

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 415 331**

51 Int. Cl.:

C12N 15/12 (2006.01)

C12N 15/09 (2006.01)

C12N 15/63 (2006.01)

C07K 14/715 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

A61K 31/713 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.04.2003 E 03717504 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.05.2013 EP 1499724**

54 Título: **Derivados de la cadena gamma del receptor de IL-2, su preparación y su uso**

30 Prioridad:

18.04.2002 IL 14921702

08.10.2002 IL 15218302

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

25.07.2013

73 Titular/es:

**YEDA RESEARCH AND DEVELOPMENT CO.,
LTD. (100.0%)
THE WEIZMANN INSTITUTE OF SCIENCE P.O.
BOX 95
76100 REHOVOT, IL**

72 Inventor/es:

**WALLACH, DAVID;
RAMAKRISHNAN, PARAMESWARAN y
SHMUSHKOVICH, TAISIA**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 415 331 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 cadena gamma del receptor de IL-2, su preparación y su uso.

Campo de la invención

5 Esta invención se refiere al uso de la cadena gamma común (γ) de IL-2 y moléculas relacionadas para la modulación de actividades de señal controladas por NIK, 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 inmune, 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 citocinas, mitógenos y ciertos productos génicos víricos, 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 identificado una cinasa de I κ B de múltiples subunidades que media la fosforilación inducida por 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 citocinas inflamatorias, el factor de necrosis tumoral y la interleucina-1, el receptor de linfocitos T y la proteína coestimuladora de linfocitos T, CD28 [Karin et al. 2000].

20 La cinasa inductora de NF- κ B, NIK, (MAP3K14) es una proteína cinasa activada por mitógeno (MAP3K) que fue descubierta por los autores de la presente solicitud en 1996 (documento WO9737016) mientras escrutaban en busca de proteínas que se unían a la proteína adaptadora asociada al receptor de 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 cinasa, y la inhibición eficaz de la activación de NF- κ B en respuesta a una variedad de agentes inductores (LMP1, TNFR1, TNFR2, RANK, hTol1R, CD3/CD28, interleucina-1R, Tax del virus linfotrópico de linfocitos T humanos-1, LPS y otros [Malinin et al. 1997, Sylla et al. 1998, Damay et al. 1999, Lin et al. 1999, Geleziunas et al. 1998] tras la expresión de mutantes de NIK catalíticamente inactivos, sugirieron que NIK participa en la señalización para la activación de NF- κ B [Malinin 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, por ello la cepa mutante de ratones se ha denominado ratones "con alinfoplasia (aly)". Los ratones tanto *aly/aly* como con el gen NIK desactivado manifiestan una ausencia generalizada de ganglios linfáticos y de placas de Peyer, estructuras 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 de 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 a través de este receptor concreto. Se pudo demostrar que el deterioro de la capacidad proliferativa de los linfocitos B en los ratones *aly/aly* se corresponde con una respuesta deficiente de estas células frente a LPS y CD40L [Garceau et al. 2000] y la presencia de cantidades excesivas de linfocitos 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 del receptor de quimiocina 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 inmune, también parece que NIK está implicada en la regulación de diferentes funciones no inmunes. Los ratones *aly/aly* (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 mediadora de la activación de NF- κ B, los fibroblastos obtenidos a partir de ratones *aly/aly* y NIK $^{-/-}$ no lograban activar NF- κ B en respuesta a la activación de LT β R. Por otra parte, la regulación al alza con LT β R de VCAM-1, que se produce por medio de la activación de NF- κ B, es anómala en fibroblastos embrionarios murinos *aly/aly* [Matsumoto et al. 1999]. También se ha observado una fosforilación deficiente de I κ B en respuesta a linfocitos B *aly/aly* 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 *aly/aly* también son incapaces de responder a la quimiocina 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 *aly/aly* indicó que, aparte de su papel en la regulación de los complejos de NF- κ B compuesto por 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 *aly/aly* eran 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 de p100-p52 [Yamada et al. 2000]. En efecto, se ha demostrado que NIK participa en la fosforilación específica del sitio de p100. Ambos directamente y a través de la fosforilación de IKK α , que a su vez fosforila p100. Esta fosforilación sirve como desencadenante 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 MAP3Ks, se han realizado algunos intentos para explorar la implicación de NIK en las otras tres principales cascadas de proteína cinasa que se sabe que implican a las MAP3Ks (las cascadas de MAP cinasa: 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 demostrado 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 MAP3Ks, 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 cinasa para unirse entre sí. Se ha mostrado que la región C-terminal de NIK aguas abajo de su radical cinasa 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 interactúa con la región C-terminal de NIK en cis, inhibiendo de ese modo la unión de NIK a su sustrato (IKK α y p100). 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 TRAFs) 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 cinasa de I κ B (IKK). En efecto se ha mostrado 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, estudios de los mecanismos que explican la activación deficiente de NF- κ B por LT β R en fibroblastos embrionarios murinos de ratones *aly/aly* (MEFs), indicaron que la mutación de NIK anula la activación del señalosoma de IKK y la consiguiente fosforilación de I κ B [Matsushima et al. 2001]. Estos descubrimientos no fueron apoyados, no obstante, por el análisis de MEFs obtenidos a partir de ratones NIK *-/-*. Aunque los MEFs 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 a través de 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 en la fosforilación de p100 de un modo indirecto, a través de una 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 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 con NF- κ B de genes de citocina es una importante participante en la patogénesis del asma, que se caracteriza por la infiltración de las células inflamatorias y la desregulación de muchas citocinas y quimiocinas en el pulmón (Ling et al. 1998). Del mismo modo, la activación de la ruta de NF- κ B

también tiene probablemente un papel en la patogénesis de la artritis reumatoide. Las citocinas, tales como TNF- α , que activan NF- κ B son elevadas en el fluido sinovial de pacientes con artritis reumatoide y contribuyen a los cambios inflamatorios crónicos y a 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 truncado de TNF- α que se une a TNF- α , puede mejorar considerablemente los síntomas de pacientes con artritis reumatoide.

Los incrementos en la producción de citocinas proinflamatorias tanto con linfocitos como con 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 una 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 la respuesta inflamatoria asociada con estas enfermedades.

La aterosclerosis está desencadenada por numerosas agresiones al endotelio y a la musculatura lisa de la pared del vaso dañado (Matsushima et al. 2001). Un gran número de factores de crecimiento, citocinas y quimiocinas liberadas desde 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 con NF- κ B de los genes implicados en la respuesta inflamatoria y en el control de la proliferación celular tiene probablemente un importante papel en el inicio y el progreso de la aterosclerosis.

Finalmente, 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 frente a NF- κ B se encuentra predominantemente en y cerca de tipos de placas neuríticas tempranas en la enfermedad de Alzheimer, mientras que 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 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 tener un papel en numerosas enfermedades que tienen un componente inflamatorio implicado en su patogénesis.

Además de un papel en la patogénesis de enfermedades caracterizadas por incrementos en la respuesta inmune 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 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 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 linfocitos T de las especies homólogas con una elevada eficacia. La IL2 humana también estimula la proliferación de linfocitos T de ratón a concentraciones similares, mientras que la IL2 de ratón estimula los linfocitos T humanos con una eficacia menor (de seis veces a 170 veces). La implicación de IL-2 en la autoinmunidad es controvertida (revisado por O'Shea et al. 2002). Se ha reconocido que la administración de IL-2 está asociada con una variedad de trastornos autoinmunes tales como la tiroiditis inmune, la artritis reumatoide y otras artropatías. Sin embargo, ratones carentes de IL-2 producen múltiples autoanticuerpos, incluyendo anticuerpos anti-ADN. Aproximadamente la mitad muere de anemia hemolítica autoinmune y los supervivientes desarrollan enfermedad inflamatoria intestinal. Mayormente, 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 linfocitos T adultos (LTA). Puesto que las células leucémicas recién aisladas también secretan IL2 y responden a ella, IL2 puede funcionar como un modulador autocrino del crecimiento para estas células capaces de empeorar la LTA.

La IL2 también promueve la proliferación de linfocitos B activados. 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 los linfocitos T y los linfocitos B, IL-2 es un regulador central de las respuestas inmunes. Asimismo tiene un papel en las reacciones antiinflamatorias en la hematopoyesis y en la

vigilancia de tumores. IL2 estimula la síntesis de IFN-gamma en leucocitos periféricos y también induce la secreción de IL-1, TNF-alfa y TNF-beta.

5 Las actividades biológicas de IL2 están mediadas por un receptor de membrana. Se distinguen tres tipos diferentes de receptores de IL2 que se expresan diferencial 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 de 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
10 constitutivamente en linfocitos T en reposo, células NK y otros numerosos tipos de células, si bien la expresión de
IL2R-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 con HTLV-1.

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

15 Las subunidades gamma murinas y humanas del receptor tienen aproximadamente una identidad de secuencia del
70 por ciento a 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
20 kb y contiene ocho exones. Las relaciones con marcadores en estudios de ligación sugieren que este gen y SCIDX1,
el gen para la inmunodeficiencia combinada grave ligada a X, tienen la misma posición. 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 grave 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
citocinas que son esenciales para el desarrollo y la función de los linfocitos (Noguchi et al. 1993). Hasta la fecha, se
25 han publicado más de 100 mutaciones diferentes de IL2R γ 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 de receptores de IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-13, IL-15 e IL21 por lo
que es apodada ahora como "cadena γ común" (*cyc*).

El documento EP0578932 hace referencia a la cadena gamma común de longitud completa y especialmente al
dominio N-terminal extracelular.

30 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 un fragmento de polipéptido que se une a cinasa que induce NF- κ B de la
35 cadena gamma común (*cyc*) de IL-2 o una muteína, preferentemente 41MDD (SEQ ID NO: 2), 44MPD (SEQ ID NO:
17), el dominio intracelular de *cyc* (ICD*cyc*) (SEQ ID NO: 1), un derivado permutado circularmente o un fragmento
del mismo para modular la interacción entre *cyc* y NIK.

Además, la invención se refiere al uso de un ADN que codifica un fragmento polipeptídico de la *cyc* que se une a
40 cinasa que induce NF- κ B o una muteína, un derivado permutado circularmente o un fragmento del mismo, un ADN
que codifica la hebra no codificadora de un fragmento polipeptídico de la *cyc* que se une a cinasa que induce NF- κ B,
un anticuerpo específico de un polipéptido de SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 17, e inhibe las interacciones entre NIK-
cyc.

En otro aspecto, la invención proporciona el uso de un fragmento polipeptídico de la *cyc* que se une a cinasa que
induce NF- κ B o una muteína, un derivado permutado circularmente o un fragmento del mismo en la preparación de
45 un medicamento para el tratamiento de una enfermedad tal y como se reivindica, en donde la actividad de NIK está
implicada en la patogénesis de la enfermedad.

En un aspecto adicional, la invención se refiere al uso de un fragmento polipeptídico de la *cyc* que se une a cinasa
que induce NF- κ B o una muteína, un derivado permutado circularmente o un fragmento del mismo, un ADN
específico, un ADN de cadena no codificadora o anticuerpos específicos tal y como se reivindican, en la preparación
de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad tal y como se reivindica, en donde NF- κ B está implicado
50 en la patogénesis de la enfermedad.

La invención también proporciona un método para el tratamiento de una enfermedad tal y como se reivindica, que
implica la actividad de NIK en la patogénesis de dicha enfermedad, que comprende la administración de una
cantidad terapéuticamente eficaz de un fragmento polipeptídico de la *cyc* que se une a cinasa que induce NF- κ B o
una muteína, un derivado permutado circularmente o un fragmento del mismo, en un sujeto que lo necesite.

- 5 Por añadidura, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende un fragmento polipeptídico de la *cyc* que se une a cinasa que induce NF- κ B o una muteína, un derivado permutado circularmente o un fragmento del mismo, el ADN específico, el ADN de cadena no codificadora o el anticuerpo específico tal y como se reivindica, para modular la interacción entre la cadena gamma común (*cyc*) de IL-2 y NIK o en las enfermedades reivindicadas en donde la actividad de NIK o NF- κ B está implicada en la patogénesis de la enfermedad.
- 10 En otro aspecto, la presente invención se refiere a un método para el tratamiento de las enfermedades reivindicadas que implican la interacción entre NIK y *cyc* en la patogénesis de dicha enfermedad que comprende la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un fragmento polipeptídico de la *cyc* que se une a cinasa que induce NF- κ B o una muteína, un derivado permutado circularmente o un fragmento del mismo, en un sujeto que lo necesite.
- La invención proporciona un ADN que codifica un fragmento polipeptídico de la *cyc* que se une a cinasa que induce NF- κ B de la invención, un vector que alberga el ADN, la célula anfitriona que comprende el vector.
- 15 En una realización, se proporciona un método para producir un polipéptido de acuerdo con la invención, que comprende introducir dicho vector en una célula anfitriona procariótica o eucariótica, preferentemente CHO, cultivar la célula e aislar el polipéptido producido.
- La invención también proporciona un fragmento polipeptídico de la *cyc* que se une a cinasa que induce NF- κ B o una muteína, un derivado permutado circularmente o un fragmento del mismo, preferentemente 41MDD (SEQ ID NO: 2), 44MPD (SEQ ID NO: 17), el dominio intracelular de *cyc* (ICD*cyc*) (SEQ ID NO: 1), 1-357 (SEQ ID NO: 20), 1-341 (SEQ ID NO: 21).
- 20 En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo, un anticuerpo policlonal o monoclonal, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo totalmente humanizado, un anticuerpo anti-anti-Id, un anticuerpo intracelular o un fragmento del mismo que reconoce específicamente y se une a un fragmento polipeptídico de *cyc* de acuerdo con la invención.
- 25 Por añadidura, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un fragmento polipeptídico de *cyc* de acuerdo con la invención, un ADN específico, el ADN de la hebra no codificadora o un anticuerpo específico tal y como se reivindica, preferentemente para la modulación de la actividad de NIK o para el tratamiento de las enfermedades reivindicadas, en donde la interacción entre NIK y *cyc* está implicada en la patogénesis. También se describe en esta memoria una molécula pequeña capaz de inhibir la interacción entre NIK-*cyc* obtenible escrutando moléculas preparadas mediante química combinatoria en un sistema de luciferasa.
- 30 Además, la invención se refiere al uso de un fragmento de *cyc* tal y como se reivindica o una muteína, un derivado permutado circularmente o un fragmento del mismo, en la preparación de un medicamento para el tratamiento y/o la prevención de una enfermedad tal y como se reivindica, resultante de respuestas inmunes excesivas, tales como artritis reumatoide, osteoartritis, enfermedad inflamatoria intestinal, asma, infarto cardíaco, enfermedad de Alzheimer o aterosclerosis.
- 35 Además, la invención se refiere al uso de un fragmento de *cyc* tal y como se reivindica o una muteína, un derivado permutado circularmente o un fragmento del mismo, en la preparación de un medicamento para el tratamiento y/o la prevención de una enfermedad autoinmune tal y como se reivindica, tal como tiroiditis inmune, artritis reumatoide y otras artropatías, anemia hemolítica autoinmune y enfermedad inflamatoria intestinal.
- 40 En otra realización, la invención se refiere a un método para el tratamiento y/o la prevención de una enfermedad tal y como se reivindica en la que la activación de NF- κ B está implicada en la patogénesis de la enfermedad, o en una enfermedad en la que la interacción entre NIK y *cyc* está implicada en la patogénesis de dicha enfermedad, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un fragmento polipeptídico de la *cyc* que se une a cinasa que induce NF- κ B o una muteína, un derivado permutado circularmente o un fragmento del mismo, a un sujeto que lo necesite.
- 45 En una realización adicional, la invención proporciona un método de tratamiento y/o de prevención de una enfermedad en la que la activación de NF- κ B está implicada en la patología de la enfermedad, tal como cáncer, 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 fragmento polipeptídico de la *cyc* que se une a cinasa que induce NF- κ B o una muteína, un derivado permutado circularmente o un fragmento del mismo, a un sujeto que lo necesite.
- 50 En otro aspecto, la invención se refiere un método de tratamiento y/o de prevención de una enfermedad tal y como se reivindica, en donde la enfermedad es el resultado de respuestas inmunes excesivas, tal 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 fragmento polipeptídico de la *cyc* que se une a cinasa que induce NF- κ B o una muteína, un derivado permutado circularmente o un fragmento del mismo.
- 55

Además, esta memoria descriptiva describe el uso de *cyc* o una mutéina, una variante, una proteína de fusión, un derivado funcional, un derivado permutado circularmente o un fragmento del mismo para la modulación de la actividad de NF- κ B.

La invención también se describe en las reivindicaciones.

5 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.

10 La Figura 2 muestra los resultados sobre la interacción entre NIK-*cyc* en células de mamífero controlada mediante análisis por inmunoprecipitación. Se detectaron análisis de transferencia Western con anticuerpo anti-*cyc* de las siguientes muestras: 1- productos lisados de células 293-T transfectadas con pcDNA3*cyc* e inmunoprecipitadas con anti-*cyc*, 2- productos lisados de células 293-T transfectadas con pcDNA3*cyc* e inmunoprecipitadas con anticuerpo anti-NIK. 6 -productos lisados de células 293-T transfectadas con pcS3MTNIK (que expresa NIK etiquetado con *myc*) y pcDNA3*cyc* y NIK inmunoprecipitados con anticuerpo anti-*myc*, 3- lo mismo que en 6 cambiando solamente pcS3MTNIK por pcS3MTNIK_{aly}. 4- productos lisados de células 293-T transfectadas con pc_{dn}NIK (dominio C-terminal de los residuos 624-947 de NIK) e inmunoprecipitadas con anticuerpo anti-*cyc* y 5- productos lisados de células 293-T transfectadas con pc_{dn}NIK y pcDNA3*cyc* inmunoprecipitadas con anticuerpos anti-NIK (no anticuerpo anti *myc* como en 3 y 6).

20 La Figura 3 muestra los resultados sobre la interacción entre NIK-*cyc* en células de mamífero, controlada mediante análisis por inmunoprecipitación. Análisis de transferencia Western de productos inmunoprecipitados y productos lisados de células 293-T 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 pcDNA3*cyc* 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 pcDNA3*cyc* o células transfectadas con pcS3MTNIK solo, respectivamente, antes de la inmunoprecipitación.

30 La Figura 4 muestra el efecto dependiente de la concentración de *cyc* sobre la activación de NF- κ B inducida con NIK. La activación de NF- κ B es controlada por medio del análisis informador con luciferasa (para más detalles, véase el Ejemplo 10). La activación de NF- κ B en células 293-T 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, 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 pcDNA3*cyc* y pcDNA3luciferasa (muestra NIK+cgc 0,1 mcg), 1 μ g de pcS3MTNIK, 0,5 μ g/pocillo de pcDNA3*cyc* y pcDNA3luciferasa (muestra NIK+cgc 0,5 mcg) y 1 μ g de pcS3MTNIK con 1 μ g/pocillo de pcDNA3*cyc* y pcDNA3luciferasa (muestra NIK+cgc 1 mcg).

40 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 más detalles, véase el Ejemplo 10). La activación de NF- κ B en células 293-T 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 con NF- κ B (pcDNA3luciferasa) (muestra pc+luc), pcS3MTNIK y pcDNA3luciferasa (muestra NIK), pcS3MTNIK, pcS3MTdnNIK y pcDNA3luciferasa (muestra NIK+dnNIK) pcDNA3*cyc* y pcDNA3luciferasa (muestra cgc), pcS3MTNIK, pcDNA3*cyc* y pcDNA3luciferasa (muestra NIK+cgc), pcS3MTdnNIK, pcDNA3*cyc* y pcDNA3luciferasa (muestra cgc+dnNIK), pcS3MTNIK, pcDNA3*cyc*, pcS3MTdnNIK y pcDNA3luciferasa (muestra NIK+cgc+dnNIK). Se utilizaron pcS3MTdnNIK, pcS3MTNIK y pcDNA3*cyc* a una concentración de 1, 1 y 0,1 μ g/pocillo respectivamente.

50 La Figura 6 muestra el efecto de *cyc* sobre la activación de NF- κ B inducida por el mutante NIK_{aly}. La activación de NF- κ B es controlada por medio del análisis informador con luciferasa (para más detalles, véase el Ejemplo 10). La activación de NF- κ B en las células es inducida expresando en exceso NIK. La expresión de la luciferasa fue controlada en células 293-T transfectadas con los siguientes plásmidos: plásmido vacío (muestra pc), plásmido vacío y un plásmido que codifica luciferasa bajo el control de un promotor inducible con NF- κ B (pcDNA3luciferasa) (muestra pc+luc), pcS3MTNIK y pcDNA3luciferasa (muestra NIK), pcDNA3luciferasa y pcDNA3*cyc* (muestra cgc), pcS3MTNIK, pcDNA3*cyc* y pcDNA3luciferasa (muestra NIK+cgc), 1 μ g de pcS3MT_{aly}NIK y pcDNA3luciferasa (muestra alyNIK) y pcS3MT_{aly}NIK, pcDNA3*cyc* y pcDNA3luciferasa (muestra alyNIK+cgc). Se utilizaron pcS3MT_{aly}NIK, pcS3MTNIK y pcDNA3*cyc* a una concentración de 1,1 y 0,1 μ g/pocillo respectivamente.

55 La Figura 7 muestra el efecto de un polipéptido de 41 aminoácidos obtenido a partir del extremo distal de la membrana de *cyc* (41MDD) sobre la activación de NF- κ B inducida con NIK y la intensificación por *cyc* de longitud completa. La activación de NF- κ B es controlada por medio del análisis informador con luciferasa (para más detalles,

véase el Ejemplo 10). La activación de NF- κ B en células 293-T fue inducida expresando en exceso NIK. La intensificación de la inducción de NF- κ B se obtiene expresando en exceso NIK y expresando la *cyc* de longitud completa a 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- κ B (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 μ g/ml respectivamente.

La Figura 8 muestra el efecto de los mutantes por delección de *cyc*, delecionados en el extremo C-terminal de la proteína y 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 más detalles, véase el Ejemplo 10). La activación de NF- κ B 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- κ B (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/delecionado, pcDNA3luciferasa, fueron utilizados todos a la misma concentración de 0,5 μ g/ml. La cantidad total de ADN utilizada fue normalizada con plásmido vacío pcDNA3.

La Figura 9 muestra el efecto de *cyc* sobre la actividad cinasa *in vitro* de NIK. Las células 293-T fueron transfectadas con 10 μ g de pcDNA3cyc (Línea 1), 10 μ g de pcDNA3cyc y 10 μ g de pcS3MTNIK (Línea 2), 10 μ g de pcS3MTNIK (Línea 3) o 10 μ g de pcS3MTNIK y 10 μ g de un plásmido que codifica la cinasa 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 preadsorbido en perlas de proteína A-sefarosa. La reacción con cinasa se realizó con 5 μ ci de ATPy como se ha descrito previamente (Uhlík et al. 1998).

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- κ B inducida por medio del receptor de LT β . La activación de NF- κ B es controlada por medio del análisis informador con luciferasa (para más detalles, véase el Ejemplo 10). La activación de NF- κ B en fibroblastos embrionarios de ratón fue inducida con LT β . La expresión de la luciferasa fue controlada en células transfectadas con los siguientes plásmidos: plásmido vacío (muestra pc), un plásmido que expresa GST (pGST) y pcDNA3luciferasa (muestra pGST+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 procedente del dominio distal de la membrana de *cyc* (pGST41MDD) y pcDNA3luciferasa (muestra GST-41MDD+luc). Los plásmidos pGSTICcyc, pGST41MDD, se utilizaron a 1 μ g/pocillo y pcDNA3luciferasa se utilizó a una concentración de 0,5 μ g/pocillo. El plásmido vacío, pcDNA3 se utilizó como portador para normalizar la concentración total de ADN a 2 μ g/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 procedente del dominio distal de la membrana de *cyc* (41MDD).

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

La Figura 14 muestra la secuencia de nucleótidos del polipéptido 41 procedente del 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.

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 testigo.

La Figura 16B muestra que el señalosoma inmunoprecipitado simultáneamente con *cyc* es activo. Los productos inmunoprecipitados preparados como en la Figura 16A, fueron sometidos a ensayo en un análisis de cinasa (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 entre la cadena gamma común de IL-2R (cyc) y NIK en patologías que implican dicha interacción.

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

10 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 terminal de NIK (624-947) o con la totalidad de NIK.

Se mostró 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.

15 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 aminoácidos (desde el residuo 282 al 325), denominado 44MPD (véase 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 SEQ ID NO: 2 y la Figura 12). Cuando se deleccionaron 12 aminoácidos en el extremo de cyc (residuos 358-369 de cyc, Fig. 15, SEQ ID NO: 3 secuencia de nucleótidos en SEQ ID NO: 4) del dominio intracelular de cyc (cycICD), la unión a NIK disminuye en 50% indicando que estos residuos tienen un papel principal en la unión.

25 Además, se llevó a cabo la mutagénesis en residuos localizados dentro del 41MDD, para 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). 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 se 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 muestran 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.

30 Se mostró que un dominio de NIK, responsable de la unión a cyc, comprende 81 residuos de aminoácido procedentes del extremo C terminal de NIK (desde el residuo 624 al 947), denominado NIK640-720 (véase el SEQ ID NO: 18).

35 Se mostró que la interacción de cyc y NIK era funcionalmente significativa. Los análisis con genes informadores mostraron 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 una estructura artificial 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.

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

40 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.

55 Alternativamente, la expresión en exceso del extremo C terminal 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.

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 ser 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 Aly-NIK y NIK de tipo silvestre 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 mediante Aly-NIK.

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

Fragmentos de *cyc* sometida a delección progresiva en el extremo C terminal, 1-357, 1-341, 1-325, 1-303, fueron sometidos 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 en mutantes por delección de *cyc* a una razón de aproximadamente 1. En estas condiciones *cyc* inhibe la activación de NF- κ B inducida por NIK. Se encontró que la *cyc* de longitud completa y los fragmentos 1-357 (SEQ ID NO: 20), 1-341 (SEQ ID NO: 21) eran capaces de inhibir la activación de NF- κ B mediada por NIK, mientras que 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 los fragmentos 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.

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 mediante *cyc*, puede ser el aumento de la fosforilación de NIK tras la interacción *cyc*/NIK. El análisis de cinasa *in vitro* mostró un aumento de tres veces mediante *cyc* de la autofosforilación y de la fosforilación por IKK1 de NIK. De este modo, el resultado obtenido en el análisis de cinasa *in vitro* apoya la hipótesis de que la modulación de la actividad de NIK mediante *cyc* puede ser intensificada por la fosforilación de NIK tras la interacción *cyc*/NIK.

La inducción del receptor de linfotoxina beta (LT β) por medio de este ligando da como resultado la activación de NF- κ B. Se ha sugerido en la bibliografía 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* (*cyc*ICD) o su dominio distal de la membrana 41 (41MDD SEQ ID NO: 2) se sometió a ensayo cuando se activó NF- κ B estimulando el receptor de LT β y se cree que esta activación está mediada por la NIK endógena. La expresión de ICD*cyc* aumentó la activación de NF- κ B mediante LT β 2,5 veces, mientras que la expresión de 41MDD inhibía un 50% la activación de NF- κ B mediante LT β . Estos resultados sugieren que la estimulación con linfotoxina y la modulación de NF- κ B implican la interacción *cyc*-NIK. Estos resultados sugieren que la estimulación con linfotoxina y la modulación de NF- κ B implican la interacción *cyc*-NIK. Estos resultados muestran que el polipéptido *cyc*ICD o el 41MDD pueden modular la señalización desencadenada por medio del receptor de LT β y muestran, 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 mostrado que NIK induce la activación de NF- κ B, de este modo se pueden utilizar fragmentos de *cyc* de la invención para tratar y/o prevenir enfermedades en cuya patogénesis está implicado NF- κ B.

Los resultados obtenidos revelaron que la señalización por medio de *cyc* implica a NIK y el reclutamiento de proteínas del señalosoma y por consiguiente, la modulación de NF- κ B. Por lo tanto, *cyc* o sus fragmentos, por ejemplo, los que comprenden el dominio de unión a NIK, tales como MDD41 o MPD44 (SEQ ID NO: 17), se podrían utilizar para modular la señalización a través de *cyc*.

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 con IL-2, los componentes del señalosoma IKK-1, IKK-2 y IKK-3 son reclutados hacia el receptor de IL-2 a través de *cyc*. Se encontró que la cadena y común del receptor de IL-2 se unía a NIK en una posición diferente, distinta de la región de unión a IKK-1. Se obtuvieron resultados similares tras la estimulación de las células con IL-15.

Se mostró que los componentes del señalosoma inmunoprecipitados simultáneamente con *cyc* tras la estimulación con IL-2, eran activos en un análisis de cinasa. 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.

Los resultados obtenidos muestran que se requiere la interacción de NIK y los componentes del señalosoma 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. Se obtuvieron resultados similares estimulando células mononucleares de sangre periférica con IL-15.

La invención se refiere al uso de un fragmento polipeptídico de la *cyc* que se une a cinasa que induce NF- κ B y sus fragmentos, así como a sus mutantes activos, es decir, otras proteínas o polipéptidos, en donde uno o varios aminoácidos de la estructura se eliminan o sustituyen por otros aminoácidos o uno o varios aminoácidos se añaden a esa secuencia para obtener polipéptidos o proteínas que tienen la misma actividad tal como la modulación de la interacción de *cyc*-NIK y/o la activación de NF- κ B y/o la señalización de *cyc*.

Dichos polipéptidos también se pueden fusionar con otra proteína tal como, por ejemplo, una inmunoglobulina.

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-κB y/o la señalización de cyc.

La definición “derivados funcionales” según se utiliza en la presente memoria, hace referencia a derivados que pueden ser preparados a partir de grupos funcionales presentes en las cadenas laterales de los radicales de aminoácido o en los grupos N o C terminales de acuerdo con 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.

“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-κB y/o la señalización de cyc.

La expresión “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 posición 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 nuevo 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 los 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), ambos incorporados como referencia en esta memoria. 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 posición 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 posiciones diferentes.

Los términos denominados “polipéptido y/o proteína” de la invención son intercambiables y hacen referencia a fragmentos de cyc que comprenden regiones responsables de la unión a NIK, tales como 41MDD y 44MPD, 1-357 y 1-341.

La presente invención también se refiere a muteínas o a mutantes de la proteína de la 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-κB 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 deletados, añadidos o sustituidos por otros en el polipéptido, de manera que esas modificaciones de este tipo no cambian 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-κB y/o la señalización de cyc.

Estas muteínas se preparan mediante síntesis conocidas y/o por técnicas de mutagénesis dirigida al sitio, o cualquier otra técnica conocida adecuada de las mismas.

Cualquiera de tales muteínas tiene preferiblemente una secuencia de aminoácidos suficientemente duplicada con respecto a la de los fragmentos de cyc que comprenden regiones responsables de la unión a NIK, tales como ICDcyc, 41MDD y 44MPD, 1-357 y 1-341, 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 los 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 que las codifica, incluyen un grupo finito de fragmentos de c_{yc} que comprenden regiones responsables de la unión a NIK tales como 41MDD y 44MPD, 1-357 y 1-341 que se corresponden a secuencias tales 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 "conservadoras". Las sustituciones conservadoras de aminoácidos en la proteína son aquellas que tienen esencialmente las secuencias de dicha proteína de origen natural de la invención, pueden incluir aminoácidos sinónimos de un grupo, que tienen propiedades fisicoquímicas suficientemente similares que la sustitución entre los miembros del grupo conservarán 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 decisivos 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 mediante 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
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
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
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
Glu	Asp, Lys, Asn, Gln, His, Arg, Glu
Met	Phe, Ile, Val, Leu, Met
Trp	Trp

TABLA B Grupos Más Preferidos de Aminoácidos Sinónimos

Aminoácido	Grupo Sinónimo
Ser	Ser
Arg	His, Lys, Arg
Leu	Ile, Phe, Met, Leu
Pro	Ala, Pro
Thr	Thr
Ala	Pro, Ala
Val	Met, Ile, Val
Gly	Gly
Ile	Ile, Met, Phe, Val, Leu
Phe	Met, Tyr, Ile, Leu, Phe
Tyr	Phe, Tyr

Aminoácido	Grupo Sinónimo
Cys	Ser, Cys
His	Arg, Gln, His
Gln	Glu, His, Gln
Asn	Asp, Asn
Lys	Arg, Lys
Asp	Asn, Asp
Glu	Gln, Glu
Met	Phe, Ile, Val, Leu, Met
Trp	Trp

TABLA C Grupos Muy Preferidos de Aminoácidos Sinónimos

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

5 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 los documentos de 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 el documento de patente de los Estados Unidos nº 4.904.584 (Straw et al).

10 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: c_{yc} y fragmentos de c_{yc} que comprenden regiones responsables de la unión a NIK, tales como la proteína 41MDD y 44MPD, 1-357 y 1-341 o sus fragmentos. Se pretende que la expresión "esencialmente correspondiente a" abarque las muteínas con cambios mínimos en la secuencia de la proteína

15 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 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

20 interacción de c_{yc}-NIK y/o la activación de NF- κ B y/o la señalización de c_{yc}.

La presente invención también incluye variantes de dichas proteínas de la invención. Las variantes preferidas son las que tienen una identidad de aminoácidos de al menos 80%, una variante más preferida es la que tiene al menos 90% de identidad y una variante la más preferida es la que tiene una identidad de al menos 95% con dichas proteínas de la invención.

25 La expresión "identidad de secuencia" según se utiliza en la presente memoria significa que las secuencias de aminoácidos se comparan por medio de alineación de acuerdo con Hanks y Quinn (1991) con un refinamiento de las regiones de baja homología utilizando el programa Clustal-X, que es la interfaz de Windows para el programa de alineación 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 una 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.

- 5 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 alineación global).

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: fragmentos de *cyc* que comprenden regiones responsables de la unión a NIK, tales como la proteína 41MDD y 44MPD, 1-357 y 1-341 o sus fragmentos. Se pretende que la expresión "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 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- κ B y/o la señalización de *cyc*.

La presente invención también incluye variantes de dichas proteínas de la invención. Las variantes tienen una identidad de aminoácidos de al menos 80%, o al menos 90% de identidad o al menos 95% con dichas proteínas de la invención.

La expresión "identidad de secuencia" según se utiliza en la presente memoria, significa que las secuencias de aminoácidos se comparan por medio de alineación de acuerdo con Hanks y Quinn (1991) con un refinamiento de las regiones de baja homología utilizando el programa Clustal-X, que es la interfaz de Windows para el programa de alineación 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 una 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.

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 alineación global), utilizando la matriz por defecto (BLOSUM62) (valores -4 a +11) con una penalización por apertura de hueco de -12 (para el primer nulo de un hueco) y una penalización por extensión del hueco de -4 (por cada nulo consecutivo adicional en el hueco). Después de la alineación, se calcula el porcentaje de identidad expresando el número de emparejamientos como el porcentaje del número de aminoácidos en la secuencia reivindicada.

Las muteínas de acuerdo con la presente invención incluyen aquellas codificadas por un ácido nucleico, tal como ADN o ARN, que se hibridan con ADN o ARN en condiciones restrictivas y que codifican dicha proteína de acuerdo con la presente invención, que comprenden esencialmente todas las secuencias de origen natural que codifican, por ejemplo, fragmentos de *cyc* que comprenden las regiones responsables de la unión a NIK tales como 41MDD y 44MPD, 1-357 y 1-341. Por ejemplo, tales como un ADN o un ARN que se hibrida pueden ser una que codifica la misma proteína de la invención que tiene, por ejemplo, las secuencias descritas en las Figs. 13 y 14 (SEQ ID NO: 5 y 6 que codifican ICDC-*cyc* y 41MDD, respectivamente) y secuencias que pueden diferir en su secuencia de nucleótidos de la secuencia de nucleótidos obtenida de forma natural, en virtud de la degeneración del código genético, es decir, una secuencia de ácido nucleico algo diferente puede codificar todavía la misma secuencia de aminoácidos, debido a esta degeneración.

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). "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).

La "restricción" se produce típicamente en un intervalo de T_m 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 T_m .

55 La expresión "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.

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 solución 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 T_m del híbrido de ADN-ADN:

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

en donde M es la molaridad de los cationes monovalentes, % de GC es el porcentaje de los nucleótidos G y C en el ADN, % de 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 T_m 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 T_m utilizada para cualquier experimento de hibridación dado a las concentraciones de sal y formamida especificadas, es 10°C inferior a la T_m 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.

Según se utiliza en la presente memoria, "condiciones altamente restrictivas" son aquellas que proporcionan una T_m que no es más de 10°C menor que la T_m 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 T_m , que no es más de 20°C menor que la T_m 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 condiciones altamente restrictivas (5-10°C por debajo de la T_m calculada o medida del híbrido) y moderadamente restrictivas (15-20°C por debajo de la T_m 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 T_m 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 anteriormente, 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).

Un fragmento de *cyc*, 41MDD y/o 44MPD, 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*.

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 entre NIK y *cyc*, donde dicho anticuerpo, cuando se expresa, se unirá a 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 WO9914353.

Se pueden preparar anticuerpos contra 41MDD y 44MPD 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.

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.

Los polipéptidos de la invención pueden ser producidos en sistemas de expresión eucarióticos, intracelularmente, periplásmicamente o pueden ser secretados al medio. Los fragmentos de *cyc* producidos que comprenden regiones responsables de la unión a NIK, tales como 41MDD y 44MPD, 1-357 y 1-341 pueden ser recuperados en forma soluble o insoluble (cuerpos de inclusión).

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

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., *cyc* y fragmentos de *cyc* que comprenden regiones responsables de la

unión a NIK, tales como 41MDD y 44MPD, 1-357 y 1-341, se puede utilizar para la expresión y la secreción eucarióticas.

La presente invención proporciona fragmentos de *cyc* que comprenden regiones responsables de la unión a NIK tales como 41MDD y 44MPD, 1-357 y 1-341, péptidos derivados de los mismos, o una muteína, un derivado permutado circularmente o un fragmento del mismo, o una de sus sales, para la preparación de un medicamento para el tratamiento de enfermedades inflamatorias tal y como se reivindica en esta memoria.

Un 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, tal y como se ha indicado más arriba, puede ser añadida a la secuencia del péptido o de la proteína. Adicionalmente, el péptido o la 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.

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/correceptores 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. Ejemplos de los grupos adecuados para formar productos conjugados son los azúcares, las vitaminas, las hormonas, las citocinas, 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. 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 fragmentos de *cyc* que comprenden regiones responsables de la unión a NIK tales como 41MDD y 44MPD, 1-357 y 1-341, sus fragmentos, mutantes y derivados de la invención a tales células, por ejemplo, utilizando las moléculas de clase II del CMH que son expresadas en estas células. Esto se puede lograr acoplado un anticuerpo, o el sitio de unión al antígeno del mismo, dirigido contra la región constante de dicha molécula de clase II del CMH, a la proteína o el péptido de la invención. Adicionalmente, se han descrito numerosos receptores de la superficie celular para diferentes citocinas 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 a una diana un subgrupo de linfocitos T, se puede utilizar la molécula de la superficie de los linfocitos 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 no codificantes de la invención pueden ser introducidos en las células mediante el uso de un vector vírico. 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 retrovímica de secuencias no codificantes ha sido descrita por Daniel et al. 1998.

Cuando se utilizan virus como vectores, se utilizan generalmente las proteínas de la superficie vírica 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 vírico puede ser diseñado para expresar una proteína adicional sobre su superficie, o se puede cambiar la proteína de superficie del vector vírico para incorporar una secuencia peptídica deseada. De este modo se puede diseñar el vector vírico para expresar uno o más epítomos adicionales, que se pueden utilizar para dirigir dicho vector vírico. Por ejemplo, se pueden utilizar epítomos de citocinas, péptidos que se unen a la clase II del CMH o epítomos obtenidos a partir de moléculas de alojamiento para dirigir el vector vírico 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 fragmentos de *cyc* que comprenden las regiones responsables de la unión a NIK tales como 41MDD y 44MPD, 1-357 y 1-341y/o ADN o vectores que albergan sus secuencias o secuencias no codificantes.

La presente invención abarca composiciones farmacéuticas que comprenden anticuerpos específicos capaces de reconocer y unirse a la proteína *cyc* y a fragmentos de *cyc* que comprenden las regiones responsables de la unión a NIK tales como 41MDD y 44MPD, 1-357 y 1-341.

Se pretende que el término „anticuerpo“ incluya anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales (AcMos), 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 antígenos, cuyas poblaciones contienen sitios de unión a epítomos esencialmente similares. Los AcMos se pueden obtener mediante métodos conocidos por los expertos en la técnica. Véanse, por ejemplo, Kohler y Milstein, *Nature*, 256: 495-497 (1975); el documento de Patente de los Estados Unidos nº 4.376.110; Ausubel et al., compiladores, Harlow y Lane *ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL*, Cold Spring Harbor Laboratory (1988); y Colligan et al., compiladores, *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. Un hibridoma que produce un AcMo de la presente invención se puede cultivar *in vitro*, *in situ* o *in vivo*. La producción de elevados títulos de AcMos *in vivo* o *in situ* hacen de este el método de producción preferido en la actualidad.

Los anticuerpos quiméricos son moléculas cuyas diferentes porciones se obtienen a partir de diferentes especies animales, tales como aquellas que tienen la región variable obtenida de un AcMo 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 AcMos murinos tienen rendimientos superiores a partir de hibridomas, pero una inmunogenicidad mayor en seres humanos, de manera que se utilizan AcMos 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. documento de Solicitud de Patente Europea 125023 (publicada el 14 de Noviembre de 1984); Neuberger et al. *Nature* 314: 268-270 (1985); Taniguchi et al. documento de Solicitud de Patente Europea 171496 (publicada el 19 de Febrero de 1985); Morrison et al. documento de Solicitud de Patente Europea 173494 (publicada el 5 de Marzo de 1986); Neuberger et al. documento de Solicitud PCT WO 8601533, (publicada el 13 de Marzo de 1986); Kudo et al. documento de Solicitud de Patente Europea 184187 (publicada el 11 de Junio de 1986); Sahagan et al. *J. Immunol.* 137: 1066-1074 (1986); Robinson et al. documento de Solicitud de Patente Internacional nº WO 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, en donde se requieren tratamientos repetidos para enfermedades crónicas y con recaída tales como

5 las enfermedades autoinmunes. Un método para la preparación de anticuerpos totalmente humanos consiste en la "humanización" del sistema inmune 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 génica y los procedimientos de expresión de los genes requeridos para producir finalmente una amplia respuesta inmune. 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 mostrado que la maquinaria de recombinación de ratón es compatible con los genes humanos. Además, los hibridomas que secretan hu-AcMos específicos de antígenos de diferentes isotipos pueden ser obtenidos mediante inmunización de Xenomice con antígeno.

10 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) documento de Patente WO 98/24893.

15 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 AcMo 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, documento de Patente de los Estados Unidos nº 4.699.880.

20 El anticuerpo anti-Id también se puede utilizar como "inmunógeno" para inducir una respuesta inmune en otro animal más, produciendo lo que se denomina un anticuerpo anti-anti-Id. El anti-anti-Id puede ser epítópicamente idéntico al AcMo original, que indujo el anti-Id. De este modo, utilizando

25 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, la(s) proteína(s) activa(s) se puede(n) 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.

30 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, en 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, la(s) proteína(s) de acuerdo con la invención puede(n) ser administrada(s) junto con otros componentes de agentes biológicamente activos, tales como tensioactivos, excipientes, portadores, diluyentes y vehículos farmacéuticamente aceptables.

35 La invención se refiere al uso de anticuerpos específicos capaces de reconocer y unirse a la proteína cyc y a fragmentos de cyc que comprenden las regiones responsables de la unión a NIK, tales como 41MDD y 44MPD, 1-357 y 1-341, en la preparación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad, en donde una citocina estimuladora de la señalización a través de cyc de IL-2 está implicada en la patogénesis de la enfermedad.

40 La invención se refiere a un método para el tratamiento de una enfermedad que implica la señalización de una citocina a través de cyc de IL-2 en la patogénesis de dicha enfermedad, que comprende la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de anticuerpos específicos, capaces de reconocer y unirse a la proteína cyc y/o fragmentos de cyc que comprenden las regiones responsables de la unión a NIK, tales como 41MDD y 44MPD, 1-357 y 1-341, a un sujeto que lo necesite.

45 Para la administración parenteral (p. ej., intravenosa, subcutánea, intramuscular), la(s) proteína(s) activa(s) se puede(n) formular 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.

50 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, la(s) proteína(s) activa(s) se puede(n) 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, en 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, la(s) proteína(s) de acuerdo con la invención puede(n) ser administrada(s) junto con otros componentes de agentes biológicamente activos, tales como tensioactivos, excipientes, portadores, diluyentes y vehículos farmacéuticamente aceptables.
- 5 La invención se refiere al uso de anticuerpos específicos capaces de reconocer y unirse a fragmentos de *cyc* que comprenden las regiones responsables de la unión a NIK, tales como 41MDD y 44MPD, 1-357 y 1-341, en la preparación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad según se reivindica, en donde una citocina estimuladora de la señalización a través de *cyc* de IL-2 está implicada en la patogénesis de la enfermedad.
- 10 La invención se refiere al uso de los compuestos reivindicados en esta memoria, para el tratamiento de las enfermedades reivindicadas que implica la señalización de una citocina a través de *cyc* de IL-2 en la patogénesis de dicha enfermedad, que comprende la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de anticuerpos específicos capaces de reconocer y unirse a fragmentos de *cyc* que comprenden las regiones responsables de la unión a NIK, tales como 41MDD y 44MPD, 1-357 y 1-341, a un sujeto que lo necesite.
- 15 Para la administración parenteral (p. ej., intravenosa, subcutánea, intramuscular), la(s) proteína(s) activa(s) se puede(n) formular 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.
- 20 La biodisponibilidad de la(s) proteína(s) activa(s) de acuerdo con la invención también puede ser mejorada utilizando procedimientos de conjugación que incrementen la semivida de la molécula en el organismo humano, por ejemplo, uniendo la molécula a polietilenglicol, como se describe en el documento de Solicitud de Patente PCT WO 92/13095.
- 25 La presente invención hace referencia a un método de intensificación o inhibición de la respuesta de NIK para uso en un paciente que lo necesite, p. ej., un paciente que padece una enfermedad inflamatoria y/o cáncer tal y como se reivindica, que comprende la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de *cyc* y fragmentos de *cyc* que comprenden las regiones responsables de la unión a NIK, tales como 41MDD y 44MPD, 1-357 y 1-341, una muteína, un derivado permutado circularmente o un fragmento del mismo.
- 30 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, el estado y las 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.
- 35 Se puede utilizar *cyc* y fragmentos de *cyc* que comprenden regiones responsables de la unión a NIK, tales como 41MDD y 44MPD, 1-357 y 1-341, en un análisis para escrutar las moléculas terapéuticamente valiosas potenciales que modulan la interacción *cyc*-NIK. Las células transfectadas que expresan NIK, *cyc* y el gen informador de luciferasa bajo un promotor inducible por NF- κ B, se pueden tratar con una variedad de compuestos orgánicos sintéticos individuales creados, p. ej., mediante química combinatoria. La expresión de luciferasa (o la activación de NF- κ B) se puede comparar en las células tratadas con respecto a células testigo. Se pueden seleccionar compuestos orgánicos candidatos capaces de modular 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 señalosoma por miles de compuestos.
- 40 Además se describe un escrutinio de moléculas generadas por medio de química combinatoria, que inhiben la interacción de NIK y el receptor de la cadena de IL-2R γ , 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*, ICD*cyc* o sus fragmentos) unida a la placa con un anticuerpo específico en presencia o ausencia de compuestos orgánicos.
- 45
- 50
- 55

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

Ejemplos

Ejemplo 1

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

- 5 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 interaccionan con NIK (véanse los detalles en el Ejemplo 8). Se ha seleccionado una genoteca de médula ósea humana

Ejemplo 2

- 10 Evaluación de las interacciones de la cadena gamma 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 natural. Por lo tanto, con el fin de verificar la interacción entre 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 293-T que expresaban en exceso estas proteínas (para más detalles, véase el Ejemplo 9).

15 Para expresar en exceso NIK y *cyc*, se cotransfectaron células 293-T con cantidades iguales de plásmidos de expresión de NIK y *cyc* (pcS3MTNIK, etiqueta myc en su extremo N terminal 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.

20 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 testigo 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. También se inmunoprecipita *cyc* junto con NIK, demostrando que la interacción *cyc*-NIK se produce también en el entorno natural. 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 eficaz como NIK de tipo silvestre. 4- un producto lisado de células que expresan en exceso el extremo C terminal 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 terminal de NIK como *cyc* e inmunoprecipitadas con anticuerpo anti-NIK. *cyc* precipitaba simultáneamente con el extremo C terminal de NIK.

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

45 La Figura 3 resume los resultados del análisis de transferencia Western de productos inmunoprecipitados y productos lisados celulares totales detectados con 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 testigo 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 muestra 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 muestran 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.

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

5 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).

10 Los mutantes por delección fueron creados mediante la introducción sucesiva de codones de terminación en el dominio citoplásmico de cyc, en huecos de 10-20 aminoácidos. Se introdujeron el ADN que codifica cyc de longitud 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 silvestre y pGAD tiene el gen Leu2 de tipo silvestre. 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, aproximando mucho 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).

20 Puesto que la introducción de cyc y de mutantes en el vector presa pGADT7 para evaluar su unión a NIK como cebo manifestaba una falta de especificidad elevada, las interacciones se sometieron a ensayo con la orientación inversa: esto es, los mutantes por delección se clonaron en el vector cebo y NIK o el extremo C terminal de NIK (residuos 624-947) en el vector presa. Los resultados resumidos en la Tabla 1 muestran que ninguna de las delecciones, excepto el dominio citoplásmico de cyc (ICD) solo, mostraba una unión fuerte tanto a NIK como al extremo C terminal 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 terminal de NIK fue más fuerte que la de la molécula cyc de longitud completa. Se observó una reducción del 50% en la afinidad para NIK, deleccionando 12 aminoácidos o 44 aminoácidos en el extremo distal de la membrana de cyc/ICD.

Tabla 1

Residuos de aminoácido de cyc	NIK624-947 (dominio C-terminal)	NIK	Lamina
Longitud completa (1-369)	+/-	-	-
1-357	-	-	*
1-325	-	-	*
1-303	-	-	*
1-282	-	-	*
289-369 (la mayor parte de ICD)	++++	+++	-
289-357 (12 aa deleccionados del dominio distal de la membrana)	++	*	*
289-325 (44 aa deleccionados del ICD)	++	*	*
* No sometido a ensayo			

30 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 de NIK)	+++	*	*
NIK	+	*	*
cyc 329-369 (polipéptido 41 MDD)	*	+/-	+/-
Lamina	-	-	-

35 La unión del polipéptido 41 MDD a NIK de longitud completa o al extremo C terminal 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 terminal de NIK que con NIK de longitud completa. Estos resultados confirmaron que el polipéptido 41 MDD está implicado en la unión a NIK.

De un modo similar, se llevaron a cabo dos experimentos híbridos con estructuras artificiales 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.

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).

Se llevaron a cabo estudios de mutagénesis en ICD_{cyc}, en residuos localizados en el 41 MDD, con el fin de definir los aminoácidos específicos que interactúan 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- PP336, 337AA y 2- PP360, 361AA.

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' caagggccctcttttgcggcaatctcactgacgag (SEQ ID NO: 8)

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

5' gccctactggcgcgcatgttacaccctaaag (SEQ ID NO: 9)

5' ctttaggggtaacatgcgcgccagtaggggc (SEQ ID NO: 10)

Además, se llevaron a cabo mutaciones en 41 MDD en residuos diferentes de prolina p. ej., K338, E344 y W358.

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

5' gtcagtgagattccccagcaggagggcccttggggag (SEQ ID NO: 11)

5' ctcccaagggccctctgctgggggaatctcactgac (SEQ ID NO: 12)

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

5' ggagggcccttggggcgggctggggcctcc (SEQ ID NO: 13)

5' ggagggccccagggcccccaaggccctcc (SEQ ID NO: 14)

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

5' cagcatagcccctacgccccccatgttac (SEQ ID NO: 15)

5' gtaacatggggggccgctaggggctatgctg (SEQ ID NO: 16)

La versión mutada de *cyc*ICD se utilizó como cebo y se sometió a ensayo su interacción con el extremo C terminal de NIK en el sistema de doble híbrido, tal y como se describe en el Ejemplo 8.

Tabla 3

Cebo	Presencia-NIK624-947 (extremo C terminal)
<i>cyc</i> 289-369 (ICD)	++++
<i>cyc</i> 289-369 (PP 336, 337AA)	+++
<i>cyc</i> 289-369 (PP 360, 361AA)	++
<i>cyc</i> 289-369 K338A	+++
<i>cyc</i> 289-369 E344A	+++
<i>cyc</i> 289-369 W358A	+++
Lamina	-
TRAF2	+

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 están localizadas en la región 41MDD, son importantes para la unión a NIK.

5 Ejemplo 4

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

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

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

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

20 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 está 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 que 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).

25 El extremo C terminal 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.

30 Se ha mostrado que el mutante AlyNIK humano (la mutación en el 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 silvestre (Figura 6). El efecto de *cyc* sobre la activación de NF- κ B mediada por el mutante alyNIK 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*.

35 Como se ha mostrado más arriba, el efecto de *cyc* de longitud 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 del 41 MDD (41 residuos en el dominio distal de la membrana de *cyc*, que se ha mostrado que se unen a NIK) sobre la activación de NF- κ B inducida por NIK e intensificada por *cyc*.

40 La expresión de *cyc* intracelular y sus fragmentos en células de mamífero mediante transfección no logra producir una cantidad apreciable de proteína, tal y 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*ICD 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 293-T por pocillo en placas de 6 pocillos. A las 24 horas, las células fueron transfectadas con una concentración de ADN total de 3 µg/pocillo (ADN portador pcDNA). Se utilizó pcDNAcyc a una concentración de 50 ng/pocillo para inducir el aumento de actividad de NF-κB mediada por NIK. Se utilizaron PcGST y un plásmido que codificaba la proteína de fusión GST-41MDD a una concentración elevada de 2 µg/pocillo, pcS3MTNIK y pcDNA3luciferasa a 0,5 µg/pocillo. A las 24 horas de la transfección, las células se recogieron en 100 µl de tampón de extracción y se lisaron mediante congelación y descongelación repetidas. Los productos lisados se preaclaron mediante centrifugación (14.000 rpm, microcentrífuga 1 min). Se analizó la actividad luciferasa de 10 µl del producto lisado en 360 µl de tampón de análisis. Los resultados se resumen en la Figura 7. La inducción de NF-κB 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-κB 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 de longitud completa, inhibe la activación de NF-κB 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 deletado (Figura 1) sobre la activación de NF-κB inducida por NIK. La concentración de plásmido que codificaba cyc y los mutantes de cyc utilizada fue de 0,5 µg/ml, la misma concentración que el plásmido que codificaba NIK. En estas condiciones, se espera que la cyc de longitud completa cause la inhibición de la activación de NF-κB 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 µg/pocillo (se utilizó pcDNA3 como ADN portador). Se utilizaron plásmidos que codificaban cyc en toda su longitud y todos sus mutantes por delección a una concentración de 0,5 µg/pocillo. También se utilizaron plásmidos que codificaban NIK y luciferasa a 0,5 µg/pocillo. A las 24 horas de la transfección, se recogieron las células en 100 µl de tampón de extracción y se lisaron mediante congelación y descongelación repetidas. Los productos lisados se preaclaron 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.

Los resultados se resumen en la Fig. 8. La cyc de longitud 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 mostrado 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.

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 cinasa de NIK:

En los ejemplos previos se ha mostrado 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.

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 cinasa IKK (Fig. 9 calle 4 desde la izquierda) lisadas e inmunoprecipitadas con anticuerpos anti-NIK (para más detalles, véase el Ejemplo 11).

La reacción con cinasa se llevó a cabo con 5 µci de ³²P-ATP como se ha descrito previamente (Uhlik et al. 1998). Los resultados de la Figura 9 muestran que cyc sola no presentaba actividad cinasa alguna (Fig. 9 calle 1 desde la izquierda). Se observó un incremento de tres veces en la autofosforilación y en la fosforilación por IKK1 de NIK en presencia de cyc (comparar las calles 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:

La inducción del receptor de LTβ por su ligando, da como resultado la activación de NF-κB. Se ha sugerido en la bibliografía 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 informador con luciferasa (para más detalles, véase el Ejemplo 10).

Se preparó una línea celular a partir de fibroblastos embrionarios de ratón, que se sabe generalmente que expresan el receptor de LTβ. Se sembraron 10⁵ células de la línea anterior por pocillo en placas de 6 pocillos. A las 24 horas

5 se realizó la transfección (con reactivo de transfección Gene Porter, sistemas de terapia Gene) con el plásmido pcGST ICcgc 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 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.

La concentración de ADN total se normalizó a 2 µg/pocillo con vector vacío (pcDNA3). Se utilizaron pcGST ICcgc 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 (nº de cat. L-5162, Sigma) durante 1 hora.

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

15 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:

20 Se determinó la región de unión en NIK sometiendo a ensayo la interacción de 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 clonada 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		
	cyc	Traf2	Lamina
NIK624-947	++++	+++	-
NIK	-/+	+	-
NIK 1-367	-	*	*
NIK 1-769	-	*	*
NIK 1-820	++	*	*
Lamina	-	-	*
* No sometido a ensayo			

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

30 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 293-T 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.

Tabla 4

Estructura artificial	Unión a cyc
NIK 1-947 (de longitud completa)	+
NIK 1-821	+
NIK 1-771	+
NIK 1-720	+
NIK 1-640	-

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

Ejemplo 8

El método del sistema de doble híbrido:

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 que 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 muy próximos, 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 nº de cat. HY4053AH), basándose en evidencias que indican un papel fundamental de NIK en el desarrollo y la función del sistema linfóide.

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 293-T 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* etiquetados con *myc*, manteniendo una concentración de ADN total de 20 μ g por placa. A las 30 horas, las células se recogieron 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 terminales de *cyc* o dirigidos contra NIK, los cuales habían sido previamente adsorbidos a 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 perlas se hirvieron en 40 μ l de tampón para muestra de Laemmli y se cargaron 20 μ l en SDS/PAGE al 10%. Las proteínas de 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- κ B mediado por NIK:

Se transfectaron células 293-T ($1,5 \times 10^5$ por pocillo en placas de 6 pocillos) con una cantidad de ADN total de 3 μ g por pocillo. Cuando fue necesario se utilizó el vector vacío pcDNA como ADN portador. Las transfecciones simultáneas se llevaron a cabo tal y como se ha descrito en el Ejemplo 9 con 1 μ g de pcS3MTNIK y 0,5 μ g de vector pcDNA3 que expresaba la luciferasa bajo el control de HIV-LTR (repeticiones terminales largas del virus de la inmunodeficiencia humana), un promotor regulado al alza por NF- κ B. 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 recogieron en 100 μ l 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, microcentrífuga, 1 min). Se analizó la actividad luciferasa de 5 μ l de producto lisado en 360 μ l de tampón (fosfato de potasio 20 mM, Glicil-Glicina 20 mM, Sulfato de magnesio 8,5 μ M, EGTA 2 mM, DTT 1 mM, ATP 1 mM y D-luciferina 5 μ M (cat L-6882, Sigma).

Ejemplo 11

Análisis de cinasa:

Se transfectaron células 293-T (2×10^6 por placa de 10 cm) por medio del método con fosfato de calcio con 10 μ g de pcS3MTNIK y 10 μ g de pcDNA cyc o IKK1 etiquetada con His (pcHISIKK1) manteniendo la concentración de ADN total de 20 μ g por placa, utilizando pcDNA vacío como ADN portador. A las 24 horas, se recogieron 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 a perlas de sefarosa-proteína A. Se llevó a cabo la reacción de cinasa con 5 μ ci de γ -³²P-ATP como se ha descrito previamente (Uhlík et al. 1998).

Ejemplo 12

Preparación y escrutinio de pequeñas moléculas no peptídicas que inhiben la interacción entre 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 luciferasa bajo el control de un promotor inducible por NF- κ B (pcDNA3 luciferasa), se exponen a compuestos orgánicos sintéticos individuales y se somete a ensayo la activación de NF- κ B tal y como se ha descrito en el ejemplo 4.

Los compuestos capaces de inhibir la activación de NF- κ B 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- κ B (pcDNA3 luciferasa) y se exponen a compuestos orgánicos sintéticos individuales. Tras la exposición a compuestos sintéticos, se somete a ensayo la activación de NF- κ B como se ha descrito en el ejemplo 6, cuando 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.

Se demostró la interacción de NIK y *cyc* en un entorno de células de mamífero, en productos lisados de células 293-T que expresaban 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 candidatas sometidas a ensayo para la inmunoprecipitación simultánea con *cyc*, fueron aquellas proteínas normalmente presentes en el señalosoma, 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 muestran que NIK es precipitada simultáneamente con *cyc* antes y después de la estimulación con IL-2. Por lo tanto, NIK se encontraba asociada constitutivamente a *cyc*. Se encontraron trazas de IKK-1 a nivel basal y después de 4 horas de incubación con IL-2, otros componentes del señalosoma, 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 posición 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 señalosoma inmunoprecipitado simultáneamente con *cyc* era activo, se sometieron a ensayo los productos inmunoprecipitados anteriores en un análisis de cinasa (véanse los detalles en el Ejemplo 11) que controla la fosforilación de GST-IkBa1-54. Los resultados resumidos en la Figura 16 B indicaron que solamente los productos inmunoprecipitados procedentes de células estimuladas con IL-2, son capaces de fosforilar GS-IkBa1-54.

De este modo estos resultados demuestran que en condiciones fisiológicas, NIK está asociada constitutivamente a *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

- 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- κ B and stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase via TRAF2, TRAF5, and NF- κ B-inducing kinase. *J Biol Chem* 273, 13353-8.
- Baldwin, A. S., Jr. (1996). The NF- κ B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. *Annu Rev Immunol* 14, 649-83.
- Canicio, J., Ruiz-Lozano, P., Carrasco, M., Palacin, M., Chien, K., Zorzano, A. y Kaliman, P. (2001). Nuclear factor kappa B-inducing kinase and I kappa B kinase-alpha 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- κ B by RANK requires tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF) 6 and NF- κ B-inducing kinase. Identification of a novel TRAF6 interaction motif. *J Biol Chem* 274, 7724-31.
- 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.
- Fields, S. y Song, O. (1989). A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* 340, 245-6.
- 5 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.
- 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.
- 10 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 alpha (IKKalpha) and IKKbeta cellular kinases. *Mol Cell Biol* 18, 5157-65.
- 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.
- 15 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
- 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.
- 20 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 IKKalpha by phosphorylation of Ser-176. *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 3792-7.
- 25 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.
- 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-alpha-deficient mice and alymphoplasia (aly) mice defined by the chimeric analysis. *J Immunol* 163, 1584-91.
- 30 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 alpha in NF-kappaB activation through lymphotoxin beta receptor, but not through tumor necrosis factor receptor I. *J Exp Med* 193, 631-6.
- 35 Mercurio, F. y Manning, A. M. (1999). Multiple signals converging on NF-kappaB. *Curr Opin Cell Biol* 11, 226-32.
- 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.
- 40 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.
- 45 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.
- 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.
- 50 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.

- 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 IKK α of a second, evolutionary conserved, NF-kappa B signaling pathway. *Science* 293, 1495-9.
- 5 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.
- Smith, G. P. (1985). Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science* 228, 1315-7.
- 10 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 IKK α and IKK β . *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 10106-11.
- 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.
- 15 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.
- 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.
- 20 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.
- 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.
- 25 Yamamoto y Gaynor. *The Journal of Clinical Investigation* (2001) 107: 135-142.
- 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.
- 30 Wallach, David
Shmushkovich, Taisia
Ramakrishnan, Parameswaran
- <120> Derivados de la cadena Gamma del receptor de IL-2, su preparación y su uso
- <130> 530
- 35 <150> 149217
<151> 18-04-2002
- <150> 152183
<151> 08-10-2002
- <160> 21
- 40 <170> PatentIn versión 3.1
- <210> 1
<211> 86
<212> PRT
<213> Homo sapiens
- 45 <400> 1

ES 2 415 331 T3

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

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
 <211> 41
 <212> PRT
 5 <213> Homo sapiens

<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

<210> 3
 <211> 12
 <212> PRT
 10 <213> Homo sapiens

<400> 3

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

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

<400> 4

tgggcccccc catgttacac cctaaagcct gaaacctga 39

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

<400> 5

ES 2 415 331 T3

gaacggacga tgccccgaat tcccaccctg aagaacctag aggatcttgt tactgaatac 60
 cacgggaact tttcggcctg gagtggtgtg tctaagggac tggctgagag tctgcagcca 120
 gactacagtg aacgactctg cctcgtcagt gagattcccc caaaaggagg ggccttggg 180
 gaggggcctg gggcctcccc atgcaaccag catagcccct actgggcccc cccatgttac 240
 accctaaagc ctgaaacctg a 261
 <210> 6
 <211> 126
 <212> ADN
 5 <213> Homo sapiens
 <400> 6
 ctctgcctcg tcagtgagat tccccaaaa ggaggggccc ttggggaggg gcctggggcc 60
 tccccatgca accagcatag cccctactgg gccccccat gttacacctt aaagcctgaa 120
 acctga 126
 <210> 7
 <211> 37
 10 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 7
 ctcgtcagtg aaattgccgc aaaaggaggg gcccttg 37
 <210> 8
 15 <211> 37
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 8
 caagggcccc tcctttgcg gcaatctcac tgacgag 37
 20 <210> 9
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 9
 25 gccctactg ggccgcccga tgttacacc taaag 35
 <210> 10
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 30 <400> 10
 ctttaggtg taacatgagg cggcccagta ggggc 35
 <210> 11
 <211> 39
 <212> ADN
 35 <213> Homo sapiens
 <400> 11
 gtcagtgaga tccccagc aggaggggccc ctggggag 39
 <210> 12
 <211> 39
 40 <212> ADN

ES 2 415 331 T3

<213> Homo sapiens
 <400> 12
 ctccccaagg gccctcctg ctgggggaat ctactgac 39

5 <210> 13
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 13
 ggaggggccc ttggggcggg gcctggggcc tcc 33

10 <210> 14
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 14
 15 ggaggcccca ggccccgccc caaggcccc tcc 33

<210> 15
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

20 <400> 15
 cagcatagcc cctacgcgcc cccccatgt tac 33

<210> 16
 <211> 33
 <212> ADN
 25 <213> Homo sapiens
 <400> 16
 gtaacatggg ggggccgct aggggctatg ctg 33

<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

35 <210> 18
 <211> 81
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 18

ES 2 415 331 T3

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

<210> 19

<211> 324

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<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 2 415 331 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

<210> 20

<211> 357

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 20

ES 2 415 331 T3

Met Leu Lys Pro Ser Leu Pro Phe Thr Ser Leu Leu Phe Leu Gln Leu
 1 5 10 15
 Pro Leu Leu Gly Val Gly Leu Asn Thr Thr Ile Leu Thr Pro Asn Gly
 20 25 30
 Asn Glu Asp Thr Thr Ala Asp Phe Phe Leu Thr Thr Met Pro Thr Asp
 35 40 45
 Ser Leu Ser Val Ser Thr Leu Pro Leu Pro Glu Val Gln Cys Phe Val
 50 55 60
 Phe Asn Val Glu Tyr Met Asn Cys Thr Trp Asn Ser Ser Ser Glu Pro
 65 70 75 80
 Gln Pro Thr Asn Leu Thr Leu His Tyr Trp Tyr Lys Asn Ser Asp Asn
 85 90 95
 Asp Lys Val Gln Lys Cys Ser His Tyr Leu Phe Ser Glu Glu Ile Thr
 100 105 110
 Ser Gly Cys Gln Leu Gln Lys Lys Glu Ile His Leu Tyr Gln Thr Phe
 115 120 125
 Val Val Gln Leu Gln Asp Pro Arg Glu Pro Arg Arg Gln Ala Thr Gln
 130 135 140
 Met Leu Lys Leu Gln Asn Leu Val Ile Pro Trp Ala Pro Glu Asn Leu
 145 150 155 160
 Thr Leu His Lys Leu Ser Glu Ser Gln Leu Glu Leu Asn Trp Asn Asn
 165 170 175
 Arg Phe Leu Asn His Cys Leu Glu His Leu Val Gln Tyr Arg Thr Asp
 180 185 190
 Trp Asp His Ser Trp Thr Glu Gln Ser Val Asp Tyr Arg His Lys Phe
 195 200 205
 Ser Leu Pro Ser Val Asp Gly Gln Lys Arg Tyr Thr Phe Arg Val Arg
 210 215 220
 Ser Arg Phe Asn Pro Leu Cys Gly Ser Ala Gln His Trp Ser Glu Trp
 225 230 235 240
 Ser His Pro Ile His Trp Gly Ser Asn Thr Ser Lys Glu Asn Pro Phe
 245 250 255

ES 2 415 331 T3

Leu Phe Ala Leu Glu Ala Val Val Ile Ser Val Gly Ser Met Gly Leu
 260 265 270

Ile Ile Ser Leu Leu Cys Val Tyr Phe Trp Leu Glu Arg Thr Met Pro
 275 280 285

Arg Ile Pro Thr Leu Lys Asn Leu Glu Asp Leu Val Thr Glu Tyr His
 290 295 300

Gly Asn Phe Ser Ala Trp Ser Gly Val Ser Lys Gly Leu Ala Glu Ser
 305 310 315 320

Leu Gln Pro Asp Tyr Ser Glu Arg Leu Cys Leu Val Ser Glu Ile Pro
 325 330 335

Pro Lys Gly Gly Ala Leu Gly Glu Gly Pro Gly Ala Ser Pro Cys Asn
 340 345 350

Gln His Ser Pro Tyr
 355

<210> 21

<211> 341

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 21

Met Leu Lys Pro Ser Leu Pro Phe Thr Ser Leu Leu Phe Leu Gln Leu
 1 5 10 15

Pro Leu Leu Gly Val Gly Leu Asn Thr Thr Ile Leu Thr Pro Asn Gly
 20 25 30

Asn Glu Asp Thr Thr Ala Asp Phe Phe Leu Thr Thr Met Pro Thr Asp
 35 40 45

Ser Leu Ser Val Ser Thr Leu Pro Leu Pro Glu Val Gln Cys Phe Val
 50 55 60

Phe Asn Val Glu Tyr Met Asn Cys Thr Trp Asn Ser Ser Ser Glu Pro
 65 70 75 80

Gln Pro Thr Asn Leu Thr Leu His Tyr Trp Tyr Lys Asn Ser Asp Asn
 85 90 95

Asp Lys Val Gln Lys Cys Ser His Tyr Leu Phe Ser Glu Glu Ile Thr
 100 105 110

ES 2 415 331 T3

Ser Gly Cys Gln Leu Gln Lys Lys Glu Ile His Leu Tyr Gln Thr Phe
 115 120 125
 Val Val Gln Leu Gln Asp Pro Arg Glu Pro Arg Arg Gln Ala Thr Gln
 130 135 140
 Met Leu Lys Leu Gln Asn Leu Val Ile Pro Trp Ala Pro Glu Asn Leu
 145 150 155 160
 Thr Leu His Lys Leu Ser Glu Ser Gln Leu Glu Leu Asn Trp Asn Asn
 165 170 175
 Arg Phe Leu Asn His Cys Leu Glu His Leu Val Gln Tyr Arg Thr Asp
 180 185 190
 Trp Asp His Ser Trp Thr Glu Gln Ser Val Asp Tyr Arg His Lys Phe
 195 200 205
 Ser Leu Pro Ser Val Asp Gly Gln Lys Arg Tyr Thr Phe Arg Val Arg
 210 215 220
 Ser Arg Phe Asn Pro Leu Cys Gly Ser Ala Gln His Trp Ser Glu Trp
 225 230 235 240
 Ser His Pro Ile His Trp Gly Ser Asn Thr Ser Lys Glu Asn Pro Phe
 245 250 255
 Leu Phe Ala Leu Glu Ala Val Val Ile Ser Val Gly Ser Met Gly Leu
 260 265 270
 Ile Ile Ser Leu Leu Cys Val Tyr Phe Trp Leu Glu Arg Thr Met Pro
 275 280 285
 Arg Ile Pro Thr Leu Lys Asn Leu Glu Asp Leu Val Thr Glu Tyr His
 290 295 300
 Gly Asn Phe Ser Ala Trp Ser Gly Val Ser Lys Gly Leu Ala Glu Ser
 305 310 315 320
 Leu Gln Pro Asp Tyr Ser Glu Arg Leu Cys Leu Val Ser Glu Ile Pro
 325 330 335
 Pro Lys Gly Gly Ala
 340

REIVINDICACIONES

1. Un fragmento de polipéptido que se une a cinasa que induce NF-κB (NIK) de la cadena gamma común (cyc) del receptor de IL-2 seleccionado entre el grupo consistente en:
 - (i) SEQ ID NO: 1 o un fragmento de polipéptido que se une a NIK de la misma;
 - 5 (ii) una muteína que se une a NIK de un fragmento de polipéptido que se une a NIK de la cyc del receptor de IL-2 de (i) en la que hasta 25% de los residuos de aminoácidos se han delecionado, añadido o sustituido;
 - (iii) una molécula lineal que se une a NIK permutada circularmente de un fragmento de polipéptido que se une a NIK de la cyc del receptor de IL-2 de (i); y
 - 10 (iv) el fragmento de polipéptido de cyc de SEQ ID NO: 20 o SEQ ID NO: 21.
2. Un polipéptido según la reivindicación 1, que comprende 41MDD tal y como se define en SEQ ID NO: 2.
3. Un polipéptido según la reivindicación 1, que comprende 44MPD tal y como se define en SEQ ID NO: 17.
4. Un ADN que codifica un polipéptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, o la hebra no codificadora del mismo.
- 15 5. Un vector que comprende un ADN según la reivindicación 4.
6. Una célula que comprende un vector según la reivindicación 5.
7. Un método para la producción de un polipéptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende cultivar la célula según la reivindicación 6 y recoger el polipéptido producido.
8. Un anticuerpo o un fragmento del mismo que reconoce específicamente y se une al polipéptido de SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 17 e inhibe las interacciones NIK-cyc.
- 20 9. El anticuerpo según la reivindicación 8, que es un anticuerpo policlonal o monoclonal, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo totalmente humanizado, un anticuerpo anti-Id o un anticuerpo intracelular polipeptídico de la cyc.
10. Una composición farmacéutica que comprende un polipéptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, el ADN según la reivindicación 4, el vector según la reivindicación 5 o el anticuerpo según la reivindicación 8 o 9.
- 25 11. Una composición farmacéutica que comprende un polipéptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, el ADN según la reivindicación 4, el vector según la reivindicación 5 o el anticuerpo según la reivindicación 8 o 9, para uso en el tratamiento o la prevención de artritis reumatoide y otras artropatías, osteoartritis, enfermedad inflamatoria intestinal, asma, infarto cardíaco, enfermedad de Alzheimer, aterosclerosis, tiroiditis inmune, anemia hemolítica autoinmune o cáncer.
- 30 12. El uso de un polipéptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, el ADN según la reivindicación 4, el vector según la reivindicación 5 o el anticuerpo según la reivindicación 8 o 9, en la preparación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de artritis reumatoide y otras artropatías, osteoartritis, enfermedad inflamatoria intestinal, asma, infarto cardíaco, enfermedad de Alzheimer, aterosclerosis, tiroiditis inmune, anemia hemolítica autoinmune o cáncer.

35

Figura 1

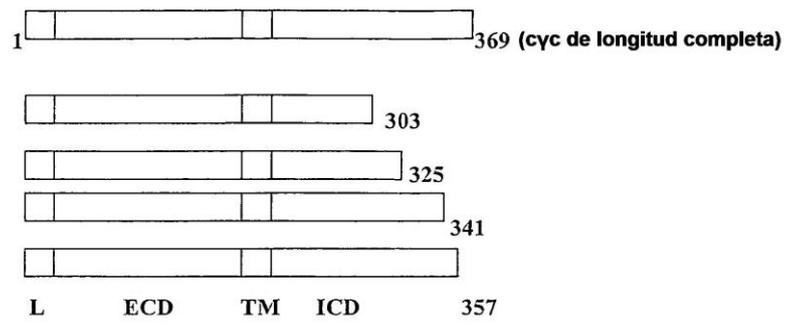


Figura 2



Figura 3

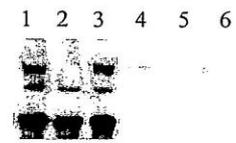


Figura 4

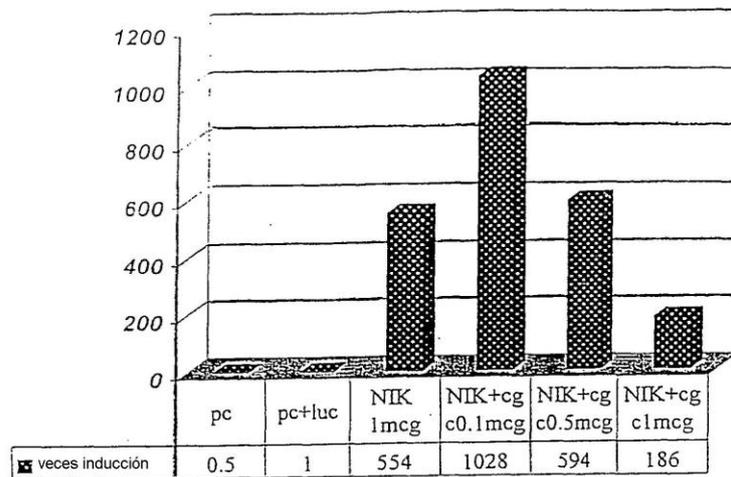


Figura 5

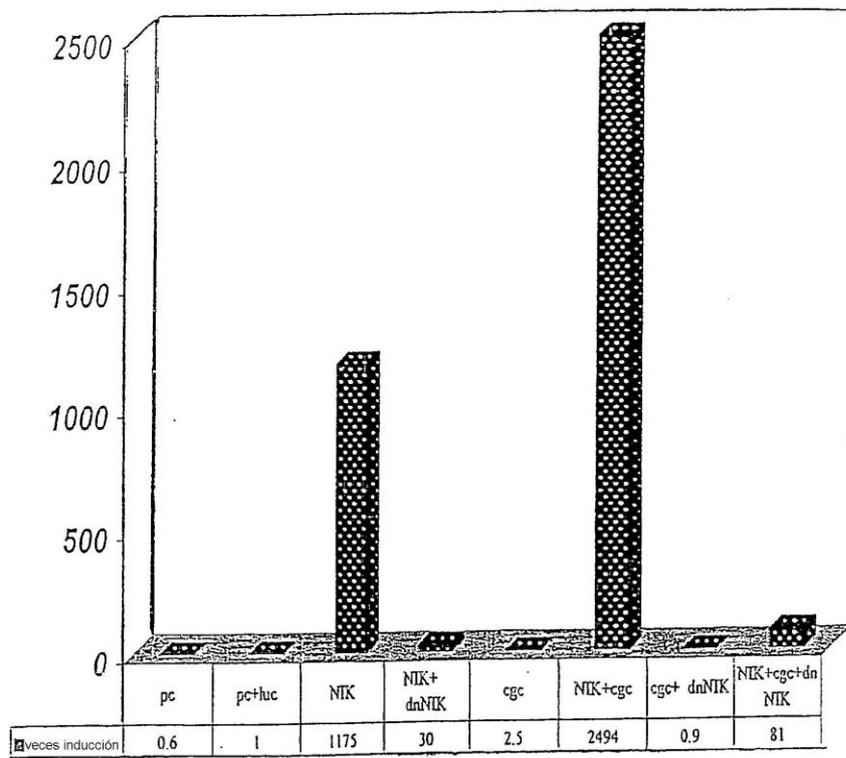


Figura 6

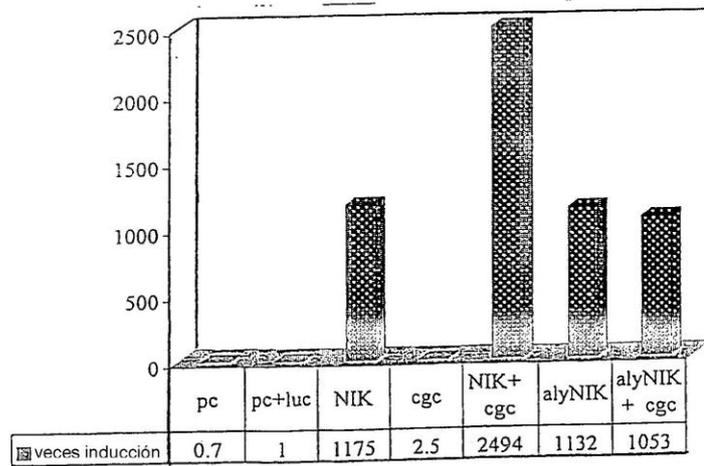


Figura 7

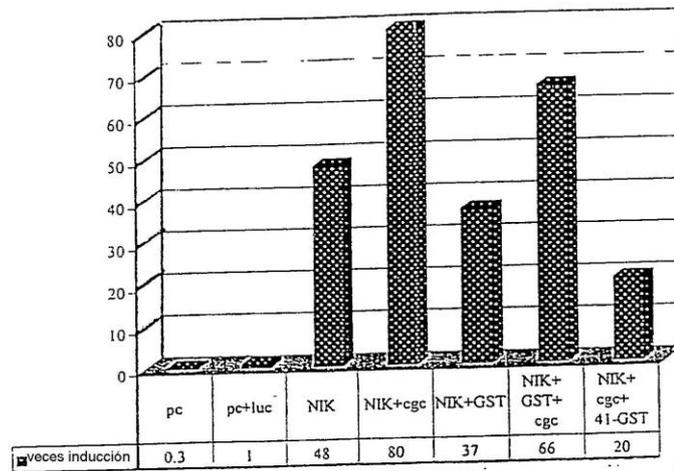


Figura 8

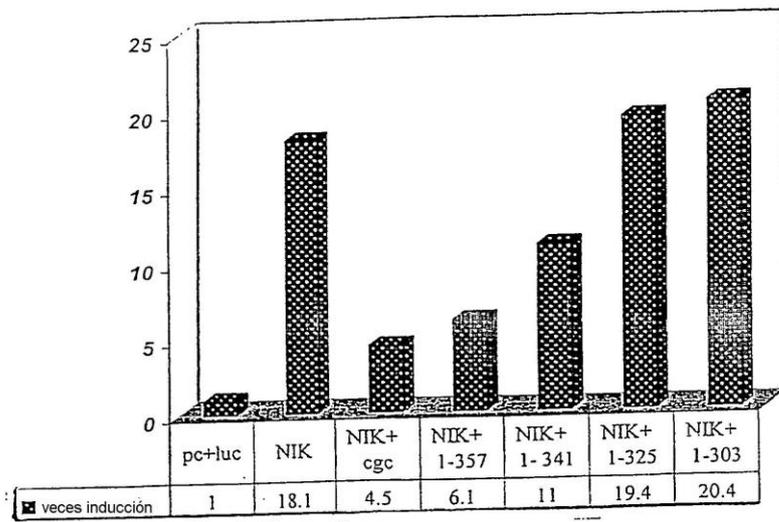




Figura 9

Figura 10

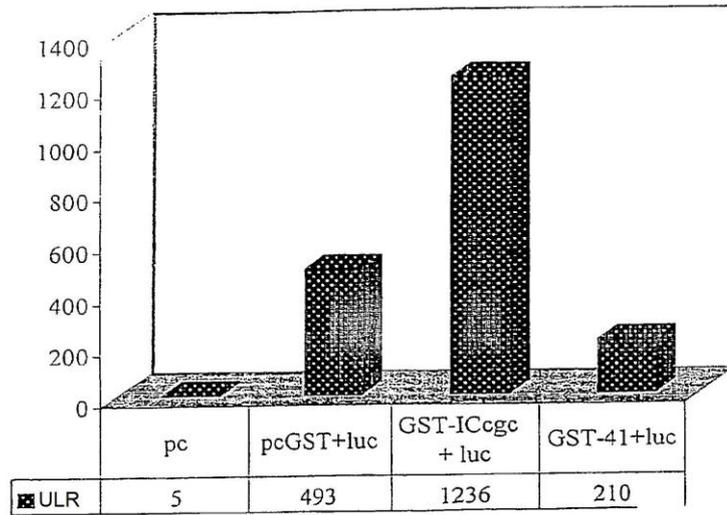


Figura 11

ERTMPRIPTLKNLEDLVTEYHGNFSAWSGVSKGLAESLQPDYSERLCLVSEIPPK
GGALGEGPGASPCNQHSPYWAPPCYTLKPET

Figura 12

LCLVSEIPKGGALGEGPGASPCNQHSPYWAPPCYTLKPET

Figura 13

GAACGGACGATGCCCCGAATTCCCACCTGAAGAACCTAGAGGATCTTGTTA
CTGAATACCACGGGAACCTTTCGGCCTGGAGTGGTGTGTCTAAGGGACTGGC
TGAGAGTCTGCAGCCAGACTACAGTGAACGACTCTGCCTCGTCAGTGAGATT
CCCCAAAAGGAGGGGCCCTTGGGGAGGGGCCTGGGGCCTCCCCATGCAACC
AGCATAGCCCCTACTGGGCCCCCCCATGTTACACCCTAAAGCCTGAAACCTG
A

Figura 14

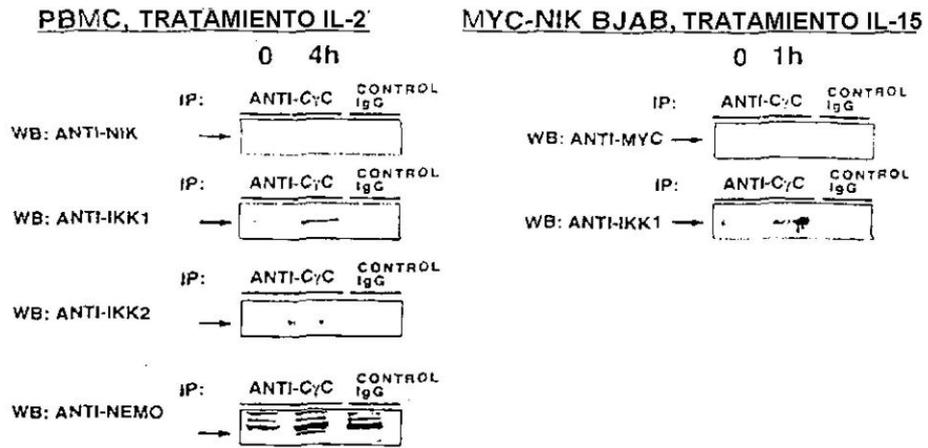
CTCTGCCTCGTCAGTGAGATTCCCCAAAAGGAGGGGCCCTTGGGGAGGGGC
CTGGGGCCTCCCCATGCAACCAGCATAGCCCCTACTGGGCCCCCCCATGTTAC
ACCCTAAAGCCTGAAACCTGA

Figura 15

WAPPCYTLKPET

RECLUTAMIENTO DE IKK INDUCIDO POR CITOCINA HACIA C_γC Y ACTIVACIÓN

16A



16B

