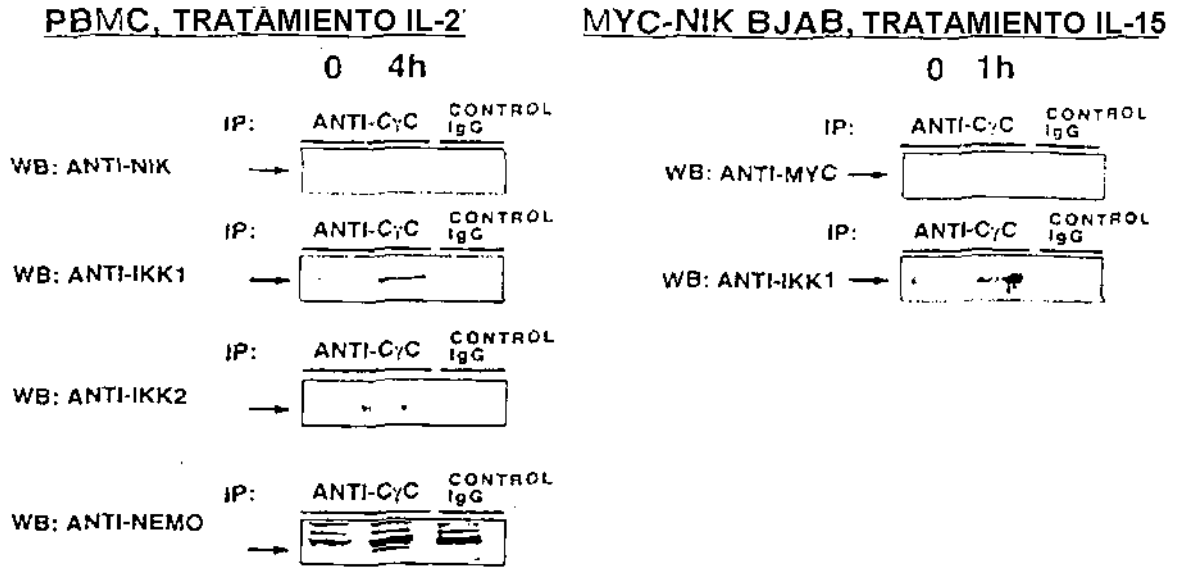


Fig. 16A

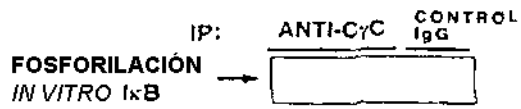


Fig. 16B