

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 469 670**

51 Int. Cl.:

C07K 16/40 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.11.2004 E 04799393 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.05.2014 EP 1689786**

54 Título: **Métodos y agentes para inmunomodulación y métodos para identificar inmunomoduladores**

30 Prioridad:

**30.11.2003 IL 15913303
28.07.2004 IL 16325004**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
18.06.2014

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;
WANG, WANGXIA y
SHMUSHKOVICH, TAISIA**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 469 670 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

Métodos y agentes para inmunomodulación y métodos para identificar inmunomoduladores

Campo de la invención

5 La presente descripción se refiere a métodos para regular una respuesta inmune en un individuo. Más particularmente, la presente invención se refiere a agentes que se dirigen a NIK y a proteínas que se unen a NIK que participan en la vía canónica de activación de NF- κ B, para uso en el tratamiento de un trastorno inmune y a métodos para identificar moléculas/agentes que disminuyen la actividad de NIK.

Antecedentes de la invención

10 La familia de factores de transcripción NF- κ B/Rel está activa en la respuesta inflamatoria e inmune celular, en la regulación del ciclo celular, la diferenciación y la protección contra la apoptosis [Baeuerle y Baltimore, Cell, 87:13-20, (1996); Ghosh, et al, Annu. Rev. Immunol. 16:225-260, (1998)]. En los mamíferos, esta familia de factores de transcripción está compuesta por cinco miembros: p65 (RelA), RelB, c-Rel, NF- κ B1 (que se produce como precursor, p105, y en una forma procesada, p50) y NF- κ B2 (que se produce como un precursor, p100, y como su producto procesado, p52). Los homodímeros y heterodímeros de la proteína NF- κ B existen en el citoplasma, formando un
15 complejo con inhibidores de la familia I κ B. Las formas precursoras de NF- κ B1 y NF- κ B2 (p105 y p100, respectivamente) contienen regiones inhibitorias de homólogos de I κ B C-terminales. Los dímeros que contienen estas proteínas NF- κ B son retenidos en el citoplasma debido a la función de las regiones homólogas a I κ B. Además NF- κ B1/p105 y NF- κ B2/p100 también se pueden asociar con dímeros de otras proteínas NF- κ B y forzar una retención citoplasmática sobre ellos. La activación de NF- κ B se produce principalmente a través de la degradación inducida de
20 las proteínas I κ B o de regiones homólogas a I κ B en NF- κ B1/p105 y NF- κ B2/p100, y la consiguiente la translocación de los dímeros de NF- κ B al núcleo. La degradación inducida de las proteínas I κ B proporciona el mecanismo más importante para regular la actividad de NF- κ B (Baeuerle y Baltimore, 1996) (Ghosh et al., 1998) (Ghosh y Karin, 2002).

25 La mayor parte del conocimiento que se tiene sobre estos procesos se refiere a los mecanismos de activación de un dímero de NF- κ B ubicuo, p65:p50. El evento decisivo que inicia esta vía "canónica" es la activación de una proteína cinasa que fosforila I κ B, IKK2. IKK2 está presente dentro de un complejo macromolecular, el "señaloma IKK", junto con una cinasa estructuralmente homóloga, IKK1, y una proteína adaptadora, NEMO. La fosforilación mediada por IKK2 de I κ B conduce a su degradación proteasómica y, por lo tanto, a la activación de sus dímeros de NF- κ B asociados (Karin y Ben-Neriah, 2000).

30 Otros estudios han arrojado algo de conocimiento sobre una vía "alternativa" a través de la cual los dímeros de NF- κ B que contienen NF- κ B2/p100 se activan. Esta activación se produce con independencia de IKK2 o NEMO, pero depende de IKK1. La fosforilación de p100 después de la activación de esta vía, conduce a un procesamiento proteolítico limitado en el que solo se degrada la región homóloga de I κ B dentro de p100. Este proceso permite que el fragmento p52 resultante sufra una translocación al núcleo en asociación con algunas otras proteínas NF- κ B (principalmente RelB) (Xiao et al., 2001) (Senftleben et al., 2001) (Solan et al., 2002) (Coope et al., 2002) (Claudio et al., 2002) (Kayagaki et al., 2002) (Dejardin et al., 2002) (Yilmaz et al., 2003) (Hatada et al., 2003).

35 Las proteínas de la familia de receptores del factor de necrosis tumoral/factor de crecimiento nervioso (TNF/NGF) son un grupo de receptores de la superficie celular implicados de forma decisiva en el mantenimiento de la homeostasis del sistema inmune. Estas proteínas interactúan con sus ligandos correspondientes, ya sea para inducir la muerte celular o para impulsar la supervivencia celular de las células inmunes. La función biológica de este grupo de proteínas se ha asociado estrechamente con la regulación de la respuesta inmune y la patogénesis de enfermedades autoinmunes. [Zhou et al., Immunol. Res. 26:323-336, (2002)]. Los receptores de TNF controlan múltiples actividades inmunológicas de defensa así como ciertos procesos de desarrollo a través de la activación de NF- κ B (Wallach et al., 1999) (Locksley et al., 2001). La mayoría de estos receptores son capaces de activar la vía canónica de
40 NF- κ B. Además, el receptor de la linfotoxina- β (LT β R), cuya expresión está restringida a las células del estroma y varios receptores que se encuentran en los linfocitos (CD40, BLyS/BAFF y, tal y como se muestra en el presente trabajo - CD27), también activan la vía alternativa (Dejardin et al., 2002) (Coope et al., 2002) (Claudio et al., 2002) (Kayagaki et al., 2002) (Hatada et al., 2003).

45 La señalización para la activación de NF- κ B a través de varios receptores de la familia de receptores de TNF, se inicia por su unión a proteínas adaptadoras de la familia TRAF. En células tratadas con TNF se ha mostrado que los TRAFs facilitan, en colaboración con la proteína adaptadora RIP, la incorporación de los componentes del señaloma en el receptor de TNF p55 (Zhang et al., 2000) (Devin et al., 2000) (Devin et al., 2001). Una proteína adicional que participa en la activación de NF- κ B a través de la familia de receptores de TNF/NGF fue identificada como una "cinasa que induce NF- κ B" (NIK), (Malinin et al., 1997).

55 Inicialmente se sugirió que NIK mediaba en la activación de la vía canónica de NF- κ B como respuesta a múltiples inductores con muchas funciones fisiológicas diferentes (Malinin et al., 1997). Sin embargo, estudios posteriores de ratones de la cepa *aly*, que expresan un mutante de NIK no funcional, así como de ratones con el gen NIK desactivado, impugnaron la noción de que NIK tuviera un papel funcional en las actividades de la mayoría de estos inducto-

res. Sugirieron más bien, que NIK participa selectivamente en la activación de NF-κB a través de un conjunto restringido de ligandos que afectan de manera específica al desarrollo y la función de los linfocitos (Shinkura et al., 1999) (Yin et al., 2001). Además, basándose en la caracterización de células obtenidas a partir de estos ratones mutantes, se sugirió que NIK no participa en absoluto en la vía canónica de NF-κB, sino que sirve exclusivamente para activar la vía alternativa (Pomerantz y Baltimore, 2002). Los linfocitos de ratones mutantes para NIK muestran un patrón de diferenciación altamente aberrante (Miyawaki et al., 1994) (Shinkura et al., 1999) (Matsumoto et al., 1999) (Yamada et al., 2000) (Karrer et al., 2000) (Fagarasan et al., 2000), por lo tanto, el presente trabajo pretende evaluar de nuevo la función señalizadora de NIK en los linfocitos.

En la actualidad, la función de NIK en los linfocitos se ha vuelto a evaluar determinando el efecto de su agotamiento o inhibición *in vitro* en células cultivadas de líneas linfoblastoides. Los ensayos que mostraban que NIK no se requiere para la activación de la vía canónica a través de TNF en los linfocitos, se confirmaron. Sin embargo, tal y como se detalla a continuación, se observó que NIK desempeñaba un papel crucial en estas células en la activación de la vía alternativa, así como de la vía canónica a través de un ligando de CD40 (CD40L) y la inducción de BlyS/BAFF. Además, se observó que CD27 (Camerini et al., 1991), un receptor de la familia de TNF/NGF que se expresa principalmente en los linfocitos T y los linfocitos B de memoria y que se había sugerido anteriormente que activaba NF-κB (Yamamoto et al., 1998) en una forma independiente de NIK (Akiba et al., 1998), iniciaba la vía alternativa. Los inventores también descubrieron que NIK se une a SIVA, una proteína asociada con CD27 (Prasad et al., 1997), y media en la vía canónica y la vía alternativa de activación de NF-κB, como respuesta a este receptor. Aunque NIK no era necesario para la activación del señalosoma a través del receptor de TNF p55, la activación del señalosoma a través de CD27 dependía de NIK. Por otra parte, a diferencia de la activación a través del receptor de TNF p55, la activación a través de CD27 inducía, en una manera dependiente de NIK, la incorporación selectiva de IKK1 a este receptor, un proceso que podría ser el evento inicial en la activación dependiente de NIK de las dos vías de NF-κB por medio de CD27.

La función biológica de miembros de la vía de NF-κB dependiente de NIK se ha asociado estrechamente con la regulación de la respuesta inmune y la patogénesis de enfermedades autoinmunes.

Se ha mostrado de acuerdo con la presente invención que NIK, a diferencia de enseñanzas de la técnica anterior, participa en la vía canónica de activación de NF-κB. Además, se ha mostrado que NIK participa en una vía alternativa de NF-κB que está inducida por BlyS y CD40L y se ha identificado a CD70 como un nuevo inductor de esta vía alternativa.

Por tanto, los presentes hallazgos establecen el papel de NIK en la activación de NF-κB y proporcionan de este modo el impulso para utilizar diversos agentes dirigidos a NIK en el tratamiento de diversas enfermedades inmunes.

Compendio de la invención

La invención se refiere a lo siguiente:

1. Uso de un agente en la preparación de un medicamento para el tratamiento de un trastorno inmune causado o agravado por una activación anormal de NF-κB a través de la vía canónica, en donde dicho agente es un anticuerpo capaz de unirse a las coordenadas de aminoácidos 123-175 de SIVA1 (SEQ ID NO: 3) o a las coordenadas de aminoácidos 58-110 de SIVA2 (SEQ ID NO: 4), una molécula de ARN pequeño de interferencia o una ribozima en donde el ARN pequeño de interferencia o la ribozima regula a la baja el gen diana SIVA.

2. Un agente para uso en el tratamiento de un trastorno inmune causado o agravado por una activación anormal de NF-κB a través de la vía canónica, en donde dicho agente es un anticuerpo capaz de unirse a las coordenadas de aminoácidos 123-175 de SIVA1 (SEQ ID NO: 3) o a las coordenadas de aminoácidos 58-110 de SIVA2 (SEQ ID NO: 4), una molécula de ARN pequeño de interferencia o una ribozima en donde el ARN pequeño de interferencia o la ribozima regula a la baja el gen diana SIVA.

3. El uso del apartado 1 o el agente para uso según el apartado 2, en donde dicho trastorno inmune se selecciona entre el grupo que consiste en mieloma múltiple (MM), síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), síndrome de Sjogren (SS), leucemia linfocítica crónica de linfocitos B (LLC-B), lupus eritematoso sistémico, enfermedad de colon inflamatorio, síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SRIS), síndrome de disfunción multiorgánica (SDMO) y síndrome de dificultad respiratoria aguda (SDRA).

4. Un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo capaz de unirse específicamente a una región de una secuencia de aminoácidos indicada por las coordenadas 123-175 de SEQ ID NO: 3.

5. Un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo capaz de unirse específicamente a una región de una secuencia de aminoácidos indicada por las coordenadas 58-110 de SEQ ID NO: 4.

6. Un método *in vitro* para identificar un modulador inmune putativo, comprendiendo el método identificar una molécula capaz de incrementar o disminuir la formación del complejo NIK-SIVA, siendo dicha molécula el modulador inmune putativo.

7. Un método *in vitro* para escrutar moléculas capaces de disminuir la actividad de NIK que comprende poner en contacto una célula con un ligando de un miembro de la familia de receptores de TNF/NGF seleccionado entre CD70, CD40L o Blys/BAFF capaz de inducir la vía canónica y alternativa dependiente de NIK de NF-κB, incubar la célula antes, durante o después de dicha puesta en contacto con moléculas sometidas a ensayo individuales, detectar la activación de la vía canónica de NF-κB en la célula y seleccionar molécula/s individuales capaces de disminuir la inducción de la vía canónica de NF-κB a través de dicho ligando.
8. El método del apartado 7, en donde las células son de tipo linfoblastoide.
9. El método del apartado 7, en donde la/s moléculas seleccionadas son capaces de disminuir la inducción de la vía canónica inducida a través de dicho ligando pero no a través de cualquier otro ligando capaz de inducir la vía canónica de NF-κB en una manera independiente de NIK.
10. El método del apartado 8 o 9, en donde la célula se selecciona a partir de células Ramos, Raji y BJAB.
11. El método del apartado 9, en donde el ligando capaz de inducir la vía canónica de NF-κB en una manera independiente de NIK, es TNF.
12. El método según uno cualquiera de los apartados 7 a 11, en donde la activación de la vía canónica de NF-κB se detecta controlando parámetros seleccionados entre degradación de IκB, fosforilación de IκBα y translocación de p65.

La descripción se refiere además al uso de un agente capaz de aumentar o disminuir la formación de complejos NIK-SIVA, en la preparación de un medicamento para el tratamiento de un trastorno inmune. Más específicamente, dicho trastorno inmune se caracteriza por una función o nivel anormal de al menos una proteína seleccionada entre el grupo que consiste en Blys/BAFF, CD27, SIVA y NIK. Ejemplos de trastornos inmunes de acuerdo con la invención son mieloma múltiple (MM), síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), síndrome de Sjogren (SS), leucemia linfocítica crónica de linfocitos B (LLC-B), lupus eritematoso sistémico, enfermedad de colon inflamatorio, síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SRIS), síndrome de disfunción multiorgánica (SDMO) y síndrome de dificultad respiratoria aguda (SDRA).

En un aspecto, la descripción proporciona el uso de un agente capaz de incrementar o disminuir la regulación de CD27 dependiente de NIK en la preparación de un medicamento para tratar un trastorno inmune. Particularmente, la descripción proporciona el uso de un agente tal como un anticuerpo capaz de unirse a NIK, p. ej., un anticuerpo dirigido contra el bucle de activación de NIK fosforilado, o una molécula pequeña de ARN de interferencia, p. ej., la que se indica en SEQ ID NO: 15, o una ribozima, para disminuir la regulación de CD27 dependiente de NIK.

En otro aspecto, la descripción proporciona el uso de un agente capaz de incrementar o disminuir la actividad de NIK en la preparación de un medicamento para tratar un trastorno inmune causado o agravado por la activación anormal de NF-κB a través de la vía canónica. Particularmente, la descripción proporciona el uso de un agente tal como un anticuerpo capaz de unirse a NIK, p. ej., un anticuerpo dirigido contra el bucle de activación de NIK fosforilado, o una molécula pequeña de ARN de interferencia, p. ej., la que se indica en SEQ ID NO: 15, o una ribozima, para disminuir la regulación de CD27 dependiente de NIK. Más específicamente, dicha activación anormal de NF-κB puede estar causada por inducción de CD40L, Blys, CD70 y/o la activación del receptor de los mismos.

Además, la descripción proporciona un método para tratar un trastorno inmune que comprende administrar a un individuo que tiene el trastorno inmune una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente capaz de aumentar o disminuir la formación de complejo SIVA dependiente de NIK, tratando de este modo el trastorno inmune en el individuo. En particular, dicho trastorno inmune se caracteriza por una función o un nivel anormal de al menos una proteína seleccionada entre el grupo que consiste en Blys/BAFF, CD27, SIVA y NIK. Más específicamente, el método de acuerdo con la invención se puede utilizar para tratar el mieloma múltiple (MM), síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), síndrome de Sjogren (SS), leucemia linfocítica crónica de linfocitos B (LLC-B), lupus eritematoso sistémico, enfermedad de colon inflamatorio, síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SRIS), síndrome de disfunción multiorgánica (SDMO) y síndrome de dificultad respiratoria aguda (SDRA). En una realización de la descripción, la administración del agente que modula la interacción entre NIK-SIVA se puede efectuar expresando dicho agente dentro de células de dicho individuo, tales como linfocitos.

También la descripción se refiere a un método para tratar un trastorno inmune que comprende administrar a un individuo que padece el trastorno inmune, una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente capaz de disminuir o incrementar la regulación de CD27 dependiente de NIK, tratando de este modo el trastorno inmune en el individuo. Particularmente, la administración se puede efectuar expresando dicho agente dentro de células de dicho individuo, tales como linfocitos.

En una realización adicional, la descripción se refiere a un método para tratar un trastorno inmune causado o agravado por una activación anormal de NF-κB a través de la vía canónica, que comprende administrar a un individuo que padece el trastorno, una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente capaz de disminuir o incrementar la actividad de NIK. Particularmente en el contexto de la presente invención, la activación anormal de NF-κB puede estar causada por la inducción de CD40L, CD70 o Blys y/o la activación del receptor de los mismos. En una realiza-

ción particular de la descripción, el método implica el uso de un agente capaz de disminuir la actividad de NIK, por ejemplo, un anticuerpo dirigido contra el bucle de activación de NIK fosforilado, una molécula pequeña de ARN de interferencia, tal como la de SEQ ID NO: 15, o una ribozima.

5 La descripción proporciona también, un polinucleótido aislado que comprende una secuencia de ácido nucleico capaz de regular a la baja específicamente la expresión de NIK en las células, provista a las mismas como una molécula pequeña de ARN de interferencia, tal como la de SEQ ID NO: 15, una estructura artificial que comprende tal polinucleótido y una célula que comprende la estructura artificial de ácido nucleico.

10 En otra realización, la descripción proporciona un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo capaz de unirse específicamente a una región de una secuencia de aminoácidos indicada por las coordenadas 624-947 de SEQ ID NO: 2, 123-175 de SEQ ID NO: 3 y/o 58-110 de SEQ ID NO: 4

Además, la invención proporciona un método para identificar un modulador inmune putativo, en donde el método comprende identificar una molécula capaz de aumentar o disminuir la formación del complejo NIK-SIVA, siendo dicha molécula el modulador inmune putativo.

15 La descripción también proporciona un método para identificar un modulador inmune putativo, en donde el método comprende identificar una molécula capaz de aumentar o disminuir la regulación de CD27 dependiente de NIK, siendo dicha molécula el modulador inmune putativo.

20 Además, la invención proporciona un método para el escrutinio (o identificación y/o selección) de moléculas capaces de disminuir la actividad de NIK que comprende poner en contacto una célula con un ligando de una familia de receptores de TNF/NGF, seleccionado entre CD70, CD40L o Blys/BAFF, capaz de inducir la vía canónica y alternativa dependiente de NIK en la célula, incubar la célula antes, después o durante dicha puesta en contacto con moléculas sometidas a ensayo individuales, detectar la activación de la vía canónica en la célula y seleccionar molécula/s individuales capaces de modular la inducción de la vía canónica inducida por dicho ligando.

25 En un aspecto, la invención proporciona un método para el escrutinio (identificación y/o selección) de moléculas capaces de disminuir la actividad de NIK que comprende poner en contacto una célula linfoblastoide con un ligando de una familia de receptores de TNF/NGF seleccionado entre CD70, CD40L o Blys/BAFF, capaz de activar NIK y la vía canónica en la célula, incubar la célula antes, después o durante dicha puesta en contacto, con moléculas sometidas a ensayo individuales, detectar la activación de la vía canónica y seleccionar molécula/s individuales capaces de modular la inducción de la vía canónica inducida por dicho ligando, pero no por cualquier otro ligando capaz de inducir la vía canónica de una manera independiente de NIK.

30 En una realización de la invención, el ligando utilizado para el método de escrutinio se selecciona entre CD70, CD40L o Blys/BAFF.

En otra realización de la invención, las células para el método de escrutinio son de tipo linfoblastoide tal como, por ejemplo, células Ramos, Raji o BJAB.

35 En una realización adicional de la invención, la activación de la vía canónica se detecta en el método de escrutinio mediante el control de parámetros indicativos de la activación de la vía canónica, tales como la degradación de I κ B, la fosforilación de I κ B α y la translocación de p65.

40 A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en este documento tienen el mismo significado que el que entiende comúnmente un experto ordinario en la técnica a la que pertenece esta invención. Aunque se pueden utilizar métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento en la puesta en práctica o el ensayo de la presente invención, a continuación se describen métodos y materiales adecuados. En caso de conflicto, dominará la memoria descriptiva de la patente, incluyendo las definiciones. Además, los materiales, los métodos y los ejemplos son solo ilustrativos y no pretenden ser limitantes.

Breve descripción de los dibujos

45 La invención se describe en esta memoria solamente a modo de ejemplo, haciendo referencia a los dibujos que se acompañan. Haciendo ahora referencia específica a los dibujos en particular, se hace hincapié en que los datos que se muestran son únicamente a modo de ejemplo y con fines de una exposición ilustrativa de las realizaciones preferidas de la presente invención, y se presentan para proporcionar lo que se cree que es la descripción más útil y fácilmente entendible de los principios y aspectos conceptuales de la invención. En este sentido, no se hace ningún intento de mostrar detalles estructurales de la invención con más detalle del necesario para una comprensión esencial de la invención, en donde la descripción junto con los dibujos muestra a los expertos en la técnica cómo las
50 diversas formas de la invención se pueden plasmar en la práctica.

En los dibujos:

Las Figs. 1a-e ilustran la unión de NIK a SIVA.

Figura 1a ilustra los ensayos en dos híbridos de levadura de la unión de NIK a SIVA. La unión de NIK y su mutante

- 5 en el extremo C-terminal (NIK 624-947) con la parte C-terminal de SIVA (aminoácidos 123-175 en SIVA1 o 58-110 en SIVA2) o TRAF2, se evaluó utilizando levadura SFY526 transformada. El desarrollo de una reacción con color fuerte al cabo de 1 hora y 3 horas se indica como “++” y “+”, respectivamente; “-” indica que no hay formación de color en 24 h. Este ensayo muestra que el fragmento C-terminal de SIVA se une a la parte C-terminal de NIK y esta unión es más fuerte que la observada con la proteína NIK de longitud completa.
- El panel superior de la Figura 1b es una tabla que representa el patrón de transfección de células HEK293T con plásmidos que expresan myc-NIK, HIS-SIVA1, HIS-SIVA2 o myc-*aly* NIK. “+” Indica que el plásmido correspondiente se utilizó para la transfección, de lo contrario se indica “-”.
- 10 El panel central de la Figura 1b representa una coimmunoprecipitación de NIK (o de NIK en el que se había introducido una mutación de sentido erróneo correspondiente a la encontrada en ratones *aly*) con SIVA utilizando anticuerpos contra HIS fusionada a SIVA1 y SIVA2. La coimmunoprecipitación se evaluó a las 24 h.
- El panel inferior de la Figura 1b es un análisis de transferencia Western del lisado celular total con anticuerpos contra el marcador myc fusionado con NIK y con *aly* NIK.
- 15 El panel superior de la Figura 1c es una tabla que representa el patrón de transfección de células HEK293T con plásmidos que expresan HIS-SIVA1, HIS-SIVA2 myc-NIK, o myc-*aly* NIK. “+” Indica que el plásmido correspondiente se utilizó para la transfección, de lo contrario se indica “-”.
- 20 El panel central de la Figura 1c es una coimmunoprecipitación de SIVA con NIK procedente de células HEK293T transfectadas transitoriamente, utilizando anticuerpos contra myc fusionado con NIK y *aly* NIK, la coimmunoprecipitación se evaluó a las 24 h. El panel inferior de la Figura 1c es un análisis de transferencia Western del lisado celular total con anticuerpos contra el marcador HIS fusionados con SIVA1 y SIVA2. Las Figuras 1b y 1c muestran que NIK coimmunoprecipita bidireccionalmente con SIVA1 y SIVA2 y “*aly* NIK” coimmunoprecipita con SIVA1 y, en menor medida, también con SIVA2.
- 25 El panel superior de la Figura 1d es una tabla que representa el patrón de transfección de células HEK293T con plásmidos que expresan myc-NIK, HIS-hIKK1, pEGFP, pcHIS-SIVA1 o pcHIS-SIVA2. “+” Indica que el plásmido correspondiente se utilizó para la transfección, de lo contrario se indica “-”.
- El panel inferior de la Figura 1d es un análisis de transferencia Western del lisado celular total usando anticuerpos contra el marcador myc fusionado con NIK. Esta figura muestra que la cantidad de NIK en las células transfectadas se incrementa por la coexpresión con SIVA1 o SIVA2. La Figura 1e es un gráfico de barras que ilustra la mejora de la activación de NF- κ B mediada por NIK a través de SIVA coexpresado. El efecto de la hiperexpresión de NIK o de *aly* NIK, solo o junto con SIVA1 o SIVA2, sobre la expresión con VIH-luciferasa en células HEK293T, se evaluó 24 horas después de la transfección. Los valores son las medias obtenidas en dos experimentos en los que se cada prueba se llevó a cabo por triplicado. El gráfico muestra que SIVA es capaz de afectar a la función de NIK.
- 30 Las Figs. 2a-h ilustran la inducción tanto de la vía canónica como de la alternativa en linfocitos a través de CD70 (ligando de CD27) y el efecto de la falta de NIK sobre esta inducción.
- 35 La Figura 2a es un análisis de transferencia Western diseñado para detectar niveles de en el citoplasma de PBMC en reposo después de la aplicación de CD70 y niveles de p52 y RelB en el núcleo de PBMC en reposo después del tratamiento con CD70. Esta figura muestra una disminución rápida de I κ B α , así como la translocación de NF- κ B2/p52 (p52) y RelB a los núcleos.
- 40 La Figura 2b es un análisis de transferencia Western diseñado para detectar niveles de I κ B α en el citoplasma de PBMCs estimuladas y niveles de p100, p52 y RelB en el núcleo de PBMCs estimuladas después del tratamiento con CD70. Esta figura muestra una rápida disminución de I κ B α .
- La Figura 2c es un análisis de transferencia Western diseñado para detectar niveles de I κ B α en el citoplasma de células Raji y niveles de p100, p52, RelB y p65 en el núcleo de células Raji después del tratamiento con CD70. Esta figura muestra la degradación de I κ B α , así como la translocación nuclear de RelB y NF- κ B2/p52.
- 45 La Figura 2d es un análisis de transferencia Western diseñado para la detección de niveles de p100 y de p52 en el citoplasma de células Ramos normales y NIK^(MENOS) y niveles de p100, p52 y RelB en el núcleo de estas células después del tratamiento con CD70. Esta figura muestra la inducción de una translocación nuclear de RelB y NF- κ B2/p52 en células Ramos normales, así como una translocación nuclear retardada de p100 en células Ramos NIK^(MENOS). La Figura 2e es un análisis de transferencia Western diseñado para detectar niveles de I κ B α en el citoplasma de células Ramos normales y NIK^(MENOS) y niveles de p65 en el núcleo de estas células después del tratamiento con CD70. Esta figura muestra la degradación de I κ B α , así como una translocación nuclear de p65 en las células Ramos normales.
- 50 La Figura 2f muestra la inhibición de la síntesis de NIK por la expresión ARNsi de NIK.
- El panel superior de la Figura 2f representa un análisis de transferencia Western diseñado para la detección de nive-

les de NIK en células HEK293 que expresan transitoriamente NIK marcado con myc y cotransfectadas con pSUPER-NIK en proporciones de 1:1, 1:2, 1:3 y 1:5. Esta figura muestra que NIK está inhibido de manera eficaz.

5 El panel central de la Figura 2f representa un análisis de transferencia Western diseñado para la detección de niveles de NIK en células Ramos que expresan constitutivamente lentiviral-pSUPER-NIK (células NIK^(MENOS)) en comparación con células Ramos transducidas con lentiviral-GFP como testigo. Esta figura muestra que NIK está inhibido de manera eficaz.

El panel inferior de la Figura 2f muestra un análisis de transferencia Western diseñado para detectar niveles de NIK en células Ramos NIK^(MENOS) en las que se restableció la expresión de NIK expresando constitutivamente NIK marcado con myc. Esta figura muestra que se restableció la expresión de NIK.

10 La Figura 2g es un gráfico de barras que muestra la activación de la proteína cinasa C (PKC) inducida con CD70 en células Ramos normales (barras negras) y células Ramos NIK^(MENOS) (barras blancas). La activación de PKC se realizó en un lisado celular usando el sistema de ensayo de PKC Signatect en varios momentos (0, 15 y 30 minutos) después de la aplicación de CD70 a las células. Las barras representan la media de las pruebas por triplicado. Los niveles de CD27 en células Ramos normales y NIK^(MENOS) se muestran en el recuadro. Esta figura muestra que las
15 células Ramos NIK^(MENOS) expresan CD27 con niveles comparables a los de las células Ramos normales y manifiestan una medida normal de activación con proteína cinasa C (PKC) después de la activación con CD27. La Figura 2h es un análisis de transferencia Western diseñado para detectar niveles de IκBα en el citoplasma de células Ramos NIK^(MENOS) reconstituidas y niveles de p52 en el núcleo de estas células. Esta figura muestra que estas células recuperan la capacidad de responder a CD70 tanto con un aumento de p52 nuclear como con una disminución transitoria
20 de IκBα.

Las Figs. 3a-i muestran la inducción de la vía tanto la canónica como alternativa de NF-κB a través de CD40L, BLYS/BAFF, TNF, taspigargina o PMA y el efecto de la carencia de NIK sobre esta inducción.

25 La Figura 3a es un análisis de transferencia Western diseñado para la detección de niveles de p100, p52 y RelB en el núcleo de células Ramos normales y NIK^(MENOS) después del tratamiento con CD40L. Esta figura muestra una inducción de la translocación nuclear de p100, p52 y RelB en las células Ramos normales.

La Figura 3b es un análisis de transferencia Western diseñado para detectar niveles de IκBα en el citoplasma de células Ramos normales y NIK^(MENOS) y niveles de p65 en el núcleo de estas células después del tratamiento con CD40L. Esta figura muestra una rápida inducción de la translocación nuclear de p65 asociada con una disminución de IκBα en las células Ramos normales.

30 La Figura 3c es un análisis de transferencia Western diseñado para la detección de niveles de p100, p52 y RelB en el núcleo de células Ramos normales y NIK^(MENOS) después del tratamiento con BLYS. Esta figura muestra una inducción de la translocación nuclear de p52 y RelB en células Ramos normales.

35 La Figura 3d es un análisis de transferencia Western diseñado para detectar niveles de IκBα fosforilada en el citoplasma de células Ramos normales y NIK^(MENOS) y niveles de p65 en el núcleo de estas células después del tratamiento con BLYS. La figura muestra una rápida translocación nuclear de p65 asociada con la fosforilación de IκBα con ningún cambio visible en sus niveles celulares en las células Ramos normales.

40 La Figura 3e es un análisis de transferencia Western diseñado para la detección de niveles de p100, NS, p52 y RelB en el núcleo de células Ramos normales y NIK^(MENOS) después del tratamiento con TNF. Esta figura muestra una inducción de la translocación nuclear de p100 y RelB pero solo un ligero aumento de p52 nuclear en las células Ramos normales y una translocación nuclear de p100 y RelB en las células Ramos NIK^(MENOS).

La Figura 3f es un análisis de transferencia Western diseñado para la detección de niveles de IκBα en el citoplasma de células Ramos normales y NIK^(MENOS) y niveles de p65 en el núcleo de estas células después del tratamiento con TNF. La figura muestra la inducción de la degradación de IκBα y la translocación nuclear de p65 en las células Ramos normales y NIK^(MENOS).

45 La Figura 3g es un análisis por inmunoprecipitación con RelB de diversas proteínas NF-κB procedentes de extractos nucleares de las células Ramos, 15 minutos y 4 horas después de la aplicación de TNF o CD70 a las células. Se detectaron niveles de p100, NS y p52 mediante transferencia Western. Esta figura muestra que CD70 potencia la acumulación nuclear de RelB:p52 y RelB:p100 mientras que TNF induce el aumento de los niveles nucleares solo de RelB:p100

50 La Figura 3h es un análisis de transferencia Western diseñado para detectar niveles de IκBα en el citoplasma de células Ramos normales y NIK^(MENOS) como respuesta a taspigargina o 4β-forbol-12-miristato-13-acetato (PMA). Esta figura muestra que el agotamiento de NIK no tiene ningún efecto sobre la degradación de IκBα.

55 La Figura 3i es un análisis de transferencia Western diseñado para la detección de niveles basales de p100, p52, p65, RelB, c-Rel e IκBα en células Ramos normales y NIK^(MENOS). Esta figura muestra una marcada reducción de p52 basal y una disminución significativa de RelB y c-RelB, así como una cierta reducción de p100 e IκBα en células

Ramos NIK^(MENOS) en comparación con las células Ramos normales.

Las Figs. 4a-d muestran que la inducción de la degradación de IκBα a través de CD40L y BlyS, y no con TNF, está bloqueada por anticuerpos α-pNIK contra el bucle de activación fosforilado.

5 La Figura 4a es un autorradiograma de la proteína fosforilada en comparación con un análisis de transferencia Western de los niveles de NIK en las mismas muestras. La autofosforilación de myc-NIK inmunoprecipitaba desde células HEK293T transfectadas transitoriamente, en presencia de 0 μg, 0,5 μg, 1,0 μg y 2 μg de anticuerpos α-pNIK o con 2 μg de IgG testigo. Esta figura muestra que α-pNIK bloquea eficazmente la función cinasa *in vitro* de NIK. La Figura 4b muestra la introducción de anticuerpos en células Ramos utilizando un reactivo de transfección de proteínas

10 La Figura 4b es una fotografía de la absorción de inmunoglobulina marcada con FITC en células Ramos, determinada por microscopía de fluorescencia en diversos momentos (0, 1, 4 y 8 horas) después de la transfección. Esta figura muestra que el tratamiento de células Ramos con un kit de transfección de proteínas permite una introducción eficaz, aunque transitoria, de inmunoglobulinas en las células.

15 La Figura 4c es un análisis de transferencia Western diseñado para la detección de la degradación de IκBα inducida por CD70, CD40L o TNF en células Ramos con anticuerpo α-pNIK. Esta figura muestra que el anticuerpo α-pNIK bloquea eficazmente la inducción de la degradación de IκBα a través de CD70 o CD40L.

La Figura 4d es un análisis de transferencia Western diseñado para detectar la degradación de IκBα a través de CD40L en células BJAB con anticuerpo α-pNIK. Esta figura muestra que CD40L induce la degradación de IκBα en estas células y esta inducción se reduce significativamente en presencia de anticuerpos α-pNIK.

20 Las Figs. 5a-d muestran el efecto de CD70 o TNF sobre la incorporación del señalosoma IKK y la activación del mismo en células Ramos normales y NIK^(MENOS).

25 La Figura 5a (panel superior) es un análisis cinético de la actividad de fosforilación de IκBα *in vitro* del señalosoma IKK en células Ramos, aisladas por inmunoprecipitación utilizando anticuerpos de IKK1, en comparación con un análisis de transferencia Western (panel inferior) diseñado para detectar niveles celulares de IκBα, en los momentos indicados (0, 15 minutos o 4 horas) después de la aplicación de CD70 o TNF a células Ramos normales y NIK^(MENOS). Esta figura muestra que tanto TNF como CD70 mejoran la función cinasa *in vitro* del señalosoma IKK en células Ramos normales. En células Ramos carentes de NIK, la activación inducida por CD70 del señalosoma estaba bloqueada y no había fosforilación *in vitro* de IκB, mientras que la activación inducida con TNF del señalosoma no se vio afectada en absoluto.

30 La Figura 5b muestra la autofosforilación de las IKKα y la fosforilación de NEMO en la prueba de cinasa *in vitro* del señalosoma IKK, aislado 15 minutos después de la aplicación de CD70 o TNF a células Ramos normales y NIK^(MENOS). Esta figura muestra que tanto TNF como CD70 mejoran la autofosforilación de las IKKs y la fosforilación de NEMO en células Ramos normales. El efecto de CD70 sobre el señalosoma se anula en las células Ramos NIK^(MENOS).

35 La Figura 5c muestra la incorporación de IKK1, IKK2 y NEMO a través de la inducción con CD70 o TNF en células Ramos normales y NIK^(MENOS). El panel superior de la Figura 5c muestra la actividad de fosforilación de IκBα *in vitro* y la presencia de los componentes del señalosoma IKK en los complejos del receptor asociados con CD27 (izquierda) y el receptor de TNF p55 (derecha) aislados a partir de células Ramos normales y NIK^(MENOS) antes y después de la estimulación con CD70 o TNF durante 15 min.

40 El panel inferior de la Figura 5c muestra la actividad de fosforilación de IκBα *in vitro* y el análisis de transferencia Western diseñado para detectar los señalosomas IKK aislados a partir de células Ramos en los mismos momentos que se aislaron los complejos de receptores. Las cantidades de IKK1 introducidas en los ensayos de cinasa se correspondían a las que se muestran en esta figura. Esta figura muestra que TNF induce la incorporación de los tres componentes del señalosoma (IKK1, IKK2 y NEMO), en aproximadamente la misma proporción que la que se encuentra en el complejo que forman en el citoplasma, tanto en células Ramos normales como NIK^(MENOS). CD70 induce la incorporación solo de IKK1 en las células Ramos normales.

45 La Figura 5d muestra una actividad de fosforilación *in vitro* de IκBα y un análisis de transferencia Western diseñado para detectar la presencia de componentes del señalosoma IKK en los complejos de receptores asociados con CD27 y preparaciones de señalosoma aisladas a partir de PBMC en reposo antes y después de la estimulación con CD70 durante 15 min. Esta figura muestra que CD70 induce la incorporación selectiva de IKK1.

50 Las Figs. 6 a-d muestran que CD70 induce la incorporación del señalosoma IKK seguida por una incorporación selectiva de IKK1 a CD27 de una manera que depende de la función cinasa de NIK, así como la incorporación de NIK independientemente de su función cinasa.

55 La Figura 6a muestra un análisis cinético de la incorporación de TRAF2 y RIP, los componentes del señalosoma IKK (IKK1, IKK2 y NEMO), los componentes del complejo canónico de NF-κB (IκBα, p65 y p50), y p100 a los complejos

del receptor de CD27 y TNF p55 en células Ramos en varios momentos después de la aplicación de CD70 o de TNF, en comparación con la composición del señalosoma IKK citoplásmico (aislado, antes de la estimulación, mediante el uso de un anticuerpo para NEMO; derecha), y con los niveles celulares de IκBα (abajo).

5 Las Figuras 6b, 6c muestran actividad de fosforilación de IκB *in vitro* y la presencia de componentes del señalosoma IKK en los complejos de receptores y señalosomas citoplasmáticos. La Figura 6b muestra complejos de CD27 y preparaciones de señalosomas aisladas a partir de PBMC en reposo antes de la estimulación, y después de la estimulación con CD27 durante 20 min.

10 La Figura 6c muestra los complejos de receptores asociados con CD27 (izquierda) y el receptor de TNF p55 (derecha) aislados a partir de células Ramos testigo y NIK, antes de la estimulación y después de la estimulación con CD70 o TNF durante 20 min.

La Figura 6d muestra la comparación de las cinéticas de incorporación de NIK e IKK1 a los complejos de receptores de CD27 y TNF p55 en varios momentos después de la aplicación de CD70 o TNF a células NIK restablecidas con tipo silvestre o un mutante de NIK enzimáticamente inactivo (KD-NIK).

15 La Fig. 7 muestra un modelo especulativo de los mecanismos que inician la activación de NF-κB a través de TNF (panel izquierdo) y CD70 (panel derecho). La figura presenta un resumen de los eventos moleculares que conducen desde la activación del receptor de TNF p55 a través de TNF (izquierda) y del receptor CD27 a través de CD70 (derecha), a la activación de NF-κB. TNF induce la incorporación independiente de NIK, de los tres componentes principales del señalosoma a su receptor de una manera que depende de la interacción de estos componentes con TRAFs y RIP. Esta incorporación inicia solo la vía canónica. CD70 induce la incorporación y la ubiquitinación masiva de TRAF2, pero no de RIP. También induce la incorporación de NIK y, de una manera que depende de la función 20 cinasa de NIK, induce también la incorporación primero de todo el señalosoma y luego solo de IKK a CD27. La incorporación de todo el señalosoma a este receptor y la consiguiente activación de IKK1 en el mismo a través de NIK, podría ser el mecanismo para la iniciación a través de este receptor de la vía canónica, y la posterior incorporación de IKK1 podría ser el mecanismo para la iniciación, a través de tal receptor de la vía alternativa. Las líneas discontinuas representan la inducción de p100 y RelB después de la activación de la vía canónica a través de TNF y CD70 y la consiguiente translocación del complejo p100:RelB al núcleo.

Descripción de las realizaciones preferidas

30 La presente descripción se refiere al uso de agentes capaces de aumentar o disminuir la actividad de NIK en trastornos inmunes causados o agravados por una activación anormal de NF-κB a través de la vía canónica. En otro aspecto, la descripción se refiere al uso de un agente capaz de aumentar o disminuir la formación del complejo NIK-SIVA en el tratamiento de trastornos inmunes.

La presente descripción se refiere también a métodos para el escrutinio (identificación y/o selección) de moléculas capaces de modular (aumentando o disminuyendo) la actividad de NIK, y a las moléculas que se pueden obtener a través de los métodos de la misma.

35 Los principios y el funcionamiento de la presente invención se pueden entender mejor haciendo referencia a los dibujos y a las descripciones adjuntas.

40 La familia de factores de transcripción de NF-κB está asociada con un gran número de funciones biológicas incluyendo la respuesta celular inflamatoria e inmune, la regulación del ciclo celular, la diferenciación y la protección de la apoptosis [Baeuerle y Baltimore, *Cell*, 87:13-20, (1996); Ghosh, et al., *Annu. Rev. Immunol.* 16:225-260, (1998)]. La mayoría de estas actividades se han conocido a partir de estudios de la función de NF-κB en la regulación de la supervivencia y la activación de linfocitos.

45 Está bien demostrado que la activación controlada de NF-κB es esencial para las respuestas inmunes innatas y adaptativas normales, y que una regulación anormal del señalosoma de NF-κB en linfocitos, tiene como resultado el desarrollo de enfermedades que van desde la inflamación crónica y la autoinmunidad hasta el linfoma [Ruland, y Mak, *Semin. Immunol.* 3:177-83, (2003)]. Por lo tanto, la detención de las señales de NF-κB mediante el bloqueo de las interacciones ligando-receptor permite una supresión eficaz de las actividades de señalización que están asociadas con la activación y el crecimiento de linfocitos T y B, la inflamación, la proliferación de fibroblastos y la muerte celular. Por lo tanto, la regulación de las actividades de NF-κB se puede probar que es beneficiosa para el tratamiento de diversos trastornos, que están asociados con las actividades de señalización celular descritas anteriormente.

50 La activación de NF-κB es el resultado de la activación de al menos una de las dos vías paralelas de señalización, denominadas canónica y alternativa, que se han descrito con detalle en la sección anterior de la Técnica anterior.

55 Uno de los elementos clave en la activación de NF-κB es la cinasa que induce NF-κB (NIK). Aunque esta proteína ha estado implicada inicialmente en la activación de la vía canónica de NF-κB como respuesta a múltiples agentes inductores [N. L. Malinin, M. P. Boldin, A. V. Kovalenko, D. Wallach, *Nature* 385, 540-4 (1997); H. Akiba et al., *J. Biol. Chem.* 273, 13353-8 (1998)], estos estudios de la técnica anterior a los que se hace referencia, se basan en la capacidad de mutantes de NIK hiperexpresados para bloquear la señalización, un enfoque que ahora se considera poco

fiable como es evidente por el hecho de que el mismo enfoque experimental proporcionaba una evidencia de que NIK actúa en la activación de TNF de la vía canónica, un hallazgo que desde entonces se ha considerado incorrecto [L. Yin et al., *Science* 291, 2162-5. (2001)].

5 Por lo tanto, los estudios más recientes refutan las primeras conclusiones y proporcionan pruebas abrumadoras de que NIK no participa en la activación de la vía canónica y que los estudios que sugerían que NIK participa en la señalización de CD27 eran erróneos [S. Ghosh, M. Karin, *Cell* 109 Supl, pág. 81-96 (abril, 2002); E. Dejardin et al., *Immunity* 17, 525-35 (oct, 2002) y J. L. Pomerantz, D. Baltimore, *Mol Cell* 10, 693-5 (oct, 2002).

10 Por lo tanto, aunque la inhibición de NIK se ha sugerido como un posible enfoque de agente terapéutico en el tratamiento del síndrome de respuesta inflamatoria sistémica, es muy poco probable que agentes inhibidores de NIK se utilicen como fármacos eficaces, en enfermedades que están causadas o agravadas por la activación de NF-κB a través de la vía canónica, ya que en la actualidad la comunidad científica duda claramente del papel de NIK en la activación de la vía canónica.

15 De acuerdo con la presente invención, se ha establecido que NIK, en contraste con las enseñanzas de la técnica anterior, participa en la vía de activación canónica de NF-κB. Además, se ha encontrado que NIK también participa en la activación de la vía alternativa de NF-κB a través de la señalización de CD70/CD27.

Los presentes hallazgos establecen un papel para NIK en la activación de NF-κB y por lo tanto proporcionan el motivo para utilizar diversos agentes dirigidos a NIK en el tratamiento de diversas enfermedades inmunes, que están causadas o agravadas por la activación de NF-κB.

20 Tal y como se ilustra en la sección de Ejemplos a continuación, los presentes inventores han establecido que NIK tiene un papel crucial en la activación de la vía alternativa, así como de la vía canónica a través del ligando de CD40 (CD40L), BLyS/BAFF y CD27. Además, se encontró que NIK se une a SIVA, una proteína asociada con CD27 (Prasad et al., 1997), y de este modo media en las vías de activación tanto canónica como alternativa de NF-κB como respuesta a este receptor. Aunque NIK no se requería para la activación del señalosoma a través del receptor de TNF p55, la activación del señalosoma con CD27 dependía de NIK. Por otra parte, a diferencia de la activación a través del receptor de TNF p55, la activación con CD27, en una manera dependiente de NIK, inducía la incorporación selectiva de IKK1 a este receptor, un proceso que podría ser el evento inicial en la activación dependiente de NIK de ambas vías de NF-κB a través de CD27.

30 La explicación de las vías alternativa y canónica que activan NF-κB, que es posible con el presente estudio (véase la Figura 6), permite el diseño de terapias refinadas destinadas a bloquear específicamente los efectos nocivos de una actividad no regulada de los transductores y efectores de estas vías.

Por lo tanto, la presente invención proporciona un segundo uso médico para el tratamiento de un trastorno inmune en un individuo, tal y como se define en las reivindicaciones.

35 Tal y como se utiliza en esta memoria, la expresión "trastorno inmune" se refiere a un trastorno asociado con una respuesta inmune insuficiente o excesiva, específica de antígeno o no específica de antígeno (es decir, innata), en la que hay una actividad anormal de al menos una proteína (descrita adicionalmente más adelante) que participa en una señalización de NF-κB dependiente de NIK (es decir, las vías canónica y alternativa, como se ilustra en la Figura 6). Ejemplos de tales trastornos incluyen, pero no se limitan a, mieloma múltiple (MM), síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), síndrome de Sjogren (SS), leucemia linfocítica crónica de linfocitos B (LLC-B), lupus eritematoso sistémico, enfermedad de colon inflamatorio, síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SRIS), síndrome de disfunción multiorgánica (SDMO) y síndrome de dificultad respiratoria aguda (SDRA), enfermedad de Addison, alergias, espondilitis anquilosante, amiloidosis, anemia, asma, aterosclerosis, anemia hemolítica autoinmune, tiroiditis autoinmune, bronquitis, colecistitis, dermatitis de contacto, enfermedad de Crohn, dermatitis atópica, dermatomiositis, diabetes mellitus, enfisema, eritema nudoso, gastritis atrófica, glomerulonefritis, síndrome de Goodpasture, gota, enfermedad de Graves, tiroiditis de Hashimoto, hipereosinofilia, síndrome de intestino irritable, esclerosis múltiple, miastenia gravis, inflamación del miocardio o pericardio, osteoartritis, osteoporosis, pancreatitis, polimiositis, artritis reumatoide, esclerodermia, anafilaxia sistémica, esclerosis sistémica, colitis ulcerosa, síndrome de Werner y complicaciones del cáncer, hemodiálisis y circulación extracorpórea; infecciones víricas, bacterianas, fúngicas, parasitarias, protozoarias y helmínticas; y trauma.

50 Tal y como se utiliza en esta memoria, el término "tratar" se refiere a la prevención, curación, reversión, atenuación, alivio, minimización, inhibición o detención de los efectos perjudiciales de un trastorno inmune descrito anteriormente.

Tal y como se utiliza en esta memoria, el término "individuo" se refiere a un mamífero, preferiblemente un ser humano.

55 De acuerdo con la presente descripción, a un individuo se le puede administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente capaz modular la actividad de un gen diana o de un producto génico diana (es decir, ARN o proteína) que participa en una señalización de NF-κB dependiente de NIK, tratando de este modo el trastorno inmune en el individuo.

Tal y como se utiliza en esta memoria, la expresión "modular la actividad" se refiere a aumentar o disminuir una actividad catalítica intrínseca (por ejemplo, la actividad cinasa de NIK), interaccionar con una actividad (por ejemplo, la interacción de NIK-SIVA tal y como se ilustra en el Ejemplo 1 de la sección de Ejemplos) o la expresión (por ejemplo, la expresión de NIK tal y como se ilustra en el Ejemplo 2 de la sección de Ejemplos) del gen diana o del producto génico diana.

Se puede utilizar como dianas una variedad de genes y sus productos de acuerdo con la presente descripción (véase la Figura 6). Ejemplos de tales genes diana se enumeran a continuación junto con ejemplos de trastornos inmunes que los involucran.

BLYS - BLYS se une a la proteína del receptor de BAFF y favorece la supervivencia de linfocitos B maduros y la respuesta de los linfocitos B. La proteína se expresa abundantemente en los leucocitos de sangre periférica y se expresa específicamente en los monocitos y macrófagos. También se encuentra en el bazo, los ganglios linfáticos, la médula ósea, los linfocitos T y las células dendríticas. La participación del estimulador de los linfocitos B (BLYS) en el mieloma múltiple (MM) se mostró en varios aspectos. Se observó que las células del MM expresaban receptores de BLYS y que BLYS, a su vez, modulaba la capacidad proliferativa y la supervivencia de las células de MM. La proteína BLYS también se encontró en la médula ósea de pacientes con MM [Novak et al., Blood. Publicación electrónica previa a la edición impresa (2003)]. También se observó que los niveles de BLYS junto con globulina aumentaban a medida que avanzaba la enfermedad de VIH [Rodríguez et al., AIDS. 17:1983-1985 (2003)]. La participación de la molécula de BLYS en otra enfermedad autoinmune, el síndrome de Sjogren (SS), se mostró por su capacidad para mediar en la activación policlonal de los linfocitos B, y su papel en la producción de autoanticuerpos. También se mostró que en pacientes humanos con SS, el nivel de BLYS se correlaciona con el nivel de autoanticuerpos. Por lo tanto, BLYS puede desempeñar un papel en la activación de linfocitos B específicos autorreactivos B y modular el nivel de la producción de autoanticuerpos que son el sello distintivo de la enfermedad [Mariette et al., Ann. Rheum. Dis. 62:168-171, (2003)]. Otra enfermedad, en la que BLYS ha mostrado tener un papel, es el lupus eritematoso sistémico. La hiperexpresión de BLYS en ratones conduce a una enfermedad sistémica similar a lupus eritematoso ("SLE-like"). La hiperexpresión de BLYS también es común en el LES humano. El tratamiento de ratones propensos a LES con un antagonista de BLYS mejora la progresión de la enfermedad e incrementa la supervivencia [Stohl, Arthritis Res. Ther. 5:136-138, (2003)]. Un efecto de BLYS se mostró en leucemia linfocítica crónica de linfocitos B (LLC-B), una enfermedad caracterizada por la acumulación de linfocitos B CD5(+) en la periferia y la médula ósea. Todas las células estudiadas de pacientes con LLC-B, expresaban uno o varios de los 3 receptores conocidos para BLYS. Las células de LLC-B procedentes de un subconjunto de pacientes expresan de forma aberrante BLYS y ARNm de APRIL, mientras que estas moléculas no eran detectables en los linfocitos B normales. Además, BLYS se encontró que protegía las células de LLC-B de la apoptosis y mejoraba la supervivencia celular [Novak et al., Blood. 100:2973-2979, (2002)]. Heterotrímeros de dos proteínas, APRIL y BLYS se encontraron en las muestras de suero de pacientes con enfermedades reumáticas sistémicas de base inmunitaria, implicando también un papel de estas moléculas en las enfermedades reumáticas [Roschke et al., J. Immunol. 169:4314-4321, (2002)]. El método de la presente invención prevé la regulación por disminución de la señalización de BLYS a través de la vía de NF- κ B dependiente de NIK, para superar los trastornos inmunes descritos anteriormente.

CD40L - Este ligando puede activar la señalización de NF- κ B dependiente de NIK (véase el Ejemplo 6 de la sección de Ejemplos) a través de la unión al receptor de CD40. CD40L se mostró que estaba implicado en la infección por VIH. Se sugirió que revertir la carencia relativa de CD40L observada en la infección por VIH puede facilitar el restablecimiento inmune en el SIDA [Kornbluth, J. Leukoc. Biol. 68:373-382, (2000)]. El método de la presente invención prevé la regulación al alza de la señalización de CD40L a través de la vía de NF- κ B dependiente de NIK para superar los trastornos inmunes descritos anteriormente.

CD27 - La expresión de CD27, a través de células de la leucemia linfocítica crónica de linfocitos B (LLC-B) ha mostrado que influye sobre el resultado clínico de esta enfermedad [Bannerji y Byrd, Curr. Opin. Oncol. 12:22-29, (2000)]. También se observó que CD27 tiene una expresión heterogénea en pacientes con mieloma múltiple. Se observó que una expresión baja de CD27 se correlaciona con pacientes con una enfermedad de alto riesgo [Guikema et al., Br. J. Haematol. 121:36-43, (2003)]. CD27 también se encontró en pacientes con lupus eritematoso sistémico en relación con el recuento de linfocitos y el curso de la enfermedad [Swaak et al., Clin. Rheumatol. 14:293-300, (1995)]. Por lo tanto, la presente descripción contempla una regulación al alza o a la baja seleccionada de la señalización de CD27 a través de la vía de NF- κ B dependiente de NIK, según el trastorno inmune que se va a tratar.

NIK - La "cinasa que induce NF- κ B" se une a SIVA, TRAF2, TRAF5, TRAF6, IKKA Y NF- κ B 2/P100. Esta proteína se expresa débilmente en el testículo, intestino delgado, bazo, timo, leucocitos de sangre periférica, próstata, ovario y colon.

SIVA - Una regulación al alza de CD27 y SIVA se mostró en la disfunción renal (por ejemplo, tejido renal isquémico y lesionado). La expresión de ambas proteínas se observó en poblaciones celulares conocidas porque mueren por apoptosis o necrosis [Schumer et al., Am. J. Pathol. 140:831-838, (1992); Shimzu y Yamanaka, Virchows Archiv. B Cell Pathol. 64:171-180; (1993), Basile et al., Am. J. Physiol. 272: F640-F647, (1997)]. Se sugirió que las estrategias dirigidas a la modificación de la apoptosis renal mediada por CD27, tendrían un impacto positivo sobre el curso de la lesión renal isquémica aguda [Padanilam et al., Kidney Int. 54:1967-1975, (1998)]. Por lo tanto, la presente descripción prevé la regulación a la baja de la señalización de SIVA a través de la vía de NF- κ B dependiente de NIK, para

superar los trastornos renales descritos anteriormente. La interacción de SIVA con la proteína de la cápsida VP2 del virus Coxsackie B3 (CVB3) se mostró que sustentaba la enfermedad causada por CVB3 [Henke (2003) Clin. Exp. Med. 2(4):192-6]. Por tanto, la presente descripción prevé la regulación a la baja de la señalización de SIVA a través de la vía de NF- κ B dependiente de NIK para superar trastornos víricos. La ausencia de interacciones SIVA-CD27 estaba implicada en la génesis de mielomas, lo que sugiere una regulación al alza de la señalización de SIVA-CD27 a través de la vía de NF- κ B dependiente de NIK para superar la génesis de mielomas [Katayama (2003) Br J Haematol. 120(2):223-34].

Tal y como se ha mencionado anteriormente en este documento, el tratamiento del trastorno inmune de acuerdo con la presente descripción, se efectúa proporcionando al individuo un agente que es capaz de aumentar (es decir, regular al alza) o disminuir (es decir, regular a la baja) la actividad de al menos un gen diana o un producto génico diana, tal como se ha descrito anteriormente en este documento.

Un agente capaz de regular al alza la expresión de un gen diana de la presente descripción, puede ser una secuencia de polinucleótidos exógena, diseñada y construida para expresar al menos una porción funcional del gen diana de la presente descripción. Por consiguiente, la secuencia de polinucleótidos exógena puede ser una secuencia de ADN o ARN que codifica una molécula de CD27 (nº de orden de GenBank NM_001242), CD40L (nº de orden de GenBank NM_000074), BLyS (nº de orden de GenBank NM_006573), SIVA (SIVA1 y SIVA2, nº de orden de GenBank NM_006427 y NM_021709, respectivamente), o NIK (nº de orden de GenBank NM_003954), capaz de modular el trastorno inmune.

Así, por ejemplo, para expresar NIK exógena en células de mamífero, una secuencia de polinucleótidos que codifica NIK (SEQ ID NO: 1) se liga preferiblemente a una estructura artificial de ácido nucleico adecuada para la expresión celular en mamíferos. Tal estructura artificial de ácido nucleico incluye una secuencia promotora para dirigir la transcripción de la secuencia de polinucleótidos en la célula, de una manera constitutiva o inducible. Un promotor adecuado puede ser, por ejemplo, un promotor obtenido a partir de vectores de lentivirus (por ejemplo, pSUPER) que es capaz de dirigir la expresión de NIK en los linfocitos B (véase el Ejemplo 2). La estructura artificial de ácido nucleico de la presente descripción puede incluir además secuencias de polinucleótidos adicionales, tales como, por ejemplo, secuencias que codifican marcadores de selección o polipéptidos informadores, secuencias que codifican un origen de replicación en bacterias, secuencias que permiten la traducción de varias proteínas a partir de un único ARNm (IRES) como para dirigir la expresión simultánea de NIK y SIVA para obtener mayores niveles de expresión de cada uno y, por ello, niveles de activación de NF- κ B más elevados (véase el Ejemplo 1 de la sección de Ejemplos), secuencias para la integración genómica de la región que codifica el polipéptido promotor quimérico y/o secuencias incluidas generalmente en un vector de expresión de mamífero tal como pcDNA3, pcDNA3.1(+/-), pZeoSV2(+/-), pSecTag2, pDisplay, pEF/myc/cyto, pCMV/myc/cyto, pCR3.1, que están disponibles en Invitrogen, pCI que está disponible en Promega, pBK-RSV y pBK-CMV que están disponibles en Stratagene, pTRES que está disponible en Clontech, y sus derivados.

Se apreciará que la estructura artificial de ácido nucleico se puede administrar al individuo empleando cualquier modo de administración adecuada, tal como se describe a continuación (es decir, terapia génica *in vivo*). Alternativamente, la estructura artificial de ácido nucleico se introduce en una célula adecuada a través de un vehículo/método de entrega génica apropiado (transfección, transducción, recombinación homóloga, etc.) y un sistema de expresión según sea necesario y, a continuación, las células modificadas se expanden en cultivo y se devuelven al individuo (es decir, terapia génica *ex vivo*).

Las técnicas de transferencia de ácido nucleico que se prefieren actualmente *in vivo* incluyen la transfección con estructuras artificiales víricas o no víricas, tales como adenovirus, lentivirus, virus del Herpes simple I, o virus adenoasociado (VAA) y sistemas basados en lípidos. Los lípidos útiles para la transferencia del gen mediada por lípidos son, por ejemplo, DOTMA, DOPE y DC-Cho1 [Tonkinson et al., Cancer Investigation, 14(1): 54-65 (1996)]. Las estructuras artificiales más preferidas para uso en terapia génica son virus, más preferentemente adenovirus, VAA, lentivirus o retrovirus. Una estructura artificial vírica tal como una estructura artificial retrovírica incluye al menos un promotor/potenciador de la transcripción o un elemento(s) que define un locus, u otros elementos que controlan la expresión génica a través de otros medios tales como corte y empalme alternativo, exportación de ARN nuclear o modificación postraduccional del mensajero. Tales estructuras artificiales de vectores también incluyen una señal de empaquetamiento, repeticiones terminales largas (LTRs) o porciones de las mismas, y sitios de unión al cebador de cadena positiva y negativa, apropiados para el virus utilizado, a menos que ya está presente en la estructura artificial vírica. Además, tal estructura artificial incluye típicamente una secuencia señal para la secreción del péptido desde una célula hospedadora en la que está ubicado. Preferiblemente, la secuencia señal para este fin es una secuencia señal de mamífero, o la secuencia señal de las variantes de polipéptidos de la presente descripción. Opcionalmente, la estructura artificial también puede incluir una señal que dirige la poliadenilación, así como uno o varios sitios de restricción y una secuencia de terminación de la traducción. A modo de ejemplo, tales estructuras artificiales incluirán típicamente una LTR 5', un sitio de unión a ARNt, una señal de empaquetamiento, un origen de síntesis de una segunda cadena de ADN y una LTR 3' o una porción de la misma. Se pueden utilizar otros vectores que son no víricos, tales como lípidos catiónicos, polilisina y dendrímeros.

Un agente capaz de regular positivamente un gen diana de la presente descripción también puede ser cualquier compuesto que es capaz de incrementar la transcripción y/o la traducción de un ADN endógeno o un ARNm que

codifica un gen diana de la presente descripción. Por ejemplo, PHA se puede utilizar para incrementar CD27 y CD70. Además anticuerpos anti-CD2 y anti-CD3 se pueden utilizar para aumentar los niveles de CD27 (de Jong et al.) mientras que la expresión de CD40L se puede utilizar para aumentar los niveles de CD70 (Hintzen et al.). Alternativa o adicionalmente, la regulación al alza se puede efectuar administrando al individuo al menos una diana de este tipo, tal y como se ha descrito anteriormente en este documento. Tales proteínas se pueden sintetizar bioquímicamente, como mediante el uso de técnicas de fase sólida convencionales. Estos métodos incluyen métodos exclusivos de síntesis en fase sólida, métodos de síntesis en fase sólida parciales, condensación de fragmentos, síntesis en solución clásica. Estos métodos se utilizan preferentemente cuando el péptido es relativamente corto (es decir, 10 kDa) y/o cuando no se puede producir por técnicas recombinantes (es decir, no están codificados por una secuencia de ácido nucleico) y por lo tanto implican una técnica química diferente.

Los procedimientos de síntesis peptídica en fase sólida son bien conocidos en la técnica y están descritos adicionalmente por John Morrow Stewart y Janis Dillaha Young, *Solid Phase Peptide Syntheses* (2ª ed., Pierce Chemical Company, 1984).

Los péptidos sintéticos se puede purificar mediante cromatografía líquida preparativa de alto rendimiento [Creighton T. (1983), *Proteins, structures and molecular principles*. WH Freeman and Co. Nueva York] y cuya composición se puede confirmar mediante la secuenciación de aminoácidos.

En casos en los que se desean grandes cantidades de los péptidos de la presente descripción, las proteínas de la presente descripción se pueden generar usando técnicas recombinantes tales como las descritas para la producción a gran escala de CD70 recombinante en células HEK293T (véase el Ejemplo 2 de la sección de Ejemplos que sigue a continuación) y por Bitter et al., (1987) *Methods in Enzymol.* 153:516-544, Studier et al. (1990) *Methods in Enzymol.* 185:60-89, Brisson et al. (1984) *Nature* 310:511-514, Takamatsu et al. (1987) *EMBO J.* 6:307-311, Coruzzi et al. (1984) *EMBO J.* 3:1671-1680 y Brogli et al., (1984), *Science* 224:838-843, Gurley et al. (1986) *Mol. Celular. Biol.* 6:559-565 y Weissbach & Weissbach, 1988, *Methods for Plant Molecular Biology*, Academic Press, Nueva York, Sección VIII, págs. 421-463.

Se apreciará que las dianas proteicas de la presente descripción también se pueden obtener comercialmente. Por ejemplo, BAFF recombinante (nº de cat. PF088) y CD40L recombinante (nº de cat. PF091) están disponibles en Merck Biosciences.

Tal y como se mencionó anteriormente, el tratamiento de trastornos inmunes de acuerdo con la presente descripción, también se puede efectuar regulando a la baja un gen diana o su producto, tal como se ha descrito anteriormente en este documento.

Un ejemplo, de un agente capaz de regular a la baja un producto génico diana de la presente invención, es un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo capaz de unirse específicamente al producto génico diana e inhibir la unión del mismo a moléculas efectoras. Por ejemplo, los anticuerpos dirigidos a las coordenadas de aminoácidos 123-175 de SIVA1 (SEQ ID NO: 3) o a las coordenadas de aminoácidos 58-110 de SIVA2 (SEQ ID NO: 4) evitarán la formación del complejo NIK-SIVA para reducir de ese modo la señalización de NF- κ B. Alternativamente, los anticuerpos de la presente descripción todavía pueden conservar la unión del producto génico diana con moléculas efectoras de los mismos, pero inhibir su actividad catalítica. Un anticuerpo de este tipo dirigido contra el bucle de activación de NIK fosforilado se describe en el Ejemplo 4 de la sección de Ejemplos que sigue a continuación.

Preferiblemente, el anticuerpo se une específicamente al menos a un epítipo del producto génico diana. Tal y como se usa en esta memoria, el término "epítipo" se refiere a cualquier determinante antigénico sobre un antígeno al que se une el paratopo de un anticuerpo.

Los determinantes epitópicos normalmente consisten en agrupamientos de superficies químicamente activas de moléculas tales como aminoácidos o cadenas laterales de hidratos de carbono y por lo general tienen características de estructuras tridimensionales, así como características de carga específicas.

El término "anticuerpo" tal y como se usa en esta invención, incluye moléculas intactas así como fragmentos funcionales de las mismas, tales como Fab, F(ab')₂ y Fv, que son capaces de unirse a macrófagos. Estos fragmentos de anticuerpos funcionales se definen como sigue: (1) Fab, el fragmento que contiene un fragmento monovalente que se une a antígeno de una molécula de anticuerpo, se puede producir mediante digestión del anticuerpo completo con la enzima papaína, para producir una cadena ligera intacta y una porción de una cadena pesada; (2) Fab', el fragmento de una molécula de anticuerpo que se puede obtener tratando un anticuerpo completo con pepsina, seguido por reducción, para producir una cadena ligera intacta y una porción de la cadena pesada; se obtienen dos fragmentos Fab' por molécula de anticuerpo; (3) (Fab')₂, el fragmento del anticuerpo que se puede obtener tratando un anticuerpo completo con la enzima pepsina sin una reducción posterior; F(ab')₂ es un dímero de dos fragmentos Fab' que se mantienen unidos por dos enlaces disulfuro; (4) Fv, definido como un fragmento modificado genéticamente que contiene la región variable de la cadena ligera y la región variable de la cadena pesada, expresadas como dos cadenas; y (5) Anticuerpo de cadena sencilla ("SCA"), una molécula modificada genéticamente que contiene la región variable de la cadena ligera y la región variable de la cadena pesada, unidas por un enlazador polipeptídico adecuado como una molécula de cadena sencilla fusionada genéticamente.

Los métodos para producir anticuerpos policlonales y monoclonales, así como fragmentos de los mismos son bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Harlow y Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York, 1988)

Los fragmentos de anticuerpo de acuerdo con la presente invención se pueden preparar mediante hidrólisis proteolítica del anticuerpo o mediante expresión en *E. coli* o en células de mamífero (por ejemplo, cultivo de células de ovario de hámster chino o de otros sistemas de expresión de proteínas) del ADN que codifica el fragmento. Los fragmentos de anticuerpo se pueden obtener por digestión con pepsina o papaína de anticuerpos completos por métodos convencionales. Por ejemplo, los fragmentos de anticuerpo se pueden producir mediante escisión enzimática de anticuerpos con pepsina, para proporcionar un fragmento 5S denominado F(ab')₂. Este fragmento se puede escindir adicionalmente usando un agente reductor de tiol, y opcionalmente un grupo de bloqueo para los grupos sulfhidrilo resultantes de la escisión de enlaces disulfuro, para producir fragmentos monovalentes 3.5S Fab'. Como alternativa, una escisión enzimática que emplea pepsina produce dos fragmentos Fab' monovalentes y un fragmento Fc directamente. Estos métodos se describen, por ejemplo, en Goldenberg, documentos de Patente de EE.UU. n° 4.036.945 y 4.331.647, y las referencias contenidas en los mismos. Véase también Porter, R. R. [Biochem. J. 73: 119-126 (1959)]. Otros métodos para escindir anticuerpos, tales como la separación de cadenas pesadas para formar fragmentos de cadena ligera-pesada monovalentes, la escisión adicional de fragmentos u otras técnicas enzimáticas, químicas o genéticas, también se pueden utilizar, siempre que los fragmentos se unan al antígeno que es reconocido por el anticuerpo intacto.

Los fragmentos Fv comprenden una asociación de cadenas VH y VL. Esta asociación puede ser no covalente, como se describe en Inbar et al. [Proc. Acad. Sci. USA 69:2659-62 (1972)]. Alternativamente, las cadenas variables pueden estar unidas por un enlace disulfuro intermolecular o reticuladas por productos químicos tales como glutaraldehído. Preferiblemente, los fragmentos Fv comprenden cadenas VH y VL conectadas por un enlazador peptídico. Estas proteínas que se unen a antígeno de cadena sencilla (sFv) se preparan construyendo un gen estructural que comprende secuencias de ADN que codifican los dominios VH y VL conectados por un oligonucleótido. El gen estructural se inserta en un vector de expresión, que se introduce posteriormente en una célula hospedadora tal como *E. coli*. Las células hospedadoras recombinantes sintetizan una cadena polipeptídica sencilla con un péptido enlazador que une los dos dominios V. Los métodos para producir sFvs se describen, por ejemplo, en [Whitlow y Filpula, *Methods* 2: 97-105 (1991); Bird et al., *Science* 242:423-426 (1988); Pack et al., *Bio/Technology* 11:1271-77 (1993); y el documento de patente de EE.UU. n° 4.946.778.

Otra forma de un fragmento de anticuerpo es un péptido que codifica una región sencilla determinante de complementariedad (CDR). Los péptidos CDR ("unidades mínimas de reconocimiento") se pueden obtener construyendo genes que codifican la CDR de un anticuerpo de interés. Tales genes se preparan, por ejemplo, mediante el uso de la reacción en cadena de la polimerasa para sintetizar la región variable a partir del ARN de células productoras de anticuerpos. Véase, por ejemplo, Larrick y Fry [Methods, 2: 106-10 (1991)].

Las formas humanizadas de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) son moléculas quiméricas de inmunoglobulinas, cadenas de inmunoglobulinas o fragmentos de las mismas (tales como Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ u otras subsecuencias de anticuerpos que se unen a antígeno) que contienen una secuencia mínima obtenida a partir de inmunoglobulina no humana. Los anticuerpos humanizados incluyen inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que los residuos que forman una región determinante de la complementariedad (CDR) del receptor se sustituyen por residuos de una CDR de una especie no humana (anticuerpo donante), tal como ratón, rata o conejo que tienen la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los residuos de la estructura de Fv de la inmunoglobulina humana se sustituyen por los residuos no humanos correspondientes. Los anticuerpos humanizados también pueden comprender residuos que no se encuentran ni en el anticuerpo receptor ni en las secuencias de CDRs o estructurales importadas. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de al menos uno, y típicamente dos, dominios variables, en los que todas o sustancialmente todas las regiones CDRs se corresponden a las de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las regiones FR (estructurales, del inglés "framework") son las de una secuencia de consenso de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado de forma óptima también comprenderá al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente la de una inmunoglobulina humana [Jones et al., *Nature*, 321:522-525 (1986); Riechmann et al., *Nature*, 332:323-329 (1988); y Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.*, 2:593-596 (1992)].

Los métodos para humanizar anticuerpos no humanos son bien conocidos en la técnica. Generalmente, un anticuerpo humanizado tiene uno o varios residuos de aminoácidos introducidos dentro de él procedentes de una fuente que no es humana. Estos residuos de aminoácidos no humanos se denominan frecuentemente residuos de importación, que se toman típicamente a partir de un dominio variable de importación. La humanización se puede realizar esencialmente siguiendo el método de Winter y colaboradores [Jones et al., *Nature*, 321:522-525 (1986); Riechmann et al., *Nature* 332:323-327 (1988); Verhoeven et al., *Science*, 239:1534-1536 (1988)], mediante la sustitución de CDRs de roedor o secuencias de CDR por las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. Por consiguiente, tales anticuerpos humanizados son anticuerpos quiméricos (documento de patente de EE.UU. n° 4.816.567), en los que sustancialmente menos de un dominio variable humano intacto ha sido sustituido por la secuencia correspondiente de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son típicamente anticuerpos humanos en los que algunos residuos de CDR y posiblemente algunos residuos de FR se sustituyen por residuos de sitios análogos en anticuerpos de roedores.

Los anticuerpos humanos también se pueden producir usando diversas técnicas conocidas en la técnica, incluyendo genotecas de presentación de fagos [Hoogenboom y Winter, *J. Mol. Biol.*, 227:381 (1991); Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222:581 (1991)]. Las técnicas de Cole et al. y de Boerner et al., también están disponibles para la preparación de anticuerpos monoclonales humanos (Cole et al., *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, pág. 77 (1985) y Boerner et al., *J. Immunol.*, 147(1):86-95 (1991)]. Del mismo modo, los anticuerpos humanos se pueden preparar mediante la introducción de loci de inmunoglobulina humana en animales transgénicos, por ejemplo, ratones en los que los genes de inmunoglobulina endógenos se han inactivado parcial o completamente. Después de la estimulación, se observa la producción de anticuerpos humanos, que se asemeja estrechamente a la observada en humanos en todos los aspectos, incluyendo la reorganización de genes, el ensamblaje y el repertorio de anticuerpos. Este enfoque se describe, por ejemplo, en los documentos de patente de EE.UU. n° 5.545.807; 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425; 5.661.016, y en las siguientes publicaciones científicas: Marks et al., *Bio/Technology* 10: 779-783 (1992); Lonberg et al., *Nature* 368: 856-859 (1994); Morrison, *Nature* 368 812-13 (1994); Fishwild et al., *Nature Biotechnology* 14, 845-51 (1996); Neuberger, *Nature Biotechnology* 14: 826 (1996); y Lonberg y Huszar, *Intern. Rev. Immunol.* 13, 65-93 (1995)

Otro agente capaz de regular a la baja un gen diana de la presente invención es una molécula de ARN pequeño de interferencia (ARNsi) dirigida contra el gen de SIVA.

La interferencia con ARN es un proceso de dos etapas; en la primera etapa, que se denomina como la etapa de iniciación, el ARNds de entrada se digiere en ARNs pequeños de interferencia (ARNsi) de 21-23 nucleótidos (nt), probablemente por la acción de Dicer, un miembro de la familia de ARNasa III de las ribonucleasas específicas de ARNds, que procesa (escinde) el ARNds (introducido directamente o a través de un transgén o un virus) de una manera dependiente de ATP. Eventos de escisión sucesivos degradan el ARN a dúplex de 19-21 pb (ARNsi), cada uno con extremos sobresalientes en 3' de 2 nucleótidos [Hutvagner y Zamore *Curr. Opin. Genetics and Development* 12:225-232 (2002); y Bernstein *Nature* 409:363-366 (2001)].

En la etapa efectora, los dúplex de ARNsi se unen a un complejo de nucleasa para formar el complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC). Se requiere un desenrollamiento dependiente de ATP de los dúplex de ARNsi para la activación del RISC. El RISC activo, se dirige a continuación al transcrito homólogo a través de interacciones de apareamiento de bases y escinde el ARNm en 12 fragmentos de nucleótidos desde el extremo 3' terminal del ARNsi [Hutvagner y Zamore *Curr. Opin. Genetics and Development* 12:225-232 (2002); Hammond et al. (2001) *Nat. Rev. Gen.* 2:110-119 (2001); y Sharp *Genes. Dev.* 15:485-90 (2001)]. Aunque el mecanismo de escisión todavía no se ha dilucidado, la investigación indica que cada RISC contiene un ARNsi aislado y una ARNasa [Hutvagner y Zamore *Curr. Opin. Genetics and Development* 12:225-232 (2002)].

Debido a la notable potencia del ARNi, se ha sugerido una etapa de amplificación dentro de la vía de ARNi. La amplificación podría ocurrir copiando los ARNds de entrada lo que generaría más ARNsi, o mediante la replicación de los ARNsi formados. Alternativa o adicionalmente, la amplificación se podría llevar a cabo mediante múltiples eventos de renovación del RISC [Hammond et al. *Nat. Rev. Gen.* 2:110-119 (2001), Sharp *Genes. Dev.* 15:485-90 (2001); Hutvagner y Zamore, *Curr. Opin. Genetics and Development* 12:225-232 (2002)]. Para obtener más información sobre ARNi, consúltesen las siguientes revisiones de Tuschl *ChemBiochem.* 2:239-245 (2001); Cullen *Nat. Immunol.* 3:597-599 (2002); y Brantl *Biochem. Biophys. Act.* 1575:15-25 (2002).

La síntesis de moléculas de ARNi adecuadas para uso en la presente invención se puede efectuar del modo siguiente. En primer lugar, la secuencia de ARNm se rastrea aguas abajo del codón de iniciación AUG en busca de secuencias de dinucleótidos AA. La aparición de cada AA y de los 19 nucleótidos 3' adyacentes se registra como posibles sitios diana para el ARNsi. Preferentemente, los sitios diana de ARNsi se seleccionan a partir del marco de lectura abierto, ya que las regiones no traducidas (UTRs) son ricas en sitios de unión a proteínas reguladoras. Las proteínas que se unen a UTR y/o los complejos de iniciación de la traducción pueden interferir en la unión del complejo de endonucleasas de ARNsi [Tuschl *ChemBioChem.* 2:239-245]. Se apreciará, sin embargo, que los ARNsi dirigidos a las regiones sin traducir también pueden ser eficaces, como se demostró para GAPDH en donde ARNsi dirigidos a las UTR 5' mediaban en aproximadamente el 90% de la disminución del ARNm de GAPDH celular y un nivel de proteínas completamente anulado (www.ambion.com/techlib/tn/91/912.html).

En segundo lugar, los posibles sitios diana se comparan con una base de datos genómica apropiada (por ejemplo, humana, de ratón, rata, etc.) usando cualquier programa informático de alineación de secuencias, tal como el programa informático BLAST disponible en el servidor de NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/). Los sitios diana putativos que muestran una homología significativa con otras secuencias codificantes se eliminan por filtración.

Las secuencias diana que cumplen los requisitos se seleccionan como molde para la síntesis de ARNsi. Las secuencias preferidas son las que incluyen un bajo contenido en G/C ya que estas han mostrado ser más eficaces en la mediación del silenciamiento de genes, en comparación con las que tienen un contenido en G/C superior al 55%. Para una evaluación, se seleccionan preferiblemente varios sitios diana a lo largo de la longitud del gen diana.

Una molécula de ARNsi capaz de hibridarse específicamente con el ARNm de NIK para detener su síntesis, se describe en el Ejemplo 2 de la sección de Ejemplos que sigue a continuación (SEQ ID NO: 15).

Para una mejor evaluación de los ARNs seleccionados, se utiliza preferiblemente en conjunción un testigo negativo. El ARN testigo negativo incluye preferiblemente la misma composición de nucleótidos que los ARNs, pero carece de una homología significativa con el genoma. Por lo tanto, una secuencia de nucleótidos mezclada del ARN se utiliza preferentemente, con la condición que no muestre ninguna homología significativa con ningún otro gen.

5 Otro agente capaz de regular a la baja un gen diana descrito en esta memoria es una molécula de ADNzima capaz de escindir específicamente un transcrito de ARNm o una secuencia de ADN del gen diana de la presente descripción. Las ADNzimas son polinucleótidos monocatenarios que son capaces de escindir secuencias diana mono y bicatenarias (Breaker, R.R. y Joyce, G. *Chemistry and Biology* 1995, 2:655; Santoro, S.W. & Joyce, G.F. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1997; 94:4262). Se ha propuesto un modelo general (el modelo "10-23") para la ADNzima. Las ADNzimas "10-23" tienen un dominio catalítico de 15 desoxirribonucleótidos, flanqueado por dos dominios de reconocimiento de sustrato con siete a nueve desoxirribonucleótidos cada uno. Este tipo de ADNzima puede escindir eficazmente su ARN sustrato en las uniones de purina:pirimidina (Santoro, S.W. y Joyce, G.F. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1997; para una revisión de las ADNzimas véase Khachigian, LM [*Curr Opin Mol Ther* 4:119-21 (2002)].

15 Ejemplos de la estructura artificial y la amplificación de ADNzimas sintéticas, modificadas genéticamente que reconocen sitios de escisión diana monocatenarios y de doble cadena, se han descrito en el documento de patente de EE.UU. n° 6.326.174 de Joyce et al. Se ha observado recientemente que ADNzimas con un diseño similar dirigidas contra el receptor de la urocinasa humana, inhiben la expresión del receptor de urocinasa, e inhiben con éxito la metástasis de células de cáncer de colon *in vivo* (Itoh et al., 2002, Resumen 409, *Ann Meeting Am Soc Gen Ther www.asgt.org*). En otra solicitud, las ADNzimas complementarias a oncogenes bcr-ab1 tuvieron éxito en la inhibición de la expresión de oncogenes en células de leucemia, y tasas menores de recaída en el trasplante autólogo de médula ósea en casos de LMC y LLA.

La regulación a la baja de un gen diana de la presente invención también se puede efectuar mediante el uso de un polinucleótido no codificante capaz de hibridarse específicamente con un transcrito de ARNm que codifica el producto génico diana.

25 El diseño de moléculas no codificantes (del inglés "antisense") que se pueden usar para regular a la baja de manera eficaz un gen diana, debe efectuarse teniendo en cuenta dos aspectos importantes para la metodología no codificante. El primer aspecto es administrar el oligonucleótido en el citoplasma de las células apropiadas, mientras que el segundo aspecto es el diseño de un oligonucleótido que se una específicamente al ARNm diseñado dentro de las células de manera que inhiba su traducción.

30 La técnica anterior ilustra un número de estrategias de entrega que se pueden utilizar para administrar de forma eficaz oligonucleótidos a una amplia variedad de tipos celulares [véase, por ejemplo, Luft *J Mol Med*. 76: 75-6 (1998); Kronenwett et al. *Blood* 91: 852-62 (1998); Rajur et al. *Bioconjug Chem*. 8: 935-40 (1997); Lavigne et al. *Biochem Biophys Res Commun* 237: 566-71 (1997) y Aoki et al. (1997) *Biochem Biophys Res Commun* 231: 540-5 (1997)]

35 Además, los algoritmos para la identificación de las secuencias que tienen la mayor afinidad prevista para unirse con su ARNm diana, basados en un ciclo termodinámico que da cuenta de las energías de alteraciones estructurales en el ARNm diana y el oligonucleótido, también están disponibles [véase, por ejemplo, Walton et al. *Biotechnol Bioeng* 65: 1-9 (1999)]

40 Tales algoritmos se han utilizado con éxito para poner en práctica una metodología no codificante en las células. Por ejemplo, el algoritmo desarrollado por Walton et al. ha permitido a los científicos diseñar con éxito oligonucleótidos no codificantes para transcritos de beta-globina de conejo (RBG) y de factor de necrosis tumoral alfa (TNF alfa) de ratón. El mismo grupo de investigación ha informado recientemente de que la actividad no codificante de oligonucleótidos seleccionados racionalmente contra tres modelos de ARNm diana (lactato deshidrogenasa A y B humana y gp130 de rata) en cultivo celular, tal y como se evaluaron mediante una técnica de PCR cinética, resultó eficaz en casi todos los casos, incluidas las pruebas contra tres dianas diferentes en dos tipos de células con agentes químicos a base de oligonucleótidos de fosfodiéster y fosforotioato

Además, también se han publicado varias metodologías para el diseño y la predicción de la eficacia de oligonucleótidos específicos utilizando un sistema *in vitro* (Matveeva et al., *Nature Biotechnology* 16: 1374-1375 (1998)).

50 Varios ensayos clínicos han mostrado seguridad, viabilidad y actividad de los oligonucleótidos no codificantes. Por ejemplo, se han utilizado con éxito oligonucleótidos no codificantes adecuados para el tratamiento del cáncer [Holmund et al., *Curr Opin Mol Ther* 1:372-85 (1999)], mientras que el tratamiento de neoplasias hematológicas a través de oligonucleótidos no codificantes dirigidos al gen c-myc, p53 y Bcl-2 ha entrado en la fase de ensayos clínicos y ha mostrado que es tolerado por los pacientes [Gerwitz *Curr Opin Mol Ther* 1:297-306 (1999)].

55 Más recientemente, se ha informado de la supresión de la expresión del gen de la heparanasa humana mediada por tecnología no codificante para inhibir la difusión en la pleura de células cancerosas humanas en un modelo de ratón [Uno et al., *Cancer Res*. 61:7855-60 (2001)].

Por lo tanto, el consenso actual es que los desarrollos recientes en el campo de la tecnología no codificante que,

como se ha descrito anteriormente, han dado lugar a la generación de algoritmos para el diseño de no codificantes de alta precisión y una amplia variedad de sistemas de administración de oligonucleótidos, permiten a un experto en la materia diseñar e implementar metodologías no codificantes adecuadas para reducir la expresión de secuencias conocidas sin tener que recurrir a ensayos indebidos y a una experimentación errónea.

5 Otro agente capaz de regular a la baja un gen diana de la presente invención es una molécula de ribozima capaz de escindir específicamente un transcrito de ARNm que codifica el producto del gen diana. Las ribozimas se están utilizando cada vez más para la inhibición específica de secuencia de la expresión génica mediante la escisión de ARNm que codifican proteínas de interés [Welch et al., Curr Opin Biotechnol. 9:486-96 (1998)]. La posibilidad de diseñar ribozimas para escindir cualquier ARN diana específico, las ha vuelto unos valiosos instrumentos tanto en aplicaciones básicas de investigación como terapéuticas. En el área de la terapéutica, las ribozimas han sido explotadas para dirigirse a ARNs víricos en enfermedades infecciosas, oncogenes dominantes en cánceres y mutaciones somáticas específicas en trastornos genéticos [Welch et al., Clin Diagn Virol. 10:163-71 (1998)]. En particular, varios protocolos de terapia génica con ribozima para pacientes con VIH ya están en ensayos en la Fase 1. Más recientemente, las ribozimas se han utilizado para la investigación en animales transgénicos, la validación de dianas génicas y la elucidación de rutas. Varias ribozimas se encuentran en diversas fases de ensayos clínicos. Angiozima fue la primera ribozima sintetizada químicamente para ser estudiada en ensayos clínicos humanos. Angiozima inhibe específicamente la formación del VEGF-r (receptor del Factor de Crecimiento Endotelial Vascular), un componente clave en la ruta de la angiogénesis. Ribozyme Pharmaceuticals, Inc., así como otras empresas han mostrado la importancia de la terapéutica anti-angiogénesis en modelos animales. Heptazima, una ribozima diseñada para destruir selectivamente el ARN del virus de la hepatitis C (VHC), se ha encontrado que es eficaz para disminuir el ARN vírico de la hepatitis C en ensayos de cultivos celulares. (Ribozyme Pharmaceuticals, Incorporated - página principal de la Web)

Un método adicional para la regulación de la expresión de un gen diana en las células, es a través de los oligonucleótidos formadores de triple hélice (OFTs). Estudios recientes han mostrado que los OFTs se pueden diseñar de modo que puedan reconocer y unirse a regiones de polipurina/polipirimidina en el ADN helicoidal de doble cadena en una manera específica de la secuencia. Estas reglas de reconocimiento están descritas por Maher III, L. J., et al., Science, 1989; 245:725-730; Moser, H. E., et al., Science, 1987; 238:645-630; Beal, P. A., et al., Science, 1992; 251:1360-1363; Cooney, M., et al., Science, 1988; 241:456-459; y Hogan, M. E., et al., documento de publicación EP 375 408. La modificación de los oligonucleótidos, tal como la introducción de agentes intercalantes y sustituciones de la cadena principal, y la mejora de las condiciones de la unión (pH y concentración de cationes) han ayudado a superar obstáculos inherentes a la actividad de los OFTs, tales como la repulsión de las cargas y la inestabilidad, y se ha mostrado recientemente que oligonucleótidos sintéticos se pueden dirigir a secuencias específicas (para una revisión reciente véase Seidman y Glazer, J Clin Invest 2003; 112:487-94).

En general, el oligonucleótido formador de triple hélice tiene la conformidad de secuencia:

oligo	3'--A	G	G	T
dúplex	5'--A	G	C	T
dúplex	3'--T	C	G	A

35 Sin embargo, se ha mostrado que los tripletes A-AT y G-GC tienen la mayor estabilidad de triple hélice (Reither y Jeltsch, BMC Biochem, 2002, Sept12, publicación electrónica). Los mismos autores han demostrado que OFTs diseñados de acuerdo con la norma A-AT y G-GC no forman triples hélices no específicas, lo que indica que la formación de triple hélice es de hecho específica de la secuencia.

40 Por ello, para cualquier secuencia dada en la región reguladora del gen diana, se puede concebir una secuencia formadora de triple hélice. Los oligonucleótidos formadores de triple hélice tienen preferiblemente una longitud de al menos 15, más preferiblemente 25, aún más preferiblemente 30 o más nucleótidos, hasta 50 o 100 pb.

La transfección de células (por ejemplo, a través de liposomas catiónicos) con los OFTs, y la formación de la estructura helicoidal triple con el ADN diana induce cambios estéricos y funcionales, que bloquean el inicio de la transcripción y la elongación, permitiendo la introducción de cambios de secuencia deseados en el ADN endógeno y que dan como resultado la regulación a la baja específica de la expresión génica. Ejemplos de tal supresión de la expresión génica en células tratadas con OFTs, incluyen la inactivación de los genes episomales *supFG1* y endógenos *HPRT* en células de mamífero (Vasquez et al., Nucl Acids Res. 1999; 27:1176-81, y Puri, et al., J. Biol. Chem., 2001; 276:28991-98), y la regulación a la baja específica de la secuencia y la diana, de la expresión del factor de transcripción Ets2, importante en la etiología del cáncer de próstata (Carbone, et al., Nucl Acid Res. 2003; 31: 833-43), y el gen proinflamatorio ICAM-1 (Besch et al., J. Biol. Chem., 2002; 277:32473-79). Además, Vuyisich y Beal han mostrado recientemente que OFTs específicos de secuencia se pueden unir a ARNs, inhibiendo la actividad de las enzimas dependientes de ARNs, tales como cinasas dependientes de ARN (Vuyisich y Beal, Nuc Acids Res. 2000; 28:2369-74).

Además, los OFTs diseñados de acuerdo con los principios mencionados anteriormente, pueden inducir mutagénesis dirigidas capaces de efectuar una reparación del ADN, proporcionando de este modo tanto una regulación a la baja como una regulación al alza de la expresión de genes endógenos (Seidman y Glazer, *J Clin Invest* 2003; 112:487-94). Una descripción detallada del diseño, la síntesis y la administración de los OFTs eficaces se puede encontrar en los documentos de solicitud de patente de EE.UU. n° 2003 017068 y 2003 0096980 de Froehler et al., y 2002 0128218 y 2002 0123476 de Emanuele et al., y la Patente de EE.UU. n° 5.721.138 de Lawn.

Se apreciará que polinucleótidos y polipéptidos tal y como los descritos anteriormente en este documento, también se pueden utilizar para regular a la baja una actividad de un producto génico diana.

Así, por ejemplo, un polipéptido o polinucleótido de NIK que lo codifica, el cual incluye la mutación de origen natural en ratones, alinfoplasia (*aly*), se puede utilizar para regular a la baja la señalización de NF- κ B dependiente de NIK. Esta mutación es autosómica recesiva y se mostró que producía como resultado la ausencia sistémica de ganglios linfáticos y placas de Peyer, unas estructuras esplénicas y tímicas desorganizadas con inmunodeficiencia en ratones portadores de las mismas [Shinkura (1999) *Nature Genet.* 22:74-77].

Se apreciará que la regulación a la baja de polipéptidos y polinucleótidos que la codifican se puede caracterizar por una función dominante negativa, esencialmente un efecto dominante sobre la actividad del producto del gen diana de tipo silvestre. Por ejemplo, un producto proteico de NIK con cinasa defectuosa, se puede unir a proteínas efectoras (por ejemplo, SIVA), formando de este modo complejos inactivos e inhibiendo la señalización de NF- κ B dependiente de NIK. Mutantes dominantes negativos de NIK son bien conocidos en la técnica, véase, por ejemplo Hay (2003) *Biochem. Biophys. Acta.* 1642 (1-2):33-44; y Chandrasekar (2003) *Biochem. J.* 373:547-58. Una molécula dominante negativa de IKK α que bloquea la activación de NF- κ B ha sido descrita por Shikama (2003) *Eur. J. Immunol* 33:1998-2006. Una molécula dominante negativa de TRAF-2 ha sido descrita por Costabanzo (2003) *J. Cell Physiol* 195:402-10.

Alternativamente, un agente capaz de regular a la baja un gen diana de la presente descripción también puede ser cualquier compuesto que sea capaz de disminuir el proceso de transcripción y/o de traducción o los niveles de un ADN endógeno o ARNm que codifica un producto de un gen diana de la presente descripción. Por ejemplo, el tratamiento con PMA se puede utilizar para niveles de ARNm de CD27 como se describe en De Jonge 1991 *infra*.

Se apreciará que agentes adicionales (es decir, moduladores inmunes putativos) que se pueden usar en la presente descripción, se pueden identificar mediante el examen de su capacidad para aumentar o disminuir la señalización de NF- κ B dependiente de NIK. Así, por ejemplo, se pueden someter a ensayo agentes para estudiar su capacidad para incrementar o disminuir la formación de complejos NIK-SIVA o la regulación de CD27 dependiente de NIK, utilizando métodos citológicos, genéticos y/o bioquímicos que son bien conocidos en la técnica y se describen en los Ejemplos 1-3 de la sección de Ejemplos, que sigue a continuación.

Las moléculas/agentes que se pueden usar para modular la actividad de NIK se pueden escrutar (identificar y/o seleccionar) poniendo en contacto una célula con un ligando de una familia de receptores de TNF/NGF capaz de inducir la vía canónica y alternativa dependiente de NIK en la célula, incubar la célula antes, después o durante dicha puesta en contacto con moléculas sometidas a ensayo individuales, detectar la activación de la vía canónica en la célula y seleccionar molécula/s individuales capaces de modular la inducción de la vía canónica inducida por dicho ligando.

En una realización preferida, el ligando CD70, CD40L o Blys/BAFF se utiliza para el escrutinio de moléculas. Por otra parte, se pueden identificar nuevos ligandos capaces de inducir la vía canónica y alternativa dependiente de NIK, tal y como se ejemplifica a continuación para CD70.

La detección de la activación de la vía canónica, para el escrutinio de las moléculas, se puede llevar a cabo mediante el control de parámetros indicativos de la vía canónica, tales como como la degradación de I κ B, la fosforilación de I κ B α y la translocación de p65.

En una realización preferida de la invención, un tipo de célula linfoblastoide tal como células Ramos, Raji y BJAB se utilizan para el escrutinio de las moléculas de la invención.

Además moléculas/agentes que se pueden utilizar para modular la actividad de NIK, se pueden escrutar poniendo en contacto una célula linfoblastoide con un ligando de una familia de receptores de TNF/NGF capaz de activar NIK y la vía canónica en la célula, incubando la célula antes, después o durante dicha puesta en contacto, con moléculas individuales sometidas a ensayo, detectar la activación de la vía canónica y seleccionar molécula/s individuales capaces de modular la inducción de la vía canónica inducida por dicho ligando pero no por cualquier otro ligando capaz de inducir la vía canónica de una manera independiente de NIK, tal como TNF.

Los agentes para uso en relación con la presente invención se pueden administrar al sujeto por sí mismos, o como parte de una composición farmacéutica en la que se mezclan con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Tal y como se usa en esta memoria, una "composición farmacéutica" se refiere a una preparación de uno o más de los ingredientes activos descritos en esta memoria, con otros componentes químicos tales como vehículos y exci-

pientes fisiológicamente adecuados. El fin de una composición farmacéutica es facilitar la administración de un compuesto a un organismo.

En esta memoria, la expresión "ingrediente activo" se refiere a la preparación responsable del efecto biológico.

5 En lo sucesivo, las expresiones "vehículo fisiológicamente aceptable" y "vehículo farmacéuticamente aceptable" que se pueden utilizar de forma intercambiable, se refieren a un vehículo o un diluyente que no causa una irritación significativa a un organismo y no anula la actividad biológica y las propiedades del compuesto administrado. En estas expresiones se incluye un adyuvante. Uno de los ingredientes incluidos en el vehículo farmacéuticamente aceptable puede ser por ejemplo, polietilenglicol (PEG), un polímero biocompatible con una amplia gama de solubilidad tanto en medios orgánicos como acuosos (Mutter et al. (1979).

10 En esta memoria, el término "excipiente" se refiere a una sustancia inerte añadida a una composición farmacéutica para facilitar aún más la administración de un ingrediente activo. Ejemplos, sin limitación, de excipientes incluyen carbonato de calcio, fosfato de calcio, diversos azúcares y tipos de almidón, derivados de celulosa, gelatina, aceites vegetales y polietilenglicoles.

15 Las técnicas para la formulación y la administración de fármacos se pueden encontrar en "Remington's Pharmaceutical Sciences", Mack Publishing Co., Easton, PA, última edición.

20 Las rutas de administración adecuadas pueden incluir, por ejemplo, una administración oral, rectal, transmucosa, especialmente transnasal, intestinal o parenteral, incluyendo inyecciones intramusculares, subcutáneas e intramedulares como así como inyecciones intratecales, intraventriculares directas, intravenosas, intraperitoneales, intranasales o intraoculares. Alternativamente, se puede administrar una preparación de una forma local en lugar de sistémica, por ejemplo, a través de una inyección de la preparación directamente en una región específica del cuerpo de un paciente.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención se pueden preparar mediante procedimientos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, por medio de procesos convencionales de mezcla, disolución, granulación, elaboración de grageas, levigación, emulsión, encapsulación, atrapamiento o liofilización.

25 Las composiciones farmacéuticas para uso de acuerdo con la presente invención se pueden formular de manera convencional usando uno o varios vehículos fisiológicamente aceptables que comprenden excipientes y auxiliares, que facilitan el procesamiento de los ingredientes activos en preparaciones que se pueden utilizar farmacéuticamente. Una formulación apropiada depende de la vía de administración elegida.

30 Para la inyección, los ingredientes activos descritos en esta memoria se pueden formular en soluciones acuosas, preferiblemente en tampones fisiológicamente compatibles tales como solución de Hank, solución de Ringer o tampón de solución salina fisiológica. Para la administración a través de la mucosa, utilizan en la formulación se utilizan los agentes de penetración apropiados para ser permeados a través de la barrera. Tales agentes de penetración se conocen generalmente en la técnica.

35 Para la administración oral, los compuestos se pueden formular fácilmente combinando los compuestos activos con vehículos farmacéuticamente aceptables bien conocidos en la técnica. Tales vehículos permiten que los compuestos descritos en esta memoria se formulen como comprimidos, píldoras, grageas, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, suspensiones espesas, suspensiones y similares, para ingestión oral en un paciente. Las preparaciones farmacológicas para uso oral se pueden preparar usando un excipiente sólido, moliendo opcionalmente la mezcla resultante, y procesando la mezcla de gránulos, después de añadir auxiliares adecuados, si se desea, para obtener comprimidos o núcleos de grageas. Los excipientes adecuados son en particular, cargas tales como azúcares, incluyendo lactosa, sacarosa, manitol o sorbitol; preparaciones de celulosa tales como, por ejemplo, almidón de maíz, almidón de trigo, almidón de arroz, almidón de patata, gelatina, goma de tragacanto, metilcelulosa, hidroxipropilmetil-celulosa, carbo-
40 metilcelulosa de sodio; y/o polímeros fisiológicamente aceptables tales como polivinilpirrolidona (PVP). Si se desea, se pueden añadir agentes disgregantes, tales como polivinilpirrolidona reticulada, agar o ácido algínico o una sal de los mismos, tal como alginato de sodio.

45 Los núcleos de grageas se proporcionan con recubrimientos adecuados. Para este fin, se pueden utilizar soluciones de azúcar concentradas que pueden contener opcionalmente goma arábiga, talco, polivinilpirrolidona, gel de carboxipol, polietilenglicol, dióxido de titanio, soluciones de laca y disolventes orgánicos adecuados o mezclas de disolventes. Se pueden añadir colorantes o pigmentos a los comprimidos o a los recubrimientos de las grageas para la
50 identificación o para caracterizar diferentes combinaciones de dosis de compuesto activo.

Las composiciones farmacéuticas, que se pueden utilizar por vía oral, incluyen cápsulas de ajuste por presión preparadas a base de gelatina, así como cápsulas selladas blandas preparadas a base de gelatina y un agente plastificante, tal como glicerol o sorbitol. Las cápsulas de ajuste por presión pueden contener los ingredientes activos en mezcla por adición con una carga tal como lactosa, aglutinantes tales como almidones, lubricantes tales como talco o estearato de magnesio y, opcionalmente, agentes estabilizantes. En las cápsulas blandas, los ingredientes activos se pueden disolver o suspender en líquidos adecuados, tales como aceites grasos, parafina líquida o polietilenglicoles líquidos. Además, se pueden añadir agentes estabilizantes.

Todas las formulaciones para administración oral deben estar en dosificaciones adecuadas para la ruta de administración elegida.

Para la administración bucal, las composiciones pueden estar en forma de comprimidos o pastillas formuladas de manera convencional.

- 5 Para la administración por inhalación nasal, los ingredientes activos para uso descritos en esta memoria se suministran convenientemente en forma de una presentación de pulverización en aerosol desde un envase presurizado o un nebulizador, empleando un propulsor adecuado, por ejemplo, diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano o dióxido de carbono. En el caso de un aerosol presurizado, la unidad de dosificación se puede determinar proporcionando una válvula para suministrar una cantidad medida. Las cápsulas y los cartuchos, por ejemplo, de gelatina para uso en un dispensador, se pueden formular de forma que contengan una mezcla en polvo del compuesto y una base en polvo adecuada, tal como lactosa o almidón.

- 15 Las preparaciones descritas en esta memoria se pueden formular para administración parenteral, por ejemplo, mediante inyección de bolo o infusión continua. Las formulaciones para inyección se pueden presentar en forma de dosificación unitaria, por ejemplo, en ampollas o en recipientes multidosis, opcionalmente, con un conservante añadido. Las composiciones pueden ser suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos oleosos o acuosos, y pueden contener agentes de formulación tales como agentes de suspensión, estabilizantes y/o dispersantes.

- 20 Las composiciones farmacéuticas para administración parenteral incluyen soluciones acuosas de la preparación activa en forma hidrosoluble. Adicionalmente, las suspensiones de los ingredientes activos se pueden preparar como suspensiones adecuadas para inyección oleosas o a base de agua. Los disolventes o vehículos lipófilos adecuados incluyen aceites grasos tales como aceite de sésamo, o ésteres sintéticos de ácidos grasos, tales como oleato de etilo, triglicéridos o liposomas. Las suspensiones acuosas para inyección pueden contener sustancias que aumentan la viscosidad de la suspensión, tales como carboximetil celulosa sódica, sorbitol o dextrano. Opcionalmente, la suspensión también puede contener estabilizantes adecuados o agentes que aumentan la solubilidad de los ingredientes activos para permitir la preparación de soluciones altamente concentradas.

- 25 Alternativamente, el ingrediente activo puede estar en forma de polvo para su constitución con un vehículo adecuado, por ejemplo, una solución estéril, exenta de pirógenos a base de agua, antes de su uso.

La preparación descrita en esta memoria se puede formular también en composiciones rectales tales como supositorios o enemas de retención, usando, por ejemplo, bases de supositorio convencionales tales como manteca de cacao u otros glicéridos.

- 30 Las composiciones farmacéuticas adecuadas para uso en el contexto de la presente invención incluyen composiciones en las que los ingredientes activos están contenidos en una cantidad eficaz para conseguir el objetivo deseado. Más específicamente, una cantidad terapéuticamente eficaz significa una cantidad de ingredientes activos, eficaz para prevenir, aliviar o mejorar los síntomas de una enfermedad o prolongar la supervivencia del sujeto que está siendo tratado.

- 35 La determinación de una cantidad terapéuticamente eficaz está incluida en las capacidades de los expertos en la técnica.

Para cualquier preparación utilizada según la invención, una cantidad o dosis terapéuticamente eficaz se puede estimar inicialmente a partir de ensayos *in vitro*. Por ejemplo, una dosis se puede formular en modelos animales y tal información se puede utilizar para determinar con mayor precisión dosis útiles en seres humanos.

- 40 La toxicidad y la eficacia terapéutica de los ingredientes activos descritos en el presente documento se pueden determinar mediante procedimientos farmacéuticos convencionales *in vitro*, en cultivos celulares o en animales de experimentación. Los datos obtenidos a partir de estos ensayos *in vitro* y celulares de cultivo y estudios animales se pueden utilizar para formular un intervalo de dosificación para uso en humanos. La dosificación puede variar dependiendo de la forma de dosificación empleada y de la vía de administración utilizada. La formulación exacta, la vía de administración y la dosificación las puede seleccionar el médico particular de cara al estado del paciente. (Véase, por ejemplo, Fingl, et al., 1975, en "The Pharmacological Basis of Therapeutics", cap. 1 pág. 1).

- 45 Dependiendo de la gravedad y la capacidad de respuesta del estado a tratar, la dosificación puede ser una sola o varias administraciones, con un curso del tratamiento que dure desde varios días a varias semanas o hasta que se efectúa la curación o se logra una disminución del estado de enfermedad.

- 50 La cantidad de una composición que se va a administrar, por supuesto, dependerá del sujeto que está siendo tratado, la gravedad de la dolencia, la forma de administración, el juicio del médico que prescribe, etc.

Las composiciones de la presente invención formuladas en un vehículo farmacéutico compatible también se pueden preparar, colocadas en un recipiente apropiado y etiquetadas para el tratamiento de una afección indicada.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención, si se desea, se pueden presentar en un envase o un

dispositivo dispensador, tal como un kit aprobado por la FDA, que puede contener una o varias formas de dosificación unitarias que contienen el ingrediente activo. El envase, por ejemplo, puede comprender una lámina de metal o de plástico, tal como un envase blíster. El envase o el dispositivo dispensador puede ir acompañado de las instrucciones para la administración. El envase o el dispositivo dispensador también puede suministrar una notificación asociada con el recipiente en la forma prescrita por una agencia gubernamental que regula la fabricación, el uso o la venta de productos farmacéuticos, en donde dicha notificación es un reflejo de la aprobación de la agencia de la forma de las composiciones o de la administración a humanos o veterinaria. Dicha notificación, por ejemplo, puede ser un etiquetado aprobado por la "Food and Drug Administration" de EE.UU. para medicamentos recetados o un prospecto del producto aprobado.

- 5
- 10 Se aprecia que ciertas características descritas en esta memoria, que son para una mayor claridad, descritas en el contexto de realizaciones separadas, también se pueden proporcionar en combinación en una sola realización. A la inversa, diversas características descritas en esta memoria, que se describen, por brevedad, en el contexto de una sola realización, también se pueden proporcionar por separado o en cualquier subcombinación adecuada.

Ejemplos

- 15 Ahora se hace referencia a los siguientes ejemplos, que junto con las descripciones anteriores, ilustran la invención de una manera no limitante.

Generalmente, la nomenclatura utilizada en esta memoria y los procedimientos de laboratorio utilizados en la presente invención incluyen técnicas moleculares, bioquímicas, microbiológicas y de ADN recombinante. Tales técnicas se explican a fondo en la bibliografía. Véase, por ejemplo, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" Sambrook et al., (1989); "Current Protocols in Molecular Biology" volúmenes I-III Ausubel, R. M., compilador (1994); Ausubel et al., "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland (1989); Perbal, "A Practical Guide to Molecular Cloning", John Wiley & Sons, Nueva York (1988); Watson et al., "Recombinant DNA", Scientific American Books, Nueva York; Birren et al. (compiladores) "Genome Analysis: A Laboratory Manual Series", vols. 1-4, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York (1998); metodologías tal y como se describen en los documentos de Patente de EE.UU. n° 4.666.828; 4.683.202; 4.801.531; 5.192.659 y 5.272.057; "Cell Biology: A Laboratory Handbook", volúmenes I-III Cellis, J. E., compilador (1994); "Current Protocols in Immunology" volúmenes I-III Coligan J. E., compilador (1994); Stites et al. (compiladores), "Basic and Clinical Immunology" (8ª Edición) Appleton & Lange, Norwalk, CT (1994); Mishell y Shiigi (compiladores), "Selected Methods in Cellular Immunology", W. H. Freeman and Co., Nueva York (1980); los inmunoensayos disponibles se describen extensamente en la bibliografía de patentes y científica, véase, por ejemplo, los documentos de Patente de EE.UU. n° 3.791.932; 3.839.153; 3.850.752; 3.850.578; 3.853.987; 3.867.517; 3.879.262; 3.901.654; 3.935.074; 3.984.533; 3.996.345; 4.034.074; 4.098.876; 4.879.219; 5.011.771 y 5.281.521; "Oligonucleotide Synthesis" Gait, M. J., compilador (1984); "Nucleic Acid Hybridization" Hames, B. D., y Higgins S. J., compiladores. (1985); "Transcription and Translation" Hames, B. D., y Higgins S. J., compiladores (1984); "Animal Cell Culture" Freshney, R., compilador (1986); "Immobilized Cells and Enzymes" IRL Press, (1986); "A Practical Guide to Molecular Cloning" Perbal, B., (1984) y "Methods in Enzymology" vol. 1-317, Academic Press; "PCR Protocols: A Guide To Methods And Applications", Academic Press, San Diego, CA (1990); Marshak et al., "Strategies for Protein Purification and Characterization - A Laboratory Course Manual" CSHL Press (1996).

- 40 Otras referencias generales se proporcionan en este documento. Los procedimientos en el mismo se cree que son bien conocidos en la técnica y se proporcionan para la conveniencia del lector.

Ejemplo 1

Unión de NIK-SIVA

La unión de NIK con SIVA y el efecto de su coexpresión se sometieron a ensayo utilizando ensayos de la unión, coexpresión e inmunoprecipitación.

- 45 Anticuerpos:

El anticuerpo anti-HIS se adquirió en Sigma. El anticuerpo monoclonal anti-myc (clon 9E10) se purificó a partir del líquido ascítico de ratón sobre una columna de afinidad myc-péptido.

Células:

- 50 Las células HEK293T se cultivaron en medio esencial mínimo de Eagle modificado con Dulbecco, complementado con suero de ternera fetal al 10%, 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomycin.

Vectores de expresión:

Un vector para la expresión de NIK (SEQ ID NO: 1) fusionado en el extremo N-terminal con el marcador myc (EQKLISEEDL, SEQ ID NO: 5) se obtuvo a partir del Dr. Michael Kracht, Alemania. Los ADNc de SIVA1 humano (SEQ ID NO: 6) y SIVA2 (SEQ ID NO: 7) eran una amplificación con PCR de los ESTs y se clonaron en el vector

pcDNA3.1-HIS (Invitrogen). El plásmido pEGFP se adquirió en Clontech. NIK humana con una mutación correspondiente a la de la mutación *aly* de ratón (G860R) (Shinkura et al., 1999; NM_016896) se generó con un kit de mutagénesis dirigida al sitio (Stratagene), utilizando (codificante) 5' CCAAGCTATTTCAATCGTGTGAAAGTCCAAATAC (SEQ ID NO: 8) y (no codificante) 5' GTATTTGGACTTTCACACGATTGAAATAGCTTGG (SEQ ID NO: 9)

5 Escrutinio de dos híbridos de levadura:

Un inserto de NIK digerido con BamHI/XhoI procedente del vector pcNIK se subclonó en los sitios BamHI/Sall del vector del dominio de unión de ADN de Gal4, pGBKT7 (Clontech). Una genoteca de médula ósea humana transformada previamente (HL4053AH, Clontech) se sometió a escrutinio de dos híbridos utilizando pGBKT7-NIK como cebo, de acuerdo con las instrucciones del fabricante (manual del protocolo de levadura, Clontech - www.clontech.com). Se identificaron clones positivos mediante una selección cuádruple y se sometió a ensayo la actividad β -galactosidasa. La unión del clon SIVA a NIK y NIK624-947 se confirmó de nuevo y la unión de NIK a TRAF2 se evaluó con un ensayo de la expresión de β -galactosidasa utilizando la cepa informadora de levadura SFY526 (Clontech) y los vectores pGBKT7 y pGADT7.

Transfecciones, inmunotransferencia e inmunoprecipitaciones:

15 Para la coimmunoprecipitación de proteínas transfectadas, se sembraron células HEK293T en placas de 90 mm (1,5 x 10⁶ células/placa) y se transfectaron utilizando el método de precipitación con fosfato de calcio (Sambrook et al., 1989) un día después, utilizando una cantidad total de 10 μ g de ADN en 10 ml de medio DMEM con 10% de FBS. Para la cotransfección se utilizó una mezcla 1:1 de los plásmidos que codificaban las proteínas sometidas a ensayo. Veinticuatro horas después de la transfección, las células se lavaron una vez con solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se lisaron en 1 ml de tampón de lisis (Tris-HCl 10 mM (pH 7,6), NaCl 250 mM, 1% de NP-40, EDTA 1 mM, PMSF 1 mM) que incluía 1 x la mezcla completa de inhibidor de proteasa (Roche Molecular Biochemicals). Los materiales lisados, lavados previamente, se incubaron durante 2 horas a 4°C con 2 μ g de anticuerpo anti-myc o anti-HIS preadsorbido a perlas de proteína-G-Sefarosa (Amersham Biosciences). Las perlas se lavaron a continuación con tampón de lisis, se sometieron a SDS-PAGE, y las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa y se analizaron con los anticuerpos indicados. Los anticuerpos se visualizaron con anticuerpos secundarios acoplados a peroxidasa de rábano picante (HRP), usando el sistema de detección con transferencia Western con quimioluminiscencia incrementada (ECL) (Amersham) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Prueba del gen informador:

30 La activación de NF- κ B mediada con NIK se midió con el ensayo del gen informador. Células HEK293T (1,5 x 10⁵/pocillo) se sembraron en placas de 6 pocillos y se transfectaron con el método de precipitación con fosfato de calcio (Sambrook et al., 1989) un día después. Para la cotransfección, se utilizó una mezcla 1:1 de los plásmidos que codificaban las proteínas que se iban a someter a ensayo. Para mantener la concentración total de ADN en 2 μ g/pocillo, se añadió un vector pcDNA3 (Invitrogen) "vacío". Veinticuatro horas después de la transfección, las células se recogieron, se lisaron y se determinó la actividad del gen informador usando el sistema de ensayo con luciferasa (Promega).

NIK se une a SIVA, una proteína adaptadora asociada con CD27:

40 El escrutinio de una genoteca de dos híbridos de médula ósea humana utilizando NIK como cebo, reveló que NIK se unía específicamente a una porción C-terminal de una proteína denominada SIVA que se había observado previamente que se asociaba con CD27, un receptor de la familia TNF/NGF expresado principalmente en linfocitos T y B (Prasad et al., 1997). Como con la unión de TRAF a NIK (Malinin et al, 1997), el presente estudio mostró que la porción C-terminal de SIVA se une a la porción C-terminal de NIK y que esta unión era más fuerte cuando se utilizaban las porciones respectivas y no toda la proteína en los ensayos de unión (Figura 1a). Esto es probablemente debido a la propensión de la parte N-terminal de NIK a unirse a su propio extremo C-terminal y por lo tanto a bloquear la unión de esta porción con otras proteínas (Xiao y Sun, 2000).

45 La coexpresión de NIK con SIVA1 o SIVA2, las dos variantes por corte y empalme conocidas de SIVA (Yoon et al., 1999), en células HEK293 transfectadas transitoriamente, reveló que NIK se puede unir a SIVA en células de mamífero. Como se muestra en las Figuras 1b-c, NIK coimmunoprecipitaba bidireccionalmente con las dos variantes de corte y empalme desde lisados de las células transfectadas. La cantidad de SIVA1 o SIVA2 en las células transfectadas se incrementó cuando se coexpresaba con NIK, al parecer reflejaba una estabilización de SIVA por sus moléculas NIK asociadas. La expresión de NIK también se mejoró con la coexpresión de cualquiera de las dos variantes por corte y empalme de SIVA (Figuras 1b, 1c). No se observó tal mejora después de la coexpresión de NIK con proteína verde fluorescente (GFP) o IKK1 (Figura 1d). La expresión de SIVA2 no aumentó la cantidad de NIK coexpresada que contenía una mutación de sentido erróneo inactivante, correspondiente a la encontrada en los ratones *aly* (G860R), a pesar de que este mutante NIK coimmunoprecipitaba con SIVA1 y en cierta medida también con SIVA2 (Figuras 1b-c).

SIVA también parecía ser capaz de afectar a la función de NIK. Cuando se expresaba solo, SIVA1 o SIVA2 solo causaron una ligera activación de NF- κ B. Sin embargo, ambas variantes por corte y empalme mejoraban significativamente la activación de NF- κ B mediante la coexpresión con NIK, aunque no afectaban a la activación de NF- κ B a

través del mutante *aly* coexpresado por NIK (Figura 1e).

Ejemplo 2

CD27 induce el procesamiento de IκB y NF-κB2/p100 en linfocitos, mientras que la detención de la síntesis de NIK en células linfoblastoides Ramos bloquea la activación de NF-κB inducida con CD27

- 5 La capacidad de CD70 (ligando de CD27) para inducir el procesamiento de IκB y NF-κB2/p100 en linfocitos se determinó mediante análisis con transferencia Western que utilizaba anticuerpos dirigidos contra p100, p52, RelB, IκBα y p65. El efecto de la presencia de NIK en estas células durante el procesamiento inducido se evaluó mediante análisis con transferencia Western de las mismas moléculas en células con NIK inhibida.

Reactivos:

- 10 CD70 (GenBank número de orden Y13636) se produjo por transfección a gran escala de células 293T de riñón embrionario humano (HEK) con las estructuras artificiales correspondientes para expresión (véase más abajo). MG132 se adquirió en Calbiochem. Ficoll-Paque se adquirió en Amersham Biosciences. G418 se adquirió en Life Technologies. Fitohemaglutinina (PHA) se adquirió en Sigma. En todas las pruebas, se utilizó el medio condicionado de las células transfectadas con una dilución de 1:4

- 15 Anticuerpos:

- El anticuerpo anti-p52 se adquirió en Upstate Biotechnologies, los anticuerpos contra p65, RelB, CD27 y Lamina A/C en Santa Cruz Biotechnology, anti-IκBα en Transduction Laboratories, el anticuerpo monoclonal anti-myc se purificó tal y como se ha descrito en el Ejemplo 1. El anticuerpo monoclonal anti-NIK, NIK-81 se obtuvo mediante la inmunización de ratones con un péptido acoplado a KLH que se correspondía a una secuencia dentro del dominio cinasa de NIK (RLGRGSFGEVHRMEDK, SEQ ID NO: 10) que incluía una cisteína en el extremo N-terminal para el acoplamiento. El anticuerpo monoclonal anti-NIK se purificó sobre Affigel (BioRad), una columna de afinidad a la que se acopló el péptido ligado a BSA.
- 20

Células:

- 25 Las células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC) se aislaron a partir de muestras de la capa leucocitaria mediante centrifugación en gradiente de Ficoll-Paque a 450 x g. Las células se sometieron a estimulación con CD70 sin ningún tratamiento previo o después de su activación durante 48 horas con 1 μg/ml de PHA a la que siguió un período de reposo de 12 h sin PHA. Las PBMC, así como células de las líneas linfoblastoides B humanas procedentes del linfoma de Burkitt, Ramos (Benjamin et al., 1982), Raji (Pulvertaft, 1964), se cultivaron en medio RPMI complementado con suero de ternera fetal al 10%, 100 U/ml de penicilina y 100 μg/ml de estreptomycin. Las células HEK293T se cultivaron tal y como se ha descrito en el Ejemplo 1 de la sección de Ejemplos.
- 30

Vectores de expresión:

- Los ADNc de los dominios extracelulares de mCD70, se amplificaron mediante PCR a partir de ESTs y se clonaron en fusión con una cremallera de leucina modificada y marcador FLAG (Fanslow et al., 1994) en pcDNA3 (Invitrogen). El ADNc correspondiente a la NIK de longitud completa se clonó en el vector del dominio que se une a ADN de Gal4, pGBKT7 (Clontech). NIK cuya secuencia estaba alterada para volverla no complementaria al ARNsi de NIK, se generó usando como cebadores (codificante) 5' GAGGGTCTGGAATACCTACATTCCCGCAGGATTCTGCATGGG (SEQ ID NO: 11) y (no codificante) 5' CCCATGCAGAATCCTGCGGGAATGTAGGTATTCCAGACCCTC (SEQ ID NO: 12).
- 35

ARNsi y transducción de lentivirus:

- 40 El ARNsi de horquilla se expresó utilizando el vector pSUPER, tal y como se ha descrito previamente (Brummelkamp et al., 2002). Brevemente, se diseñó un oligonucleótido de doble cadena para contener las secuencias directas e inversas que se correspondían a una región en el marco de lectura abierto de NIK humana (nucleótidos 1513-1531) ligadas por una región espaciadora de 9 pares de bases (ttcaagaga SEQ ID NO: 15): cadena codificante 5' gatccccTACCTCCACTCACGAAGGAttcaagagaTCCTTCGTGAGTGGAGGTAttttgaaa (SEQ ID NO: 13); cadena no codificante 5' agcttttccaaaaTACCTCCACTCACGAAGGAtctcttgaaTCCTTCGTGAGTGGAGGTAggg (SEQ ID NO: 14). Los dos oligonucleótidos se hibridaron y se clonaron en los sitios *Bgl*II y *Hind*III (Brummelkamp et al., 2002) del vector pSUPER para expresión bajo el control del promotor de ARN H1 (Brummelkamp et al., 2002). Se realizó una transfección transitoria con un exceso de hasta 5 veces de este pSUPER-NIK sobre NIK cotransfectada, tal y como se ha descrito anteriormente.
- 45

- 50 Un vector de lentivirus (Lois et al., 2002) se utilizó con el fin de expresar el pSUPER-NIK constitutivamente en células Ramos. El casete que incluía el promotor H1 (Brummelkamp et al., 2002) y el ARNi de NIK se escindió del vector pSUPER utilizando *Eco*RI e *Hind*III (ambas de New England Biolabs), los extremos cohesivos se volvieron romos utilizando ADN polimerasa de T4 (New England Biolabs), y el fragmento romo se insertó en el sitio *Pac*I romo del vector de lentivirus FUGW que expresaba GFP (Lois et al., 2002). Las células transducidas se clasificaron mediante

FACS según la expresión de GFP (FACS Vantage, Becton-Dickinson): las células clasificadas mostraban expresión de GFP y carencia de NIK durante meses.

Transfecciones, inmunotransferencia e inmunoprecipitaciones:

5 Las transfecciones, inmunotransferencia e inmunoprecipitaciones se realizaron tal y como se ha descrito en el Ejemplo 1 de la sección de Ejemplos.

Células Ramos ($2-4 \times 10^8$; 1×10^8 células/ml) se lisaron y se inmunoprecipitaron con antisuero anti-NIK de ratón purificado por afinidad, acoplado a perlas de proteína-G-Sefarosa con el fin de detectar NIK endógena. La proteína precipitada se detectó por transferencia Western utilizando el anticuerpo NIK-81 y el kit de detección de quimioluminiscencia SuperSignal West Femto (Pierce).

10 Para la inmunoprecipitación de las proteínas NF- κ B, se diluyeron extractos nucleares procedentes de $10-20 \times 10^6$ células hasta alcanzar la siguiente composición: 0,5% de NP-40, HEPES 10 mM, pH 7,9, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, ditioneitol 1 mM (DTT), PMSF 1 mM, y 1 x la mezcla completa de inhibidor de proteasa. El anticuerpo anti-RelB preadsorbido a perlas de proteína A-Sefarosa (Amersham Biosciences) se incubó con lisados nucleares preaclerados durante 2 horas a 4°C. Los inmunoprecipitados se analizaron por SDS-PAGE usando geles de NuPAGE con 4-12% de Bis-Tris (Invitrogen), y los geles se sometieron a transferencia Western tal y como se ha descrito anteriormente.

20 La activación de ligandos de líneas de células linfoides y PBMC, se llevó a cabo típicamente mediante estimulación de 1×10^6 células durante los periodos de tiempo indicados en las figuras (0, 0,3 y 4 horas o 0, 1 y 4 horas; Figura 2a-b) con los ligandos correspondientes, y los extractos nucleares y citoplásmicos se prepararon tal y como se ha descrito (Schreiber et al., 1989) y se analizaron por transferencia Western.

La activación de ligandos de células Raji se realizó mediante la estimulación de las células durante los periodos de tiempo indicados en las figuras (0, 0,3 y 4 horas o 0, 1 y 4 horas; Figura 2a-b) con CD70. La activación de ligandos de células Ramos normales y NIK^(MENOS) se realizó estimulando las células durante los periodos de tiempo indicados en las figuras (0, 0,3, 1, 4 y 20 horas; Figuras 2d-e o 0, 0,15, 0,3, 4 y 16 horas; Figura 2h) con CD70.

25 La reintroducción de NIK en las células NIK^(MENOS) se realizó por nucleotransfección de células NIK^(MENOS) con el vector de expresión utilizando el kit V de Nucleofector de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Amaxa Biosystems). En resumen, 2×10^6 células NIK^(MENOS) se nucleofectaron con 4 μ g de plásmido de NIK mutado marcado con myc y 1 μ g de pcDNA.3 en solución V, empleando el programa S18 en el dispositivo Nucleofector. Las células que expresaban de forma estable la proteína transfectada se seleccionaron sobre G418 (1 mg/ml).

30 Ensayo con proteína cinasa C:

La actividad PKC en células Ramos testigo y en células Ramos carentes de NIK se midió (0, 15 y 30 minutos) después de la estimulación con CD70 mediante el uso del sistema de ensayo con Proteína Cinasa C de Signatect (Promega). La actividad enzimática de la PKC se determinó restando los valores obtenidos cuando se realizó el ensayo en ausencia de fosfolípidos, de los obtenidos en su presencia.

35 CD27 induce el procesamiento de I κ B y NF- κ B2/p100 en linfocitos:

La capacidad de NIK para unirse a SIVA sugirió que NIK podría desempeñar un papel en la función celular de CD27. Por lo tanto, se examinaron los efectos de CD27 sobre la vía de activación alternativa de NF- κ B en la que la función de NIK había sido implicada.

40 El tratamiento de leucocitos mononucleares humanos de sangre periférica (PBMC) con el ligando de CD27, CD70, inducía una rápida disminución de I κ B α (Figuras 2a, 2b, paneles superiores), indicando que el receptor puede desencadenar la activación de la vía canónica de NF- κ B. Esta disminución fue más fácil de detectar en PBMC activadas, en las que el nivel de I κ B α basal es alto (Figura 2b, panel superior), pero con un examen cuidadoso también se podría discernir en PBMC no estimuladas, que contienen mucho menos I κ B α (Figura 2a, panel superior). En las PBMCs en reposo, CD70 también inducía la translocación de NF- κ B2/p52 (p52), así como de RelB a los núcleos, lo que indicaba que CD27 también estimula la vía alternativa de NF- κ B en estas células (Figura 2a, panel inferior).

45 Después de la activación con PHA, que da como resultado un aumento de la expresión tanto de CD27 como de CD70 en PBMC (de Jong et al., 1991 y Hintzen et al., 1994), el nivel nuclear basal de p52 y RelB era muy alto, evitando la determinación del efecto de CD70 aplicado sobre la generación de p52 (Figura 2b, panel inferior).

50 El presente estudio también mostraba que CD70 induce la degradación de I κ B α y la translocación nuclear de RelB y NF- κ B2/p52 en líneas linfoblastoides Ramos y Raji (Figura 2c y paneles de la izquierda en la Figura 2d, 2e). El tratamiento de células Raji con CD70 induce la degradación de I κ B α al cabo de 20 minutos de la aplicación de CD70, aunque posteriormente aumentaron los niveles de I κ B α . La degradación de I κ B α se asoció con la translocación nuclear de p65, RelB y NF- κ B2/p52 (Figura 2c).

Se observó un patrón similar de degradación de I κ B α en células Ramos después de la aplicación de CD70 (Figura

2e, panel izquierdo). La degradación de I κ B α se asoció con un aumento prolongado de los niveles nucleares de p65 (Figura 2e, panel izquierdo). Por otro lado, la translocación nuclear de RelB se produjo más bien lentamente, alcanzando una translocación máxima aproximadamente 4 horas después de la aplicación de CD70 (Figura 2d, panel izquierdo). La translocación nuclear de p52 comenzó en los primeros 20 minutos y se mantuvo durante 20 horas. La acumulación de p100 en los núcleos de las células Ramos apareció durante la primera hora (Figura 2d, panel de la izquierda), un proceso que se sugirió que reflejaba la translocación inducida de esta proteína, en asociación con RelB, al núcleo (Yilmaz et al., 2003).

La detención de la síntesis de NIK en células linfoblastoides Ramos bloquea la activación inducida por CD27 tanto de la vía canónica como de la alternativa de NF- κ B:

- 10 Para examinar el papel de NIK en la activación de diversas formas de NF- κ B a través de CD27, se detuvo la síntesis de NIK en células Ramos infectando estas células con un vector de lentivirus que expresaba un ARN corto de interferencia de horquilla (ARNsi) capaz de bloquear la síntesis de NIK. El análisis Western confirmó que tanto en una situación de expresión transitoria como estable, el vector de ARNsi detenía de forma eficaz la síntesis de NIK (Figura 2f, paneles superior y medio). Como era de esperar por la referida participación de NIK en la vía alternativa de NF- κ B, el tratamiento de las células Ramos NIK^(MENOS) con CD70 no inducía la translocación de p52 o de RelB a sus núcleos. La translocación de p100 inducida por CD70 en estas las células, también se retrasó significativamente (Figura 2d, panel derecho). La carencia de NIK también dio como resultado una incapacidad de CD70 para inducir la degradación de I κ B α o la translocación nuclear de p65 (Figura 2e, panel de la derecha), ambas manifestaciones de la vía canónica.
- 20 Las pruebas testigo confirmaron que las células Ramos NIK^(MENOS) expresan CD27 a niveles comparables con los de las células Ramos normales y por lo tanto muestran una activación normal de la proteína cinasa C (PKC) después de la activación con CD27 (Erllichman y Howard, 1999) (Figura 2g y su inserción). Estos resultados indicaron que la incapacidad de las células Ramos NIK^(MENOS) para activar NF- κ B no estaba causada por una función aberrante de CD27. Para verificar esta observación, se restableció la expresión NIK en las células NIK^(MENOS) (Figura 2f, panel inferior) mediante la transfección de estas células con ADNc de NIK marcado con myc, al que se habían introducido cambios conservadores de la secuencia para que no fuera complementario a la secuencia del ARNsi de NIK. Aunque los niveles nucleares de I κ B α y de p52 en estas células eran algo mayores de lo normal (probablemente debido a una señalización espontánea de NIK como consecuencia de su nivel de expresión supranormal), las células reconstituidas con NIK^(MENOS) recuperaron la capacidad de responder a CD70 tanto con un aumento de p52 nuclear como con una disminución transitoria en I κ B α (Figura 2h), confirmando adicionalmente el papel fundamental de NIK en la activación de la vía alternativa y la vía canónica de NF- κ B.

Ejemplo 3

Efecto de la inhibición de NIK sobre las vías canónica y alternativa de NF- κ B

- 35 La capacidad de CD40, BLYS, TNF, tpsigargina o PMA para inducir las vías canónica y alternativa de NF- κ B se determinó mediante análisis de transferencia Western que utilizaban anticuerpos dirigidos contra p100, p52, RelB, I κ B α y p65. El efecto de la presencia de NIK en las células se evaluó por análisis de transferencia Western de las mismas moléculas en células con NIK inhibida.

Reactivos:

- 40 La producción de hCD154 (CD40L) y hBLYS/BAFF se realizó mediante transfección a gran escala de células 293T de riñón embrionario humano (HEK) con las estructuras artificiales para expresión correspondientes (véase más abajo). En todas las pruebas, los medios condicionados de las células transfectadas eran como se ha descrito en el Ejemplo 2. TNF, un regalo del Dr. G. Adolf, Boehringer Institute, Viena, Austria, se aplicó a las células a una concentración de 50 ng/ml. La tpsigargina, el 4 β -forbol-12-miristato-13-acetato (PMA) y la fitohemaglutinina (PHA) se adquirieron en Sigma.

- 45 Anticuerpos:

La fuente de anticuerpos contra p65, RelB, p52, p100, I κ B se ha descrito en el Ejemplo 2 de la sección de Ejemplos. Anti c-Rel fue adquirido en Santa Cruz Biotechnology. Anti-actina β y anti-FLAG se adquirieron en Sigma. Anti-fosfo-I κ B α se adquirió en Cell Signaling Technology.

Células:

- 50 Las células Ramos. (Benjamin et al., 1982) se cultivaron como se ha descrito en el Ejemplo 2 de la sección de Ejemplos.

Vectores de expresión:

Los ADNc de los dominios extracelulares de hCD154 (CD40L) (clon de la ATCC 79814) y hBLYS/BAFF (clon de Resgen 631119) se amplificaron con PCR a partir de ESTs y se clonaron en fusión con una cremallera de leucina

modificada y marcador FLAG (Fanslow et al., 1994) en pcDNA3 (Invitrogen). La inhibición de NIK se generó tal y como se ha descrito en el Ejemplo 2 de la sección de Ejemplos.

Transfecciones, inmunotransferencia e inmunoprecipitaciones:

5 Las transfecciones, la inmunotransferencia y las inmunoprecipitaciones se realizaron tal y como se ha descrito en el Ejemplo 1 de la sección de Ejemplos. IκBα fosforilada se detectó después de un pretratamiento (2 h) con el inhibidor de proteasoma MG132 (25 μM).

10 La activación de ligandos de las células Ramos normales y NIK^(MENOS) se realizó mediante la estimulación de las células durante los periodos de tiempo indicados: 0, 0,2, 0,5, 1 y 16 horas (Figura 3a), 0, 0,25, 1 y 16 (Figura 3a-b) con CD40L, durante períodos de tiempo de 0,3, 4 y 20 horas (Figura 3c-d) con BLYS, durante períodos de tiempo de 0, 0,3, 4 y 20 horas (Figura 3e) o 0, 0,3, 1, 4 y 20 horas (Figura 3f) con TNF. La estimulación de las células con CD70 y TNF se realizó durante 0, 15 minutos y 4 horas (Figura 3g). La estimulación con tapsigargina y PMA se realizó durante 0, 30 minutos y 4 horas (Figura 3h).

15 Estudios de los efectos de diversos ligandos de la familia de TNF sobre la activación de NF-κB en linfocitos han mostrado la activación tanto de la vía canónica como de la alternativa de NF-κB a través de dos ligandos, el ligando de CD40 (CD40L) (Berberich et al., 1994) (Coope et al., 2002) y BLYS/BAFF (Claudio et al., 2002) (Kayagaki et al., 2002) (Hatada et al., 2003). Por otra parte, TNF, aunque es capaz de desencadenar eficazmente la vía canónica, parece incapaz de desencadenar la vía alternativa (Matsushima et al., 2001) (Yin et al., 2001) (Dejardin et al., 2002) (Yilmaz et al., 2003). TNF induce solo un ligero aumento en p52 nuclear, mucho menos que el inducido por ligandos tales como CD40L (Yilmaz et al., 2003) (Derudder et al., 2003), probablemente a través de la estimulación de la síntesis de p100 (de Wit et al., 1998). TNF también induce la síntesis de RelB (Bren et al., 2001), que se acumula en parte en el núcleo, aparentemente a través de una translocación nuclear inducida de los dímeros p100:RelB (Yilmaz et al., 2003)

25 Las respuestas de las células Ramos a CD40L, BLYS/BAFF y TNF en el presente estudio eran compatibles con esos informes. Los tres ligandos inducían la activación de la vía canónica, tal y como se refleja en la rápida translocación nuclear de p65 (Figuras 3b, 3d, 3f, paneles de la izquierda). Esta translocación se asoció con una disminución en IκBα (Figuras 3b, 3f, paneles de la izquierda) o, en el caso de inducción con BLYS/BAFF, se detectó una fosforilación de IκBα con ningún cambio visible en sus niveles celulares (Figura 3d, panel izquierdo). CD40L y BLYS/BAFF también indujeron un gran aumento de p52 nuclear, así como de RelB, reflejando ambos la activación de la vía alternativa (Figuras 3a, 3c, paneles de la izquierda). TNF inducía una translocación nuclear de RelB, pero solo un ligero aumento de p52 nuclear (Figura 3e, el panel de la izquierda). La evaluación de la coimmunoprecipitación de diversas proteínas de NF-κB a partir de extractos nucleares de células Ramos, confirmaron que aunque CD70 aumenta la acumulación nuclear principalmente de RelB:p52, también aumenta la de RelB:p100, TNF induce un aumento de los niveles nucleares de RelB:p100 sin aumentar RelB:p52 (Figura 3g).

35 La inducción de la vía de NF-κB a través de CD40L, BLYS/BAFF, TNF, tapsigargina y PMA se sometió a ensayo en células Ramos en las que se había detenido la expresión de NIK. Todos los efectos de CD40L y BLYS sobre la activación de NF-κB (translocación nuclear de p100, p52, p65 y RelB así como degradación de IκBα en el citoplasma) se detuvieron en las células Ramos NIK^(MENOS) (Figuras 3 a-d, paneles de la derecha). En contraste, la inducción de la degradación de IκBα a través de TNF y la translocación nuclear resultante de p65, así como la inducción de la translocación nuclear de p100 y RelB, se produjeron en las células NIK^(MENOS), con la misma eficacia que en las células que expresaban NIK (Figuras 3e, 3f, paneles de la derecha). El agotamiento de NIK tampoco tuvo ningún efecto sobre la degradación de IκBα como respuesta a la tapsigargina, un inhibidor de la adenosina trifosfatasa Ca²⁺ del retículo sarcoplásmico que desencadena la activación de NF-κB a través de la inducción de estrés del retículo endoplásmico (Pahl y Baeuerle, 1996), o a 4β-forbol-12-miristato-13-acetato (PMA), un agente de activación de NF-κB a través de la estimulación de PKC (Sen y Baltimore, 1986) (Figura 3h).

45 Además de la pérdida de falta de respuesta a los efectos de CD70, CD40 y BLYS/BAFF sobre NF-κB, las células Ramos NIK^(MENOS) también mostraban algunas alteraciones constitutivas de sus niveles basales de proteínas NF-κB. Mostraron una marcada reducción de p52 basal y una disminución significativa de RelB y c-Rel, así como una cierta reducción de p100 e IκBα (Figuras 3e, 3f y 3i). La expresión de todas las proteínas anteriores depende en parte de la activación de NF-κB (Hannink y Temin, 1990; Ten et al., 1992; Lombardi et al., 1995 y Bren et al., 2001). p65, cuya expresión es independiente de NF-κB (Ueberle et al., 1993), se produjo en células NIK^(MENOS) en cantidades normales (Figura 3i), aunque se redujo su nivel nuclear basal (Figura 2e). Estas alteraciones constitutivas de los niveles de proteínas NF-κB en las células NIK^(MENOS) evocan a las observadas en los linfocitos de los ratones *aly* (Yamada et al., 2000). Probablemente reflejan la detención de los efectos de algunos mediador(es) autocrinos que activan continuamente NF-κB ligeramente, de una manera dependiente de NIK.

55 *Ejemplo 4*

Efecto de los anticuerpos contra el bucle de activación fosforilado de NIK sobre la degradación de IκBα

Anticuerpos contra el bucle de activación fosforilado de NIK (αp-NIK) se introdujeron en células Ramos y BJAB creando instantáneamente la eliminación de la activación de NIK. Se midió el efecto de estos anticuerpos sobre la

inducción de la degradación de IκBα a través de CD70 y CD40L y TNF.

Reactivos:

5 CD70 se produjo tal y como se ha descrito en el Ejemplo 2 de la sección de Ejemplos. CD40L fue producido tal y como se ha descrito en el Ejemplo 3 de la sección de Ejemplos. TNF se obtuvo tal y como se ha descrito en el Ejemplo 3 de la sección de Ejemplos. [³²P]ATP se adquirió de Amersham Biosciences.

Anticuerpos:

10 El anticuerpo de IκBα se describe en el Ejemplo 2 de la sección de Ejemplos. El anticuerpo monoclonal anti-myc se purificó tal y como se ha descrito en el Ejemplo 1 de la sección de Ejemplos. Un anticuerpo monoclonal contra el bucle de activación de NIK fosforilado (α-pNIK) se obtuvo mediante la inmunización de ratones con un péptido acoplado a KLH, correspondiente al bucle de activación de NIK en el que Thr559 se había fosforilado. El anticuerpo monoclonal anti-NIK, NIK-81, se obtuvo tal y como se ha descrito en el Ejemplo 2 de la sección de Ejemplos. Ambos anticuerpos monoclonales anti-NIK se purificaron en columnas de afinidad a las que se habían acoplado sus péptidos correspondientes.

Células:

15 Las células Ramos y las células HEK293T se han descrito en el Ejemplo 1 de la sección de Ejemplos. Las células BJAB (Clements et al., 1975) se cultivaron en medio RPMI complementado con 10% de suero de ternera fetal, 100 U/ml de penicilina, y 100 µg/ml de estreptomina.

Vectores de expresión:

20 Los ADNc para los dominios extracelulares de CD70 se clonaron tal y como se ha descrito en el Ejemplo 2 de la sección de Ejemplos. hCD154 (CD40L) y hBLyS/BAFF se clonaron tal y como se ha descrito en el Ejemplo 3 de la sección de Ejemplos.

Transfecciones, inmunotransferencia e inmunoprecipitaciones:

Las transfecciones, la inmunotransferencia y las inmunoprecipitaciones se realizaron tal y como se han descrito en el Ejemplo 1 y en el Ejemplo 2 de la sección de Ejemplos.

25 Transfección de anticuerpos:

Los anticuerpos se transfectaron en células en medio exento de suero utilizando el kit Pro-ject Protein Transfection Reagent (Pierce), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se aplicaron los ligandos en medio regular (que contenía suero) (RPMI 1640 con 10% de FBS), 3-4 horas después de la transfección del anticuerpo.

Evaluación de la absorción de inmunoglobulina marcada con FITC:

30 La evaluación de la captación de inmunoglobulina marcada con FITC se realizó a través de microscopía de fluorescencia, 0, 1, 4 y 8 horas después de la transfección.

35 La activación de NIK, se eliminó de forma instantánea con el fin de excluir la posibilidad de que las diferencias de los efectos de los ligandos, observadas entre las células NIK^(MENOS) y las células normales fueran secundarias a tales alteraciones constitutivas que ocurren en las células como consecuencia de una carencia prolongada de NIK. La activación de NIK implica la fosforilación de su bucle de activación (Lin et al., 1998). Se observó que un anticuerpo monoclonal que se obtuvo contra un fosfopéptido correspondiente al bucle de activación de NIK fosforilado (α-pNIK) y que se introdujo en células Ramos, bloqueaba de manera eficaz la función cinasa *in vitro* de NIK en una forma dependiente de la dosis (Figura 4a, panel superior). La Figura 4b ilustra que el tratamiento de células Ramos con un kit de transfección de proteínas permitía la introducción eficaz, aunque transitoria de inmunoglobulinas en las células. La introducción de los anticuerpos α-pNIK en las células Ramos no tuvo ningún efecto sobre la inducción de la degradación de IκBα a través de TNF. Sin embargo, los anticuerpos bloqueaban eficazmente la inducción de la degradación de IκBα a través de CD70 o CD40L (Figura 4c). En las células BJAB, CD40L inducía la degradación de IκBα y esta inducción se redujo significativamente cuando se introdujeron los anticuerpos α-pNIK (Figura 4d). Estos hallazgos confirman adicionalmente que, aunque NIK no participa en la activación de la vía canónica a través de TNF, su función en los linfocitos es crucial para la activación de la vía canónica a través de otros ligandos.

Ejemplo 5

Efecto de CD70 sobre la activación de la vía canónica

50 Se compararon las capacidades de TNF y CD70 para activar el señalosoma IKK. Su efecto sobre los mecanismos, de la vía canónica se examinó en células testigo y carentes de NIK. El efecto de la presencia de NIK en las células se evaluó mediante análisis de transferencia Western de las mismas moléculas sobre células con NIK inhibida.

Reactivos:

CD70 se describe en el Ejemplo 2 de la sección de Ejemplos, TNF se describe en el Ejemplo 3 de la sección de Ejemplos.

Anticuerpos:

5 Anti-myc se purificó tal y como se ha descrito en el Ejemplo 1 de la sección de Ejemplos. Anti-IkBa y anti-NIK (NIK-81) se describen en el Ejemplo 2 de la sección de Ejemplos. Anti-fosfo-IkBa se describe en el Ejemplo 3 de la sección de Ejemplos. El anticuerpo contra el bucle de activación de NIK fosforilado (α -pNIK) se describe en el Ejemplo 4 de la sección de Ejemplos. Las perlas M2 anti-FLAG se adquirieron en Sigma. IKK α (M280 y H744) en Santa Cruz Biotechnology, anti-IKK β y anti-IKK γ en BD-Pharmingen.

10 Células:

Las células Ramos y las células PBMC se han descrito en el Ejemplo 2 de la sección de Ejemplos.

Vectores de expresión:

GST-IkBa fue un regalo de Signal pharmaceuticals. Los vectores que inhiben a NIK se describen en el Ejemplo 2 de la sección de Ejemplos.

15 Transfecciones, inmunotransferencia e inmunoprecipitaciones:

Las transfecciones, la inmunotransferencia y las inmunoprecipitaciones se realizaron tal y como se ha descrito en el Ejemplo 2 y en el Ejemplo 3 de la sección de Ejemplos. Para la inmunoprecipitación de los complejos ligando-receptor CD70/CD27 desde células PBMC y Ramos en reposo, se prepararon lisados celulares tal y como se ha descrito para los ensayos de cinasa mencionados anteriormente y se incubaron durante 4 horas a 4°C con 25 μ l de 50% de perlas de agarosa M2-FLAG por ml de lisado. El complejo del receptor de TNF se precipitó tal y como se ha descrito (Zhang et al., 2000). El señalosoma procedente de lisados celulares se inmunoprecipitó utilizando una mezcla 1:1 de dos anticuerpos diferentes contra IKK1 (M-280 y H-744, Santa Cruz). Se permitió que la inmunoprecipitación continuara durante 2 horas a 4°C, utilizando 10 μ g de anticuerpos anti-IKK α adsorbidos a 25 μ l de perlas de 50% de proteína-A-Sefarosa por ml de lisado.

25 La fosforilación *in vitro* de GST-IkBa en células Ramos normales y NIK^(MENOS) se realizó estimulando las células durante los períodos de tiempo indicados (0, 0,25 y 4 horas) (Figura 5a) con CD70 o TNF.

Pruebas de cinasa:

La actividad cinasa IKK *in vitro* de los complejos de receptor y del complejo del señalosoma citoplásmico, utilizando GST-IkBa expresada en bacterias (1-54) (Uhlik et al., 1998 y Dejardin et al., 2002)) como sustrato, se evaluó como se ha descrito previamente (Uhlik et al., 1998 y Dejardin et al., 2002). Brevemente, 2-4 x 10⁸ células Ramos se lisaron mediante rotación durante 30 minutos a 4°C en tampón de lisis (HEPES 20 mM, pH 7,6, NaCl 250 mM, 0,5% de NP-40, β -glicerofosfato 20 mM, EDTA 1 mM, fosfato de p-nitrofenilo 20 mM, vanadato de sodio 0,1 mM, fluoruro de sodio 2 mM, DTT 1 mM, PMSF 1 mM y 1x la mezcla inhibidora de proteasa completa). Los residuos celulares se eliminaron por centrifugación a 10.000 x g y el material lisado se aclaró previamente con perlas de proteína A/G sobre las que se había adsorbido suero preinmune de conejo/ratón, y después se sometió a inmunoprecipitación durante 2 horas a 4°C. Los inmunoprecipitados se lavaron cuatro veces con tampón de lisis y dos veces con tampón de cinasa (HEPES 20 mM pH 7,6, MgCl₂ 20 mM, β -glicerofosfato 20 mM, EDTA 1 mM, fosfato de p-nitrofenilo 2 mM y DTT 2 mM). La reacción de la cinasa se permitió continuar incubando las proteínas inmunoprecipitadas unidas a perlas de 20 μ l en tampón de cinasa (40 μ l) que contenía 1 μ g de GST-IkBa (1-54) y 5 μ Ci de [³²P]ATP a 30°C durante 30 minutos. La actividad cinasa de NIK se determinó en las mismas condiciones, empleando NIK marcada con myc que se había hiperexpresado en células HEK293T transfectadas y se inmunoprecipitaron usando anticuerpos anti-myc. El ensayo de cinasa se llevó a cabo en presencia de α -pNIK o IgG como testigo, después de la preincubación del inmunoprecipitado con los anticuerpos durante 1 hora a 4°C. Las muestras de las reacciones de cinasa se separaron en SDS-PAGE, se transfirieron a membranas de nitrocelulosa, se visualizaron mediante autorradiografía y las proteínas indicadas se sometieron a análisis de transferencia Western.

La activación de la vía canónica a través de CD70 está asociada con una incorporación selectiva dependiente de NIK, de IKK1 en CD27:

50 El evento decisivo en la vía canónica es la estimulación de la actividad cinasa de IkB del complejo del señalosoma IKK. Las capacidades de TNF y CD70 para activar el señalosoma IKK se compararon con el fin de examinar las diferencias en los mecanismos de activación de la vía canónica a través de estos dos ligandos.

Se observó que tanto TNF como CD70 mejoraban la función cinasa *in vitro* del señalosoma IKK, que se manifestaba con la fosforilación de GST-IkBa (Figura 5a), así como en la autofosforilación de las IKKs y la fosforilación de NEMO (Figura 5b). Sin embargo, aunque la activación del señalosoma a través de TNF no estaba afectada por la carencia de NIK, el efecto de CD70 sobre el señalosoma se anuló en las células NIK^(MENOS) (Figura 5a, b).

Después de la activación del señalosoma a través de TNF, los tres componentes del señalosoma (IKK1, IKK2 y NEMO) fueron incorporados, con aproximadamente la misma proporción que la que se observó en el complejo que forman en el citosol. La incorporación del señalosoma en el receptor de TNF p55 después del tratamiento con TNF, se induce con la misma eficacia en las células NIK^(MENOS) que en las células de tipo silvestre (Figura 5c, paneles de la derecha). CD70 parece inducir la incorporación de solo uno de los tres componentes del señalosoma canónico, IKK1, en CD27 y su incorporación en CD27 después del tratamiento con CD70, está completamente anulada en las células NIK^(MENOS), lo que indica que se requiere la función NIK para este proceso (Figura 5c, paneles de la izquierda). Una incorporación selectiva similar de IKK1 en CD27 después del tratamiento con CD70, también se observó en PBMC (Figura 5d). En el caso tanto del receptor de TNF p55 como de CD27, la actividad cinasa de las IKKs asociadas con los receptores era más débil que la del señalosoma citoplásmico (fosforilación de GST-IκBα en los paneles superior e inferior de la Figura 5c y también en los paneles de la derecha y la izquierda de la Figura 5d), lo que sugiere que la incorporación no da como resultado una activación completa del señalosoma, sino simplemente la iniciación del proceso de activación.

El evento más temprano conocido en la activación del señalosoma a través de TNF es su incorporación en el receptor de TNF p55, un proceso facilitado por la incorporación de la proteína adaptadora RIP y TRAF2 en ese receptor. CD70 no induce la incorporación de RIP en CD27, sin embargo, como se muestra en la Figura 6a, induce la incorporación de TRAF2. Curiosamente, las moléculas de TRAF2 incorporadas en CD27 muestran una amplia modificación del patrón electroforético, que se corresponde probablemente con la ubiquitinación. CD70 también inducía la incorporación del señalosoma. La incorporación del señalosoma en el receptor de TNF se prolongaba, mientras que la asociación de los tres componentes del señalosoma con CD27 solo se pudo observar durante unos pocos minutos. Posteriormente las cantidades de IKK2 y NEMO en el complejo de CD27 disminuyeron considerablemente. Sorprendentemente, sin embargo, las cantidades de IKK1 asociadas con el receptor se mantuvieron elevadas durante mucho tiempo (Figura 6a, panel izquierdo). Un mantenimiento selectivo similar de IKK1 en asociación con CD27 después del tratamiento con CD70, también se observó en PBMC (Figura 6b).

Tanto TNF como CD70 también inducían la incorporación de los tres componentes del complejo canónico de NF-κB, IκBα, p65 y p50. Aunque el procesamiento de p100 está inducido por CD70 y no por TNF, la incorporación de p100 en su receptor estaba inducida por TNF pero no por CD70 (Figura 6a, panel derecho). Esta incorporación se había sugerido previamente que tenía lugar a través de la unión del dominio de muerte en p100 con el de la proteína adaptadora asociada al receptor de TNF p55, TRADD, y parece que no sirve para activar NF-κB, sino para amplificar la inducción de muerte a través de este receptor mediante la activación de la caspasa-8 (Wang et al. 2002).

En las células NIK, la incorporación en el receptor TNF p55 se produjo con la misma eficacia que en las células de tipo silvestre (Figura 6c, panel derecho). Por el contrario, la incorporación de los componentes del señalosoma en CD27 estaba completamente anulada (Figuras 6c, d, paneles de la izquierda). La introducción de NIK de tipo silvestre, pero no de NIK con "cinasa-muerte", a las células NIK restablecía la incorporación como respuesta a CD70 (Figura 6d, paneles medio y de la derecha).

CD70, pero no TNF, también inducía la incorporación de NIK a su receptor. Esta incorporación se pudo observar tanto en las células que expresaban la enzima de tipo silvestre como en las que expresaban su mutante "nik-muerte" (Figura 6d). Por lo tanto, aunque la incorporación de los componentes del señalosoma en CD27 depende de la función cinasa de NIK, la incorporación de la propia NIK en el receptor parece que tiene lugar de forma independiente de su actividad enzimática.

Ejemplo 6

Modelo especulativo de los mecanismos que inician la activación de NF-κB a través de TNF y CD70

Después de comparar los eventos iniciadores de la activación de NF-κB independiente de NIK a través de TNF y de la activación dependiente de NIK a través de CD70, observamos que la participación de NIK en la activación de la vía canónica se limita al efecto de inductores específicos.

La activación de NF-κB a través del receptor de TNF p55 está asociada con la incorporación de todo el señalosoma en él, y en el proceso los componentes del señalosoma interaccionan con TRAF2 y RIP (Zhang et al., 2000) (Devin et al., 2000) (Devin et al., 2001). La activación de la vía canónica a través de CD70, igual que su activación a través de TNF, está asociada con la incorporación de los componentes del señalosoma IKK1, IKK2 y NEMO en el complejo del receptor. Sin embargo, a diferencia de TNF, CD70 induce también la incorporación de NIK y los componentes del señalosoma IKK2 y NEMO en su receptor.

La incorporación del señalosoma junto con NIK en CD27 está seguida poco después por una fuerte disminución tanto de IKK2 como de NEMO en el complejo del receptor. IKK1 y NIK, sin embargo, siguen estando asociadas con el receptor durante mucho tiempo. La última forma del complejo CD27 sirve probablemente para iniciar la vía alternativa (véase el modelo hipotético en la Figura 7).

Al igual que la incorporación de todo el señalosoma en CD27, la asociación preferida posterior de IKK1 con el receptor no se puede observar en células carentes de NIK o en células que expresan mutantes de NIK no funcionales.

Al parecer, estas dos etapas de la incorporación a través de CD70 están ligadas mecánicamente, lo que garantiza que el inicio de la vía de activación alternativa dependiente de NIK está acoplado con el de la vía canónica.

De acuerdo con la invención, se encontró que NIK se une a SIVA, una proteína que parece estar asociada con CD27 (Prasad et al., 1997). Estudios de la técnica anterior han mostrado que SIVA media en la inducción de la muerte celular a través de CD27. Sin embargo, la inducción de muerte parece estar restringida a solo una de las dos variantes conocidas por corte y empalme de SIVA, a saber, SIVA1, que contiene un motivo de dominio muerte (Yoon et al., 1999). Observamos que tanto SIVA2 (que carece de un dominio de muerte) como SIVA1 se unen a NIK a través de una región C-terminal común a las dos variantes por corte y empalme, e incrementan fuertemente la activación de NF- κ B mediante NIK hiperexpresada. El hecho de que SIVA no incremente la activación de NF- κ B mediante el mutante *aly* de NIK no funcional, da crédito a la posibilidad de que SIVA tenga algún papel en la activación de NF- κ B a través de NIK. Si esta función se refiere efectivamente a la activación de la función NIK a través de CD27, o a algún otro aspecto de la función NIK, todavía no se ha aclarado. De ninguno de los otros receptores que han mostrado hasta ahora que NIK está implicada en su señalización, se conoce que se una a SIVA. Estos receptores podrían incluir algunas otras proteínas adaptadoras en la activación de NIK.

Las actividades mediadas por las vías canónica y alternativa de la activación de NF- κ B, aunque son distintas, también están relacionados entre sí. Los dímeros de NF- κ B generados por las dos vías reconocen diferentes motivos de la secuencia de ADN, y por lo tanto, afectan a promotores diferentes que pueden controlar la expresión de genes distintos (Perkins et al., 1992) (Lin et al., 1995) (Dejardin et al., 2002) (Hoffmann et al., 2003). Las dos vías también poseen diferentes características cinéticas. La activación de la vía canónica es rápida y resulta ser transitoria, debido principalmente a que induce la síntesis de proteínas inhibitoras de NF- κ B, tales como I κ B y NF- κ B2/p100. En contraste, la vía alternativa consigue una activación eficaz solo varias horas después de la estimulación y permanece activa durante mucho tiempo. Estas diferencias permiten que las dos vías controlen diferentes grupos de genes, que sirven para diferentes funciones. Por lo tanto, consistentemente con su rápida inducción, los dímeros activados por la vía canónica controlan un conjunto de genes que median en la respuesta inmune temprana innata, mientras que los dímeros generados por la vía alternativa controlan actividades que contribuyen en una variedad de formas a la respuesta inmune adaptativa prolongada e inducida más lentamente. Estas diferencias en la función se correlacionan con las funciones atribuidas a los ligandos que controlan las dos actividades. Las citocinas proinflamatorias tales como TNF e interferón IL-1 pueden estimular potentemente la vía canónica, sin embargo, tienen poca capacidad, si es que tienen alguna, para estimular la vía alternativa, mientras que ligandos tales como LT α 1 β 2, CD40L, BLYS/BAFF y CD70, que controlan la inmunidad adaptativa, también pueden desencadenar eficazmente la vía alternativa, además de activar la vía canónica.

Sin embargo, el mero hecho de que los mismos ligandos que activan la vía alternativa también activen la vía canónica, permite interacciones funcionales entre los genes regulados por estas dos vías. Por otra parte, las dos vías de señalización interaccionan, afectando a la activación de cada una. La inducción de la vía canónica desencadena la síntesis de p100 así como de RelB (de Wit et al., 1998) (Bren et al., 2001), formando ambas el dímero precursor afectado por la vía alternativa, y por lo tanto potenciando esta última. A la inversa, ya que además de la unión a RelB, p100 también se asocia con los dímeros controlados por la vía canónica (p65:p50 y c-Rel:p50) y por lo tanto bloquea su función, su procesamiento a través de la vía alternativa ayuda a conservar la activación de la vía canónica.

Para permitir la coordinación de los mecanismos de activación para los dos grupos de dímeros de NF- κ B funcionalmente distintos que interaccionan, a través del mismo inductor, tienen que estar controlados por elementos reguladores comunes y distintos. Otros estudios han revelado varios componentes únicos para la vía alternativa o canónica. Mostramos, por primera vez, que NIK puede servir como un participante común en estas dos vías diferentes de activación de NF- κ B.

Referencias citadas

(Referencias adicionales se citan en el texto)

- 5 Akiba, H., Nakano, H., Nishinaka, S., Shindo, M., Kobata, T., Atsuta, M., Morimoto, C., Ware, C. F., Malinin, N. L., Wallach, D., et al. (1998). CD27, a member of the tumor necrosis factor receptor superfamily, activates NF-kappaB and stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase via TRAF2, TRAF5, and NF-kappaB-inducing kinase. *J Biol Chem* 273, 13353-13358.
- Baeuerle, P. A. y Baltimore, D. (1996). NF-kB: ten years after. *Cell* 87, 13-20.
- 10 Benjamin, D., Magrath, I. T., Maguire, R., Janus, C, Todd, H. D. y Parsons, R. G. (1982). Immunoglobulin secretion by cell lines derived from African and American undifferentiated lymphomas of Burkitt's and non-Burkitt's type. *J Immunol* 129, 1336-1342.
- Berberich, I., Shu, G. L. y Clark, E. A. (1994). Cross-linking CD40 on B cells rapidly activates nuclear factor-kappa B. *J Immunol* 153, 4357-4366.
- Bren, G. D., Solan, N. J., Miyoshi, H., Pennington, K. N., Pobst, L. J. y Paya, C. V. (2001). Transcription of the RelB gene is regulated by NF-kappaB. *Oncogene* 20, 7722-7733.
- 15 Brummelkamp, T. R., Bernards, R. y Agami, R. (2002). A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science* 296, 550-553.
- Camerini, D., Walz, G., Loenen, W. A., Borst, J. y Seed, B. (1991). The T cell activation antigen CD27 is a member of the nerve growth factor/tumor necrosis factor receptor gene family. *J Immunol* 147, 3165-3169.
- 20 Claudio, E., Brown, K., Park, S., Wang, H. y Siebenlist, U. (2002). BAFF-induced NEMO-independent processing of NF-kB2 in maturing B cells. *Nat Immunol* 3, 958-965.
- Clements, G. B., Klein, G. y Povey, S. (1975). Production by EBV infection of an EBNA-positive subline from an EBNA-negative human lymphoma cell line without detectable EBV DNA. *Int J Cancer* 16, 125-133.
- Coope, H. J., Atkinson, P. G., Huhse, B., Belich, M., Janzen, J., Holman, M. J., Klaus, G. G., Johnston, L. H. y Ley, S. C. (2002). CD40 regulates the processing of NF-kappaB2 p100 to p52. *Embo J* 21, 5375-5385.
- 25 de Jong, R., Loenen, W. A., Brouwer, M., van Emmerik, L., de Vries, E. F., Borst, J. y van Lier, R. A. (1991). Regulation of expression of CD27, a T cell-specific member of a novel family of membrane receptors. *J Immunol* 146, 2488-2494.
- de Wit, H., Dokter, W. H., Koopmans, S. B., Lummen, C., van der Leij, M., Smit, J. W. y Vellenga, E. (1998). Regulation of p100 (NFkB2) expression in human monocytes in response to inflammatory mediators and lymphokines. *Leukemia* 12, 363-370.
- 30 Dejardin, E., Droin, N. M., Delhase, M., Haas, E., Cao, Y., Makris, C., Li, Z. W., Karin, M., Ware, C. F. y Green, D. R. (2002). The lymphotoxin-beta receptor induces different patterns of gene expression via two NF-kappaB pathways. *Immunity* 17, 525-535.
- 35 Derudder, E., Dejardin, E., Pritchard, L. L., Green, D. R., Korner, M. y Baud, V. (2003). RelB/p50 dimers are differentially regulated by tumor necrosis factor-alpha and lymphotoxin-beta receptor activation: critical roles for p100. *J Biol Chem* 278, 23278-23284.
- Devin, A., Cook, A., Lin, Y., Rodriguez, Y., Kelliher, M. y Liu, Z. (2000). The distinct roles of TRAF2 and RIP in IKK activation by TNF-R1: TRAF2 recruits IKK to TNF-R1 while RIP mediates IKK activation. *Immunity* 12, 419-429.
- 40 Devin, A., Lin, Y., Yamaoka, S., Li, Z., Karin, M. y Liu, Z. (2001). The alpha and beta subunits of IkappaB kinase (IKK) mediate TRAF2-dependent IKK recruitment to tumor necrosis factor (TNF) receptor 1 in response to TNF. *Mol Cell Biol* 21, 3986-3994.
- Erllichman, B. y Howard, O. M. (1999). CD27 signals through PKC in human B cell lymphomas. *Cytokine* 11, 476-484.
- 45 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, 1477-1486.
- Fanslow, W. C., Clifford, K. N., Seaman, M., Alderson, M. R., Spriggs, M. K., Armitage, R. J. y Ramsdell, F. (1994). Recombinant CD40 ligand exerts potent biologic effects on T cells. *J Immunol* 152, 4262-4269.
- Ghosh, S. y Karin, M. (2002). Missing pieces in the NF-kappaB puzzle. *Cell* 109 Supl, pág. 81-96.

- Ghosh, S., May, M. J. y Kopp, E. B. (1998). NF- κ B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol* 16, 225-260.
- Hannink, M. y Temin, H. M. (1990). Structure and autoregulation of the c-rel promoter. *Oncogene* 5, 1843-1850.
- 5 Hatada, E. N., Do, R. K., Orlofsky, A., Liou, H. C., Prystowsky, M., MacLennan, I. C., Caamano, J. y Chen-Kiang, S. (2003). NF-kappaB1 p50 is required for BLyS attenuation of apoptosis but dispensable for processing of NF-kappaB2 p100 to p52 in quiescent mature B cells. *J Immunol* 171, 761-768.
- Hintzen, R. Q., Lens, S. M., Beckmann, M. P., Goodwin, R. G., Lynch, D. y van Lier, R. A. (1994). Characterization of the human CD27 ligand, a novel member of the TNF gene family. *J Immunol* 152, 1762-1773.
- 10 Hoffmann, A., Leung, T. H. y Baltimore, D. (2003). Genetic analysis of NF-kappaB/Rel transcription factors defines functional specificities. *Embo J* 22, 5530-5539.
- Karin, M. y Ben-Neriah, Y. (2000). Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-[kappa]B activity. *Annu Rev Immunol* 18, 621-663.
- 15 Karrer, U., Althage, A., Odermatt, B., Hengartner, H. y Zinkernagel, R. M. (2000). Immunodeficiency of alymphoplasia mice (aly/aly) in vivo: structural defect of secondary lymphoid organs and functional B cell defect. *Eur J Immunol* 30, 2799-2807.
- Kayagaki, N., Yan, M., Seshasayee, D., Wang, H., Lee, W., French, D. M., Grewal, I. S., Cochran, A. G., Gordon, N. C., Yin, J., et al. (2002). BAFF/BLyS receptor 3 binds the B cell survival factor BAFF ligand through a discrete surface loop and promotes processing of NF-kappaB2. *Immunity* 17, 515-524.
- 20 Leonardi, A., Vito, P., Mauro, C., Pacifico, F., Ulianich, L., Consiglio, E., Formisano, S. y Di Jeso, B. (2002). Endoplasmic reticulum stress causes thyroglobulin retention in this organelle and triggers activation of nuclear factor-kappa B via tumor necrosis factor receptor-associated factor 2. *Endocrinology* 143, 2169-2177.
- Lin, R., Gewert, D. y Hiscott, J. (1995). Differential transcriptional activation in vitro by NF- κ B/Rel proteins. *J Biol Chem* 270, 3123-3131.
- 25 Lin, X., Mu, Y., Cunningham, E. T., Jr., Marcu, K. B., Geleziunas, R. y Greene, W. C. (1998). Molecular determinants of NF-kappaB-inducing kinase action. *Mol Cell Biol* 18, 5899-5907.
- Ling, L., Cao, Z. y Goeddel, D. V. (1998). NF-kappaB-inducing kinase activates IKK-alpha by phosphorylation of Ser-176. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 3792-3797.
- Locksley, R. M., Killeen, N. y Lenardo, M. J. (2001). The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell* 104, 487-501.
- 30 Lois, C., Hong, E. J., Pease, S., Brown, E. J. y Baltimore, D. (2002). Germline transmission and tissue-specific expression of transgenes delivered by lentiviral vectors. *Science* 295, 868-872.
- Lombardi, L., Ciana, P., Cappellini, C., Trecca, D., Guerrini, L., Migliazza, A., Maiolo, A. T. y Neri, A. (1995). Structural and functional characterization of the promoter regions of the NFKB2 gene. *Nucleic Acids Res* 23, 2328-2336.
- 35 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, 540-544.
- 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, 1584-1591.
- 40 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, 631-636.
- 45 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 J Immunol* 24, 429-434.
- O'Mahony, A., Lin, X., Geleziunas, R. y Greene, W. C. (2000). Activation of the heterodimeric IkappaB kinase alpha (IKKalpha)-IKKbeta complex is directional: IKKalpha regulates IKKbeta under both basal and stimulated conditions. *Mol Cell Biol* 20, 1170-1178.
- 50 Pahl, H. L. y Baeuerle, P. A. (1996). Activation of NF- κ B by ER stress requires both Ca²⁺ and reactive oxygen inter-

- mediates as messengers. *FEBS Lett* 392, 129-136.
- Perkins, N. D., Schmid, R. M., Duckett, C. S., Leung, K., Rice, N. R y Nabel, G. J. (1992). Distinct combinations of NF- κ B subunits determine the specificity of transcriptional activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 1529-1533.
- Pomerantz, J. L. y Baltimore, D. (2002). Two pathways to NF-kappaB. *Mol Cell* 10, 693-695.
- 5 Prasad, K. V., Ao, Z., Yoon, Y., Wu, M. X., Rizk, M., Jacquot, S. y Schlossman, S. F. (1997). CD27, a member of the tumor necrosis factor receptor family, induces apoptosis and binds to Siva, a proapoptotic protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 6346-6351.
- Pulvertaft, J. V. (1964). Cytology of Burkitt's Tumour (African Lymphoma). *Lancet* 39, 238-240.
- 10 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, 373-383.
- Sambrook, J., Fritsch, E. y Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning. A laboratory manual*, Vol 1, 2^a ed. (Cold Spring Harbor, NY, Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Schreiber, E., Matthias, P., Muller, M. M. y Schaffner, W. (1989). Rapid detection of octamer binding proteins with 'mini-extracts', prepared from a small number of cells. *Nucleic Acids Res* 17, 6419.
- 15 Sen, R. y Baltimore, D. (1986). Inducibility of kappa immunoglobulin enhancer-binding protein NF- κ B by a posttranslational mechanism. *Cell* 47, 921-928.
- Senftleben, U., Cao, Y., Xiao, G., Greten, F. R., Krahn, G., Bonizzi, G., Chen, Y., Hu, Y., Fong, A., Sun, S. C. y Karin, M. (2001). Activation by IKKalpha of a second, evolutionary conserved, NF- κ B signaling pathway. *Science* 293, 1495-1499.
- 20 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- κ B-inducing kinase. *Nat Genet* 22, 74-77.
- Solan, N. J., Miyoshi, H., Carmona, E. M., Bren, G. D. y Paya, C. V. (2002). RelB cellular regulation and transcriptional activity are regulated by p100. *J Biol Chem* 277, 1405-1418.
- 25 Song, H. Y., Regnier, C. H., Kirschning, C. J., Goeddel, D. V. y Rothe, M. (1997). Tumor necrosis factor (TNF)-mediated kinase cascades: bifurcation of nuclear factor-kappaB and c-jun N-terminal kinase (JNK/SAPK) pathways at TNF receptor-associated factor 2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 9792-9796.
- Ten, R. M., Paya, C. V., Israel, N., Le Bail, O., Mattei, M. G., Virelizier, J. L., Kourilsky, P. e Israel, A. (1992). The characterization of the promoter of the gene encoding the p50 subunit of NF- κ B indicates that it participates in its own regulation. *Embo J* 11, 195-203.
- 30 Thompson, J. S., Bixler, S. A., Qian, F., Vora, K., Scott, M. L., Cachero, T. G., Hession, C., Schneider, P., Sizing, I. D., Mullen, C., et al. (2001). BAFF-R, a newly identified TNF receptor that specifically interacts with BAFF. *Science* 293, 2108-2111.
- Ueberla, K., Lu, Y., Chung, E. y Haseltine, W. A. (1993). The NF-Kappa B p65 promoter. *J Acquir Immune Defic Syndr* 6, 227-230.
- 35 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, 21132-21136.
- Wallach, D., Varfolomeev, E. E., Malinin, N. L., Goltsev, Y. V., Kovalenko, A. V. y Boldin, M. P. (1999). Tumor necrosis factor receptor and Fas signaling mechanisms. *Annu Rev Immunol* 17, 331-367.
- 40 Xiao, G., Harhaj, E. W. y Sun, S. C. (2001). NF-kappaB-inducing kinase regulates the processing of NF-kappaB2 p100. *Mol Cell* 7, 401-409.
- 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, 21081-21085.
- 45 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- κ B-inducing kinase. *J Immunol* 165, 804-812.
- Yamamoto, H., Kishimoto, T. y Minamoto, S. (1998). NF-kappaB activation in CD27 signaling: involvement of TNF receptor-associated factors in its signaling and identification of functional region of CD27. *J Immunol* 161, 4753-4759.

- Yan, M., Brady, J. R., Chan, B., Lee, W. P., Hsu, B., Harless, S., Cancro, M., Grewal, I. S. y Dixit, V. M. (2001). Identification of a novel receptor for B lymphocyte stimulator that is mutated in a mouse strain with severe B cell deficiency. *Curr Biol* 11, 1547-1552.
- 5 Yilmaz, Z. B., Weih, D. S., Sivakumar, V. y Weih, F. (2003). RelB is required for Peyer's patch development: differential regulation of p52-RelB by lymphotoxin and TNF. *Embo J* 22, 121-130.
- 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^(MINUS) deficient mice. *Science* 291, 2162-2165.
- 10 Yoon, Y., Ao, Z., Cheng, Y., Schlossman, S. F. y Prasad, K. V. (1999). Murine Siva-1 and Siva-2, alternate splice forms of the mouse Siva gene, both bind to CD27 but differentially transduce apoptosis. *Oncogene* 18, 7174-7179.
- Zhang, S. Q., Kovalenko, A., Cantarella, G. y Wallach, D. (2000). Recruitment of the IKK signalosome to the p55 TNF receptor: RIP and A20 bind to NEMO (IKKgamma) upon receptor stimulation. *Immunity* 12, 301-311.

Listado de Secuencias

<110> Wallach, David Ramakrishnan, Parameswaran Shmushkovich, Taisia Wang, Wangxia

5 <120> MÉTODOS PARA REGULAR UNA RESPUESTA INMUNITARIA

<130> 27083

<160> 15

10 <170> PatentIn version 3.2

<210> 1

<211> 2844

15 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 1

```

atggcagtga tggaaatggc ctgccaggt gccctggct cagcagtggt gcagcagaag      60
gaactcccca agccaaagga gaagacgccc cactgggga agaacagag ctccgtctac      120
aagccttgagg ccgtggagaa gagccctgtg ttctgcgaa agtgggagat cctgaatgac      180
gtgattacca agggcacagc caaggaaggc tccgagcag gccagctgc catctctatc      240
atcgcccagg ctgagtgatg gaatagccaa gattcagcc ccaccttttc agaacgcatt      300
ttcatcgtg ggtccaaaca gtacagccag tccgagagtc ttgatcagat cccaacaat      360
gtggcccatg ctacagaggg caaaatggcc cgtgtgtgtt ggaagggaaa gcgtcgagc      420
aaagcccgga agaaacggaa gaagaagagc tcaaagtccc tggctcatgc aggagtggcc      480
ttggccaaac ccctcccag gaccctgag caggagagct gcaccatccc agtgcaggag      540
gatgagtctc cactcggcgc cccatagtgt agaaacccc cgcagttcac caagcctctg      600
aaggaaccag gccttgggca actctgtttt aagcagcttg gcgagggcct acggccggct      660
ctgcctcgat cagaactcca caaactgatc agcccctgc aatgtctgaa ccacgtgtgg      720
aaactgcacc acccccagga cggaggcccc ctgccctgc ccacgcacc cttcccctat      780
agcagactgc ctcatccctt cccattccac cctctccagc cctggaaacc tcaccctctg      840
gagtccttcc tgggcaaaat ggcctgtgta gacagccaga aacccttgcc tgaccacac      900
ctgagcaaac tggcctgtgt agacagtcca aagcccctgc ctggcccaca cctggagccc      960
agctgcctgt ctcgtggtgc ccatgagaag tttctgtgg aggaatacct agtgcagct      1020
ctgcaaggca gcgtgagctc aagccaggcc cacagcctga ccagcctggc caagacctgg      1080
gcagcacggg gctccagatc ccgggagccc agccccaaa ctgaggacaa cgagggtgtc      1140
ctgctcactg agaaactcaa gccagtgat tatgagtacc gagaagaagt cactgggccc      1200
acgcaccagc tccgctggg cagaggctcc ttcggagagg tgcacaggat ggaggacaag      1260
cagactggct tccagtgcgc tgtcaaaaag gtgcggctgg aagtatttcg ggcagaggag      1320
ctgatggcat gtgcaggatt gacctacccc agaattgtcc ctttgtatgg agctgtgaga      1380
gaagggcctt gggtaacat cttcatggag ctgctggaag gtggctccct gggccagctg      1440
gtcaaggagc agggctgtct cccagaggac cgggccctgt actacctggg ccaggccctg      1500
gaggtctgag aatactcca ctcacgaagg attctgcatg gggagctcaa agctgacaac      1560
20 gtgctcctgt ccagcgatgg gagccacgca gccctctgtg actttggcca tgctgtgtgt      1620

```

ES 2 469 670 T3

cttcaacctg atggcctggg aaagtccttg ctcacagggg actacatccc tggcacagag 1680
 acccacatgg ctccggaggt ggtgctgggc aggagctgcg acgccaaggt ggatgtctgg 1740
 agcagctgct gtatgatgct gcacatgctc aacggctgcc acccctggac tcagttcttc 1800
 cgagggccgc tctgctcaa gattgccagc gagcctccgc ctgtgagga gatcccaccc 1860
 tcctgcgccc ctctcacagc ccaggccatc caagaggggc tgaggaaaga gcccatccac 1920
 cgcgtgtctg cagcggagct gggaggggag gtgaaccggg cactacagca agtgggaggt 1980
 ctgaagagcc cttggagggg agaataataa gaaccaagac atccaccgcc aatcaagcc 2040
 aattaccacc agaccctcca tgcccagccg agagagcttt cgccaagggc cccagggccc 2100
 cggccagctg aggagacaac aggcagagcc cctaagctcc agcctcctct cccaccagag 2160
 cccccagagc caaacaagtc tcctcccttg actttgagca aggaggagtc tgggatgtgg 2220
 gaacccttac ctctgtcctc cctggagcca gccctgcca gaaaccccag ctcaccagag 2280
 cggaaagcaa ccgtcccgga gcaggaactg cagcagctgg aatagaatt attcctcaac 2340
 agcctgtccc agccatthtc tctggaggag caggagcaaa ttctctcgtg cctcagcatc 2400
 gacagcctct cctgtctcga tgacagtgag aagaacccat caaaggctc tcaaagctcg 2460
 cgggacaccc tgagctcagg cgtacactcc tggagcagcc aggccgaggc tcgaagctcc 2520
 agctggaaca tgggtctggc ccggggcgcg cccaccgaca cccaagcta tttcaatggt 2580
 gtgaaagtcc aaatacagtc tcttaatggt gaacacctgc acatccggga gttccaccgg 2640
 gtcaaagtgg gagacatcgc cactggcatc agcagccaga tcccagctgc agccttcagc 2700
 ttggtcacca aagacgggca gcctgttcgc tacgacatgg aggtgccaga ctcgggcatc 2760
 gacctgcagt gcacactggc ccctgatggc agcttcgcct ggagctggag ggtcaagcat 2820
 ggccagctgg agaacaggcc ctaa 2844

<210> 2
 <211> 947
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<400> 2

Met Ala Val Met Glu Met Ala Cys Pro Gly Ala Pro Gly Ser Ala Val
 1 5 10 15
 Gly Gln Gln Lys Glu Leu Pro Lys Pro Lys Glu Lys Thr Pro Pro Leu
 20 25 30
 Gly Lys Lys Gln Ser Ser Val Tyr Lys Leu Glu Ala Val Glu Lys Ser
 35 40 45
 Pro Val Phe Cys Gly Lys Trp Glu Ile Leu Asn Asp Val Ile Thr Lys
 50 55 60
 Gly Thr Ala Lys Glu Gly Ser Glu Ala Gly Pro Ala Ala Ile Ser Ile
 65 70 75 80
 Ile Ala Gln Ala Glu Cys Glu Asn Ser Gln Glu Phe Ser Pro Thr Phe
 85 90 95
 Ser Glu Arg Ile Phe Ile Ala Gly Ser Lys Gln Tyr Ser Gln Ser Glu

10

ES 2 469 670 T3

100	105	110
Ser Leu Asp Gln Ile Pro Asn Asn Val Ala His Ala Thr Glu Gly Lys 115 120 125		
Met Ala Arg Val Cys Trp Lys Gly Lys Arg Arg Ser Lys Ala Arg Lys 130 135 140		
Lys Arg Lys Lys Lys Ser Ser Lys Ser Leu Ala His Ala Gly Val Ala 145 150 155 160		
Leu Ala Lys Pro Leu Pro Arg Thr Pro Glu Gln Glu Ser Cys Thr Ile 165 170 175		
Pro Val Gln Glu Asp Glu Ser Pro Leu Gly Ala Pro Tyr Val Arg Asn 180 185 190		
Thr Pro Gln Phe Thr Lys Pro Leu Lys Glu Pro Gly Leu Gly Gln Leu 195 200 205		
Cys Phe Lys Gln Leu Gly Glu Gly Leu Arg Pro Ala Leu Pro Arg Ser 210 215 220		
Glu Leu His Lys Leu Ile Ser Pro Leu Gln Cys Leu Asn His Val Trp 225 230 235 240		
Lys Leu His His Pro Gln Asp Gly Gly Pro Leu Pro Leu Pro Thr His 245 250 255		
Pro Phe Pro Tyr Ser Arg Leu Pro His Pro Phe Pro Phe His Pro Leu 260 265 270		
Gln Pro Trp Lys Pro His Pro Leu Glu Ser Phe Leu Gly Lys Leu Ala 275 280 285		
Cys Val Asp Ser Gln Lys Pro Leu Pro Asp Pro His Leu Ser Lys Leu 290 295 300		
Ala Cys Val Asp Ser Pro Lys Pro Leu Pro Gly Pro His Leu Glu Pro 305 310 315 320		
Ser Cys Leu Ser Arg Gly Ala His Glu Lys Phe Ser Val Glu Glu Tyr 325 330 335		
Leu Val His Ala Leu Gln Gly Ser Val Ser Ser Ser Gln Ala His Ser 340 345 350		
Leu Thr Ser Leu Ala Lys Thr Trp Ala Ala Arg Gly Ser Arg Ser Arg 355 360 365		
Glu Pro Ser Pro Lys Thr Glu Asp Asn Glu Gly Val Leu Leu Thr Glu 370 375 380		
Lys Leu Lys Pro Val Asp Tyr Glu Tyr Arg Glu Glu Val His Trp Ala 385 390 395 400		

ES 2 469 670 T3

Thr His Gln Leu Arg Leu Gly Arg Gly Ser Phe Gly Glu Val His Arg
 405 410 415

Met Glu Asp Lys Gln Thr Gly Phe Gln Cys Ala Val Lys Lys Val Arg
 420 425 430

Leu Glu Val Phe Arg Ala Glu Glu Leu Met Ala Cys Ala Gly Leu Thr
 435 440 445

Ser Pro Arg Ile Val Pro Leu Tyr Gly Ala Val Arg Glu Gly Pro Trp
 450 455 460

Val Asn Ile Phe Met Glu Leu Leu Glu Gly Gly Ser Leu Gly Gln Leu
 465 470 475 480

Val Lys Glu Gln Gly Cys Leu Pro Glu Asp Arg Ala Leu Tyr Tyr Leu
 485 490 495

Gly Gln Ala Leu Glu Gly Leu Glu Tyr Leu His Ser Arg Arg Ile Leu
 500 505 510

His Gly Asp Val Lys Ala Asp Asn Val Leu Leu Ser Ser Asp Gly Ser
 515 520 525

His Ala Ala Leu Cys Asp Phe Gly His Ala Val Cys Leu Gln Pro Asp
 530 535 540

Gly Leu Gly Lys Ser Leu Leu Thr Gly Asp Tyr Ile Pro Gly Thr Glu
 545 550 555 560

Thr His Met Ala Pro Glu Val Val Leu Gly Arg Ser Cys Asp Ala Lys
 565 570 575

Val Asp Val Trp Ser Ser Cys Cys Met Met Leu His Met Leu Asn Gly
 580 585 590

Cys His Pro Trp Thr Gln Phe Phe Arg Gly Pro Leu Cys Leu Lys Ile
 595 600 605

Ala Ser Glu Pro Pro Pro Val Arg Glu Ile Pro Pro Ser Cys Ala Pro
 610 615 620

Leu Thr Ala Gln Ala Ile Gln Glu Gly Leu Arg Lys Glu Pro Ile His
 625 630 635 640

Arg Val Ser Ala Ala Glu Leu Gly Gly Lys Val Asn Arg Ala Leu Gln
 645 650 655

Gln Val Gly Gly Leu Lys Ser Pro Trp Arg Gly Glu Tyr Lys Glu Pro
 660 665 670

Arg His Pro Pro Pro Asn Gln Ala Asn Tyr His Gln Thr Leu His Ala
 675 680 685

Gln Pro Arg Glu Leu Ser Pro Arg Ala Pro Gly Pro Arg Pro Ala Glu
 690 695 700

ES 2 469 670 T3

Glu Thr Thr Gly Arg Ala Pro Lys Leu Gln Pro Pro Leu Pro Pro Glu
705 710 715 720

Pro Pro Glu Pro Asn Lys Ser Pro Pro Leu Thr Leu Ser Lys Glu Glu
725 730 735

Ser Gly Met Trp Glu Pro Leu Pro Leu Ser Ser Leu Glu Pro Ala Pro
740 745 750

Ala Arg Asn Pro Ser Ser Pro Glu Arg Lys Ala Thr Val Pro Glu Gln
755 760 765

Glu Leu Gln Gln Leu Glu Ile Glu Leu Phe Leu Asn Ser Leu Ser Gln
770 775 780

Pro Phe Ser Leu Glu Glu Gln Glu Gln Ile Leu Ser Cys Leu Ser Ile
785 790 795 800

Asp Ser Leu Ser Leu Ser Asp Asp Ser Glu Lys Asn Pro Ser Lys Ala
805 810 815

Ser Gln Ser Ser Arg Asp Thr Leu Ser Ser Gly Val His Ser Trp Ser
820 825 830

Ser Gln Ala Glu Ala Arg Ser Ser Ser Trp Asn Met Val Leu Ala Arg
835 840 845

Gly Arg Pro Thr Asp Thr Pro Ser Tyr Phe Asn Gly Val Lys Val Gln
850 855 860

Ile Gln Ser Leu Asn Gly Glu His Leu His Ile Arg Glu Phe His Arg
865 870 875 880

Val Lys Val Gly Asp Ile Ala Thr Gly Ile Ser Ser Gln Ile Pro Ala
885 890 895

Ala Ala Phe Ser Leu Val Thr Lys Asp Gly Gln Pro Val Arg Tyr Asp
900 905 910

Met Glu Val Pro Asp Ser Gly Ile Asp Leu Gln Cys Thr Leu Ala Pro
915 920 925

Asp Gly Ser Phe Ala Trp Ser Trp Arg Val Lys His Gly Gln Leu Glu
930 935 940

Asn Arg Pro
945

<210> 3
<211> 175
5 <212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 3

10 Met Pro Lys Arg Ser Cys Pro Phe Ala Asp Val Ala Pro Leu Gln Leu
1 5 10 15

ES 2 469 670 T3

Lys Val Arg Val Ser Gln Arg Glu Leu Ser Arg Gly Val Cys Ala Glu
20 25 30

Arg Tyr Ser Gln Glu Val Phe Glu Lys Thr Lys Arg Leu Leu Phe Leu
35 40 45

Gly Ala Gln Ala Tyr Leu Asp His Val Trp Asp Glu Gly Cys Ala Val
50 55 60

Val His Leu Pro Glu Ser Pro Lys Pro Gly Pro Thr Gly Ala Pro Arg
65 70 75 80

Ala Ala Arg Gly Gln Met Leu Ile Gly Pro Asp Gly Arg Leu Ile Arg
85 90 95

Ser Leu Gly Gln Ala Ser Glu Ala Asp Pro Ser Gly Val Ala Ser Ile
100 105 110

Ala Cys Ser Ser Cys Val Arg Ala Val Asp Gly Lys Ala Val Cys Gly
115 120 125

Gln Cys Glu Arg Ala Leu Cys Gly Gln Cys Val Arg Thr Cys Trp Gly
130 135 140

Cys Gly Ser Val Ala Cys Thr Leu Cys Gly Leu Val Asp Cys Ser Asp
145 150 155 160

Met Tyr Glu Lys Val Leu Cys Thr Ser Cys Ala Met Phe Glu Thr
165 170 175

<210> 4

<211> 110

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Met Pro Lys Arg Ser Cys Pro Phe Ala Asp Val Ala Pro Leu Gln Leu
1 5 10 15

Lys Val Arg Val Ser Gln Arg Glu Leu Ser Arg Gly Val Cys Ala Glu
20 25 30

Arg Tyr Ser Gln Glu Val Phe Asp Pro Ser Gly Val Ala Ser Ile Ala
35 40 45

Cys Ser Ser Cys Val Arg Ala Val Asp Gly Lys Ala Val Cys Gly Gln
50 55 60

Cys Glu Arg Ala Leu Cys Gly Gln Cys Val Arg Thr Cys Trp Gly Cys
65 70 75 80

Gly Ser Val Ala Cys Thr Leu Cys Gly Leu Val Asp Cys Ser Asp Met
85 90 95

10 Tyr Glu Lys Val Leu Cys Thr Ser Cys Ala Met Phe Glu Thr
100 105 110

<210> 5

<211> 10

<212> PRT

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Myc tag

ES 2 469 670 T3

<400> 5

Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu
1 5 10

5 <210> 6
<211> 528
<212> ADN
<213> Homo sapiens

10 <400> 6

```

atgcccaagc ggagctgccc cttcgcggac gtggccccgc tacagctcaa ggtccgcgtg 60
agccagaggg agttgagccg cggcgtgtgc gccgagcgtc actcgcagga ggtcttcgag 120
aagaccaagc gactcctgtt cctcggggcc caggcctacc tggaccacgt gtgggatgaa 180
ggctgtgccg tcgttcacct gccagagtcc ccaaagcctg gcctacaggg ggccccgagg 240
gctgcacgtg ggcagatgct gattggacca gacggcccgc tgatcaggag ccttgggcag 300
gcctccgaag ctgaccatc tggggtagcg tccattgcct gttcctcatg cgtgagagcc 360
gtggatggga aggcggtctc cggtcagtgt gagcagagccc tgtgaggcca gtgtgtgcgc 420
acctgctggg gctgcggctc cgtggcctgt accctgtgtg gcctcgtgga ctgcagtgac 480
atgtacgaga aagtgtgtg caccagctgt gccatgttcg agacctga 528

```

15 <210> 7
<211> 333
<212> ADN
<213> Homo sapiens

20 <400> 7

```

atgcccaagc ggagctgccc cttcgcggac gtggccccgc tacagctcaa ggtccgcgtg 60
agccagaggg agttgagccg cggcgtgtgc gccgagcgtc actcgcagga ggtcttcgac 120
ccatctgggg tagcgtccat tgctgttcc tcatgcgtgc gagccgtgga tgggaaggcg 180
gtctgcggtc agtgtgagcg agccctgtgc gggcagtgtg tgcgcacctg ctggggctgc 240
ggctccgtgg cctgtaccct gtgtggcctc gtggactgca gtgacatgta cgagaaagtg 300
ctgtgcacca gctgtgccaat gttcagagacc tga 333

```

25 <210> 8
<211> 34
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> Oligonucleótido de ADN monocatenario

<400> 8

```

ccaagctatt tcaatcgtgt gaaagtcaa atac 34

```

35 <210> 9
<211> 34
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<223> Oligonucleótido de ADN monocatenario

<400> 9

```

gtatttggac ttcacacga ttgaaatagc ttgg 34

```

45

ES 2 469 670 T3

<210> 10
<211> 16
<212> PRT
5 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Un péptido que corresponde a una secuencia dentro del dominio NIK quinasa

10 <400> 10

Arg Leu Gly Arg Gly Ser Phe Gly Glu Val His Arg Met Glu Asp Lys
1 5 10 15

15 <210> 11
<211> 42
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
20 <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario

<400> 11

gagggctcgg aatacctaca ttccgcagg attctgcatg gg 42

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

30 <220>
<223> Oligonucleótido de ADN monocatenario

<400> 12

35 cccatgcaga atctgcggg aatgtaggta ttccagacc tc 42

<210> 13
<211> 64
40 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido de ADN monocatenario

45 <400> 13

gatcccctac ctccactcac gaaggattca agagatcctt cgtgagtgga ggtatTTTTg 60
gaaa 64

50 <210> 14
<211> 64
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

55 <220>
<223> Oligonucleótido de ADN monocatenario

<400> 14

ES 2 469 670 T3

agcttttcca aaaatacctc cactcacgaa ggatctcttg aatccttcgt gagtggaggt 60

aggg 64

<210> 15

<211> 19

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Secuencia de NIK siRNA correspondiente a los nucleótidos 1513 -1531

<400> 15

tacctccact cacgaagga 19

15

REIVINDICACIONES

1. Uso de un agente en la preparación de un medicamento para el tratamiento de un trastorno inmune causado o agravado por una activación anormal de NF- κ B a través de la vía canónica, en donde dicho agente es un anticuerpo capaz de unirse a las coordenadas de aminoácidos 123-175 de SIVA1 (SEQ ID NO: 3) o a las coordenadas de aminoácidos 58-110 de SIVA2 (SEQ ID NO: 4), una molécula de ARN pequeño de interferencia o una ribozima en donde el ARN pequeño de interferencia o la ribozima regula a la baja el gen diana SIVA.
2. Un agente para uso en el tratamiento de un trastorno inmune causado o agravado por una activación anormal de NF- κ B a través de la vía canónica, en donde dicho agente es un anticuerpo capaz de unirse a las coordenadas de aminoácidos 123-175 de SIVA1 (SEQ ID NO: 3) o a las coordenadas de aminoácidos 58-110 de SIVA2 (SEQ ID NO: 4), una molécula de ARN pequeño de interferencia o una ribozima en donde el ARN pequeño de interferencia o la ribozima regula a la baja el gen diana SIVA.
3. El uso según la reivindicación 1 o el agente para uso según la reivindicación 2, en donde dicho trastorno inmune se selecciona entre el grupo que consiste en mieloma múltiple (MM), síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), síndrome de Sjogren (SS), leucemia linfocítica crónica de linfocitos B (LLC-B), lupus eritematoso sistémico, enfermedad de colon inflamatorio, síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SRIS), síndrome de disfunción multiorgánica (SDMO) y síndrome de dificultad respiratoria aguda (SDRA).
4. Un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo capaz de unirse específicamente a una región de una secuencia de aminoácidos indicada por las coordenadas 123-175 de SEQ ID NO: 3.
5. Un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo capaz de unirse específicamente a una región de una secuencia de aminoácidos indicada por las coordenadas 58-110 de SEQ ID NO: 4.
6. Un método *in vitro* para identificar un modulador inmune putativo, comprendiendo el método identificar una molécula capaz de incrementar o disminuir la formación del complejo NIK-SIVA, siendo dicha molécula el modulador inmune putativo.
7. Un método *in vitro* para escrutar moléculas capaces de disminuir la actividad de NIK que comprende poner en contacto una célula con un ligando de un miembro de la familia de receptores de TNF/NGF seleccionado entre CD70, CD40L y Blys/BAFF capaz de inducir la vía canónica y alternativa de NF- κ B dependiente de NIK, incubar la célula antes, durante o después de dicha puesta en contacto con moléculas sometidas a ensayo individuales, detectar la activación de la vía canónica de NF- κ B en la célula y seleccionar la/s moléculas individuales capaces de disminuir la inducción de la vía canónica de NF- κ B inducida por dicho ligando.
8. El método según la reivindicación 7, en donde las células son de tipo linfoblastoide.
9. El método según la reivindicación 7, en donde la/s moléculas seleccionadas son capaces de disminuir la inducción de la vía canónica inducida a través de dicho ligando pero no a través de cualquier otro ligando capaz de inducir la vía canónica de NF- κ B de una manera independiente de NIK.
10. El método según la reivindicación 8 o 9, en donde la célula se selecciona a partir de células Ramos, Raji y BJAB.
11. El método según la reivindicación 9, en donde el ligando capaz de inducir la vía canónica de NF- κ B de una manera independiente de NIK es TNF.
12. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 11, en donde la activación de la vía canónica de NF- κ B se detecta controlando parámetros seleccionados entre la degradación de I κ B, la fosforilación de I κ B α y la translocación de p65.

FIGURA 1

1A

Cebo	Presa	Fuerza de la interacción
NIK	SIVA-c	+
NIK	TRAF2	-
NIK-(624-947)	SIVA-c	++
NIK-(624-947)	TRAF2	+
SIVA-c	NIK-(624-947)	++

1B

myc -NIK
 HIS-SIVA1
 HIS-SIVA2
 myc -*aly* NIK

+	+	+	-	-	-
-	+	-	-	+	-
-	-	+	-	-	+
-	-	-	+	+	+

IP: anti-HIS



IP

WB: anti-myc



Lisado total

1C

HIS-SIVA1
 HIS-SIVA2
 myc-NIK
 myc-*aly* NIK

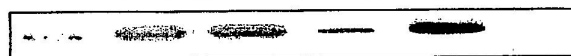
+	+	+	-	-	-
-	-	-	+	+	+
-	+	-	-	+	-
-	-	+	-	-	+

IP: anti-myc



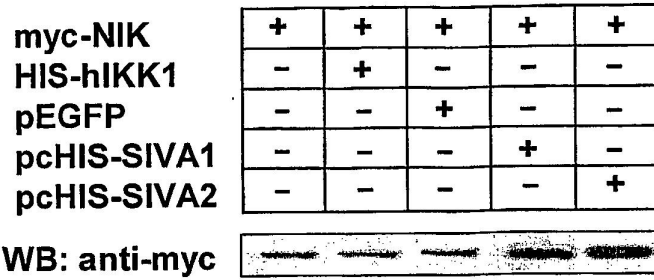
IP

WB: anti-HIS



Lisado total

1D



1E

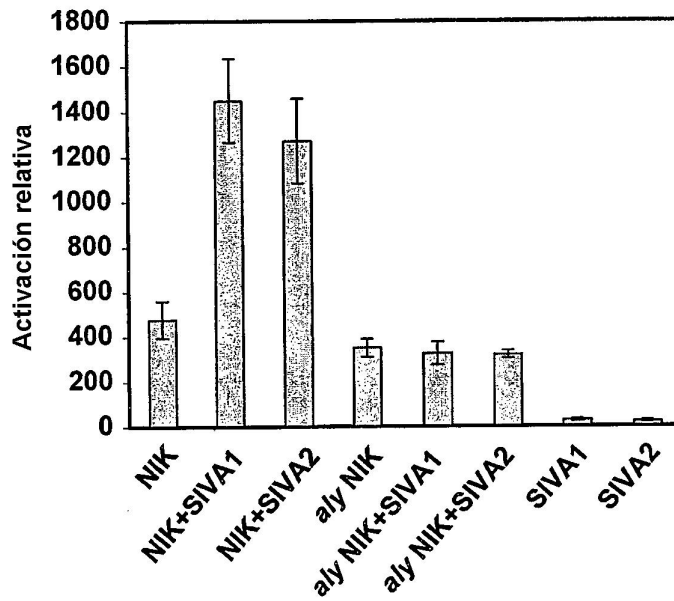


FIGURA 1

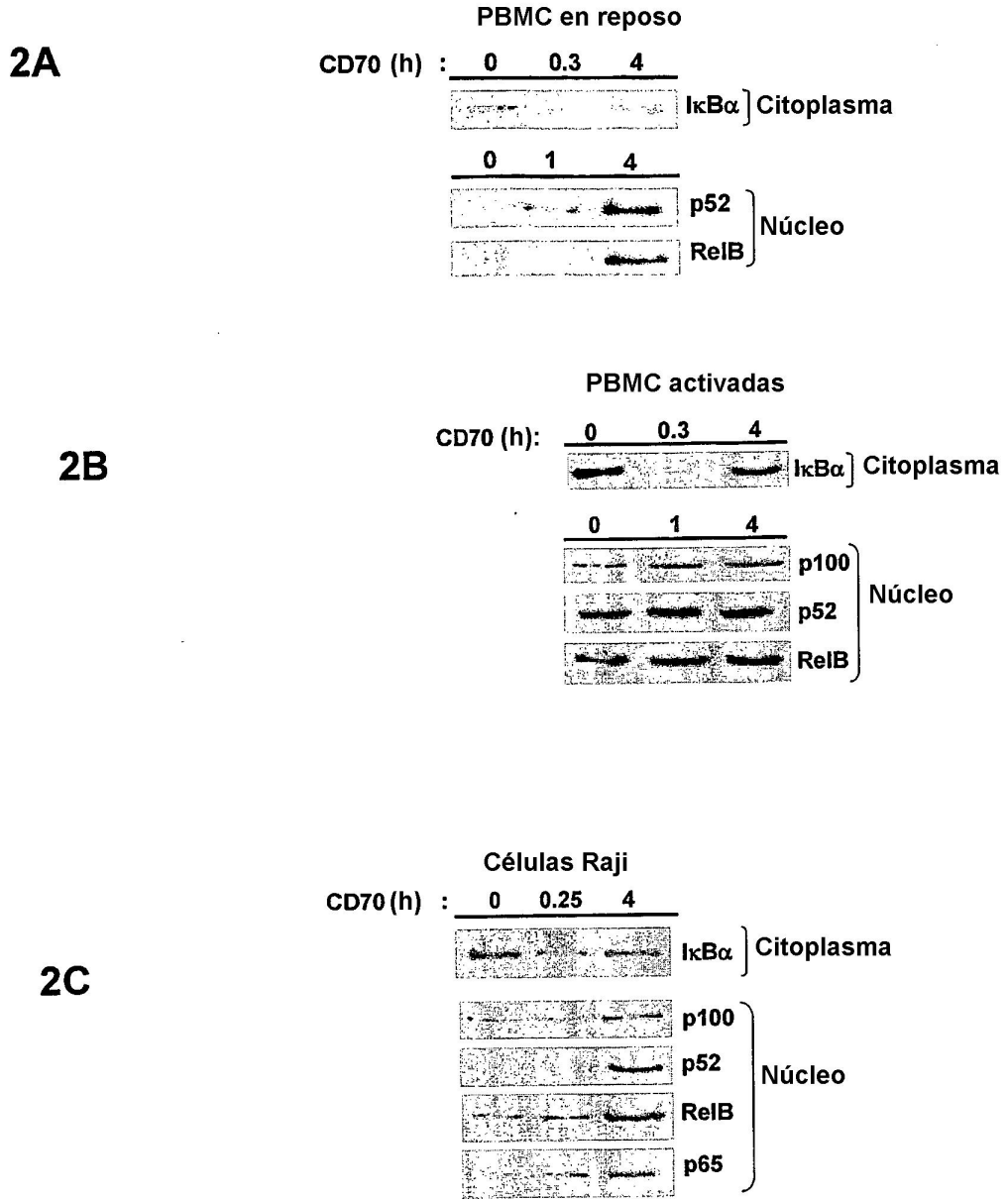


FIGURA 2

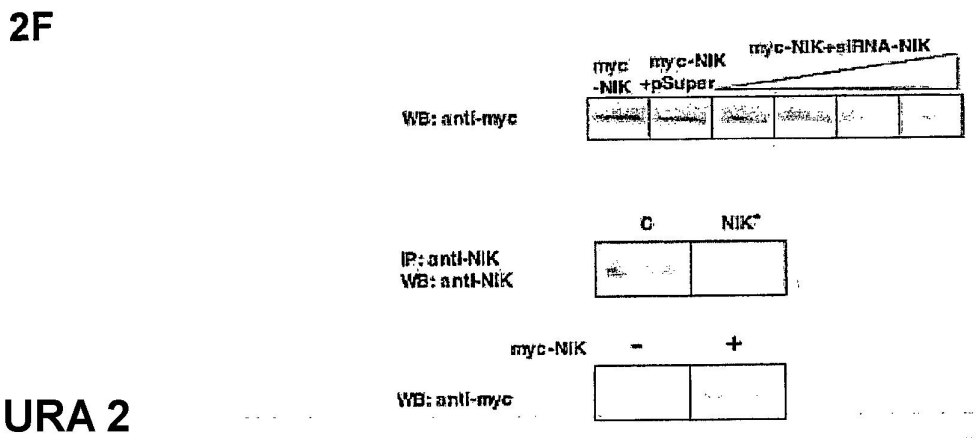
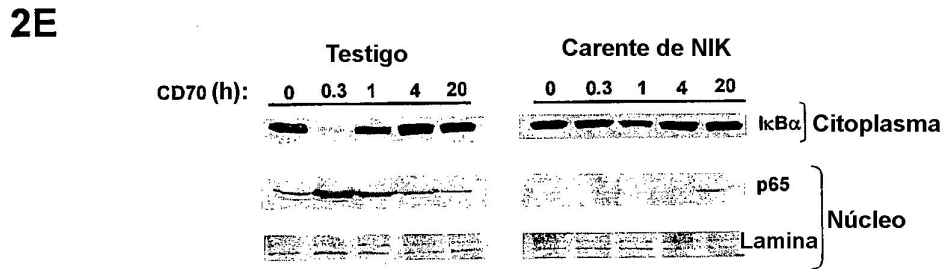
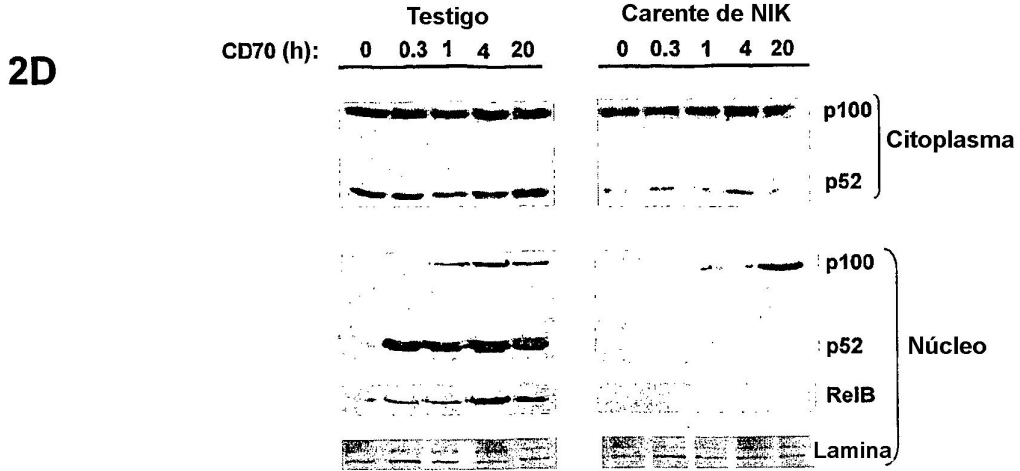
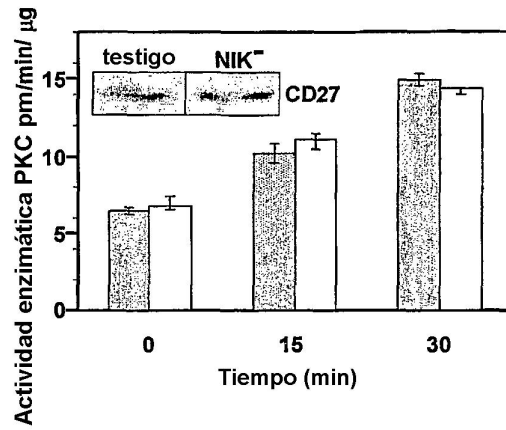


FIGURA 2

2G



2H

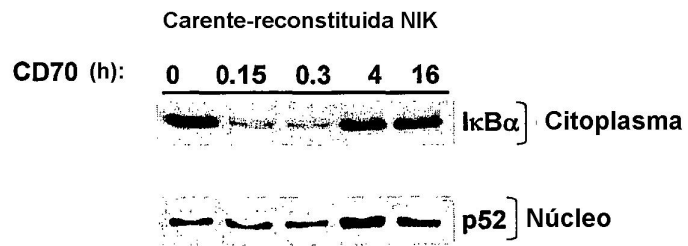


FIGURA 2

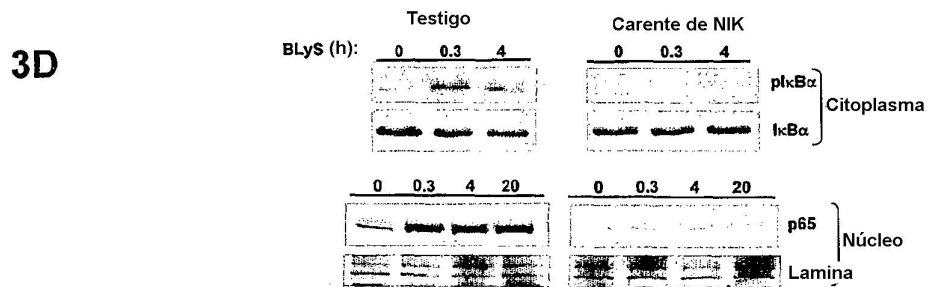
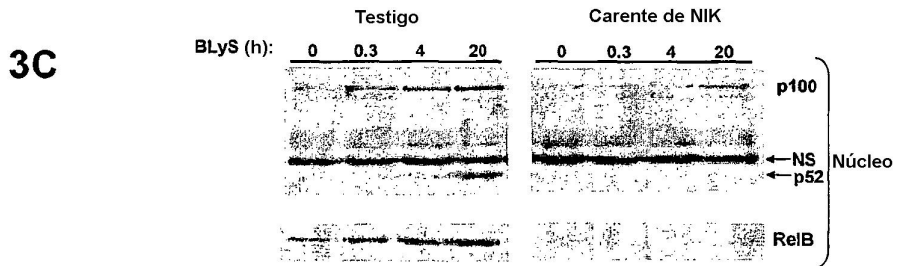
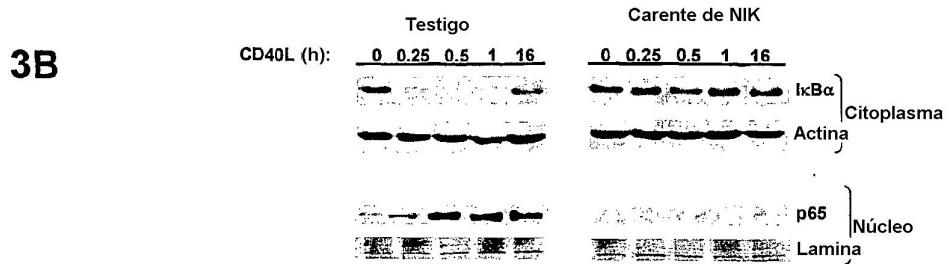
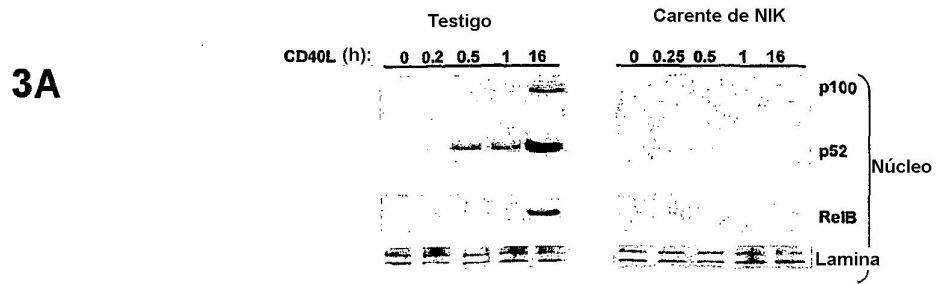
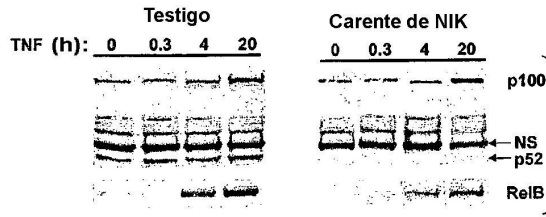
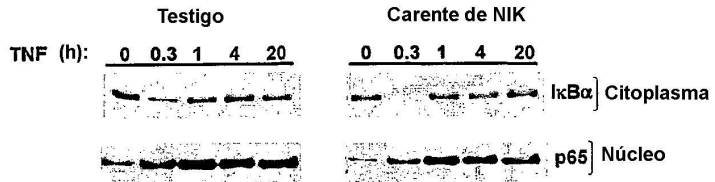


FIGURA 3

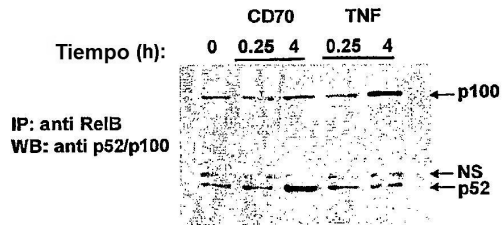
3E



3F



3G



3H

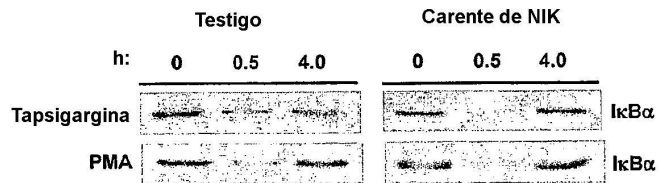
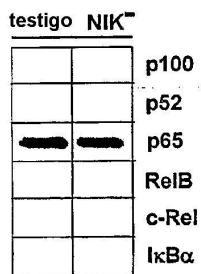


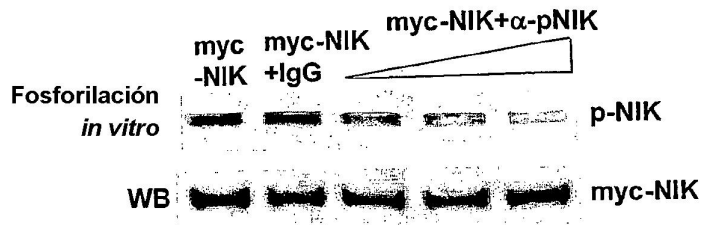
FIGURA 3



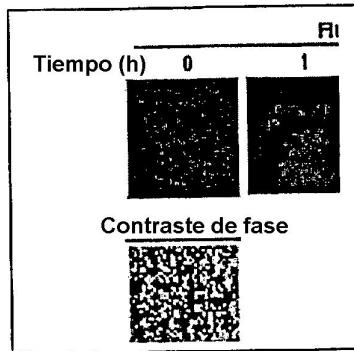
3I

FIGURA 4

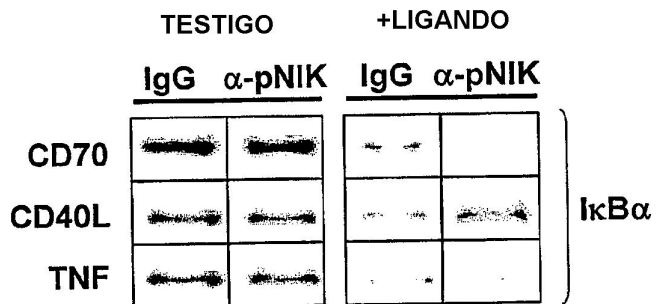
4A



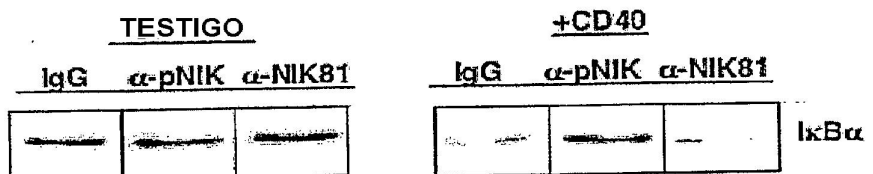
4B



4C



4D



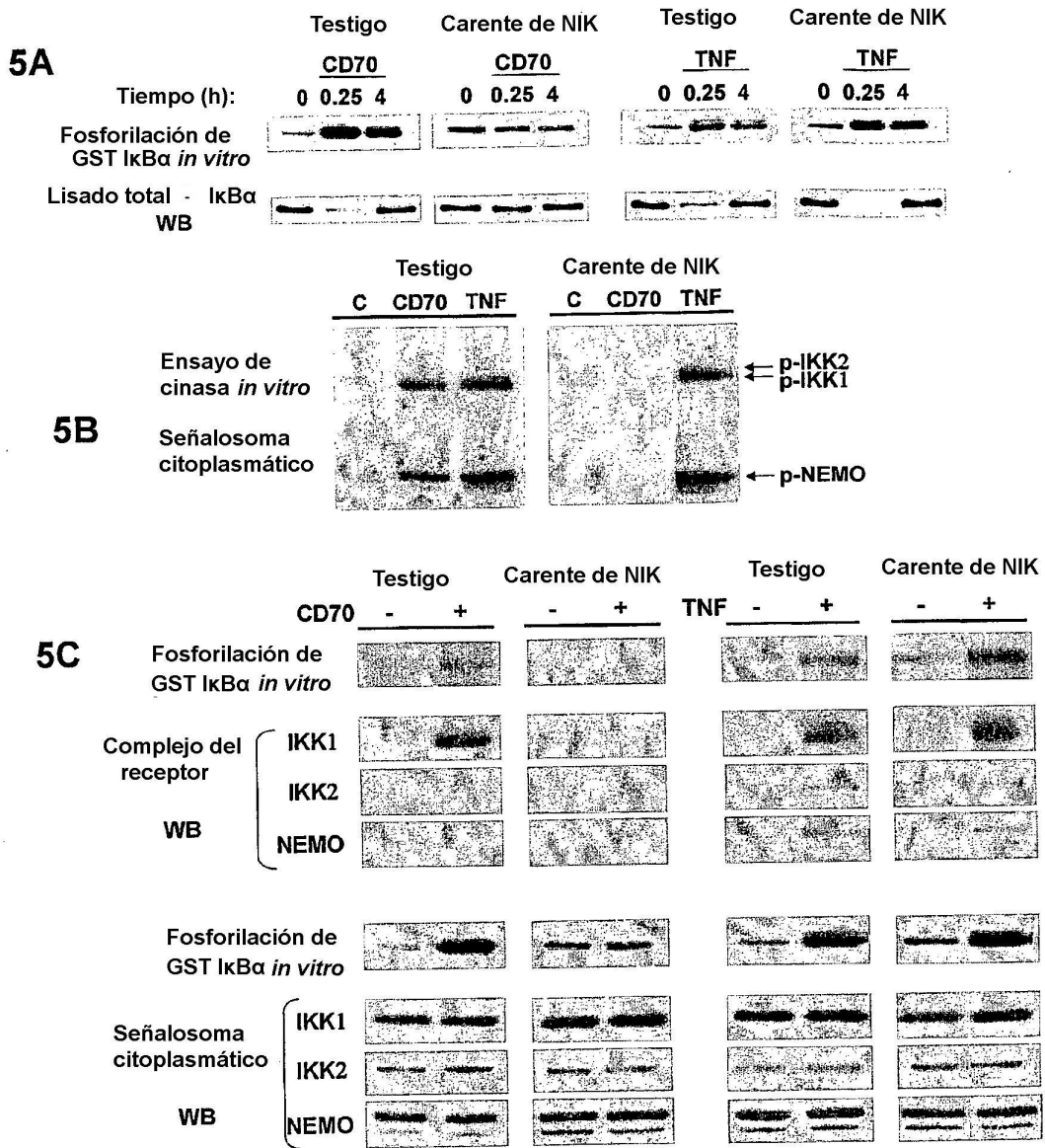
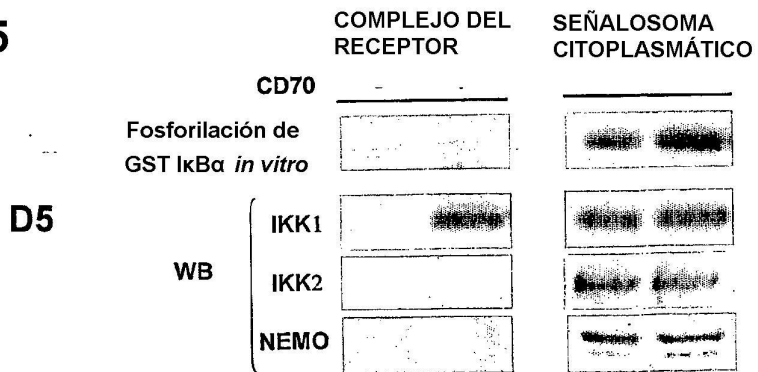
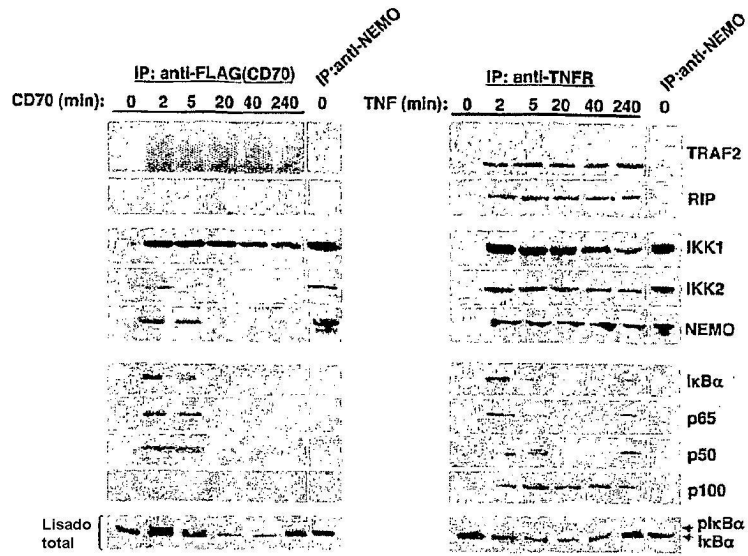


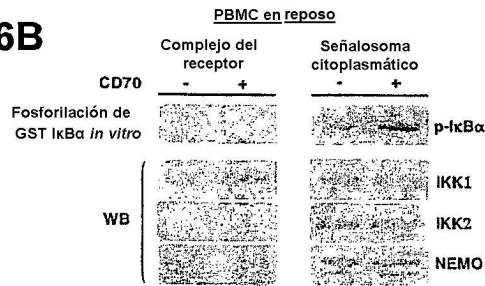
FIGURA 5



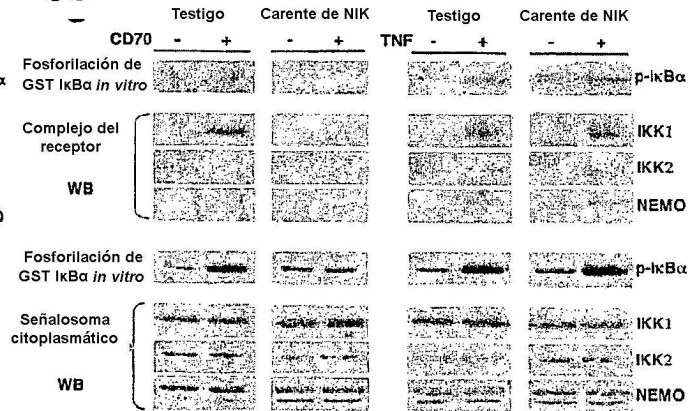
6A



6B



6C



6D

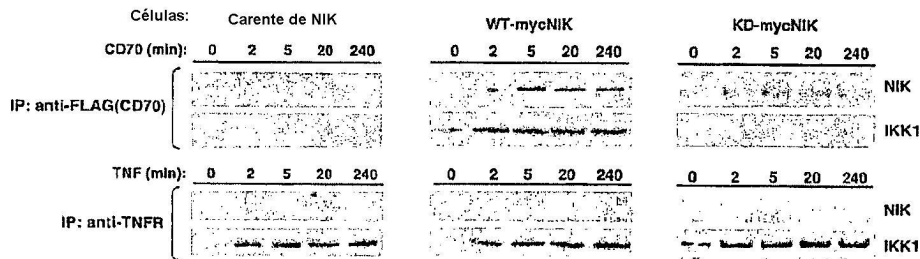


FIGURA 6

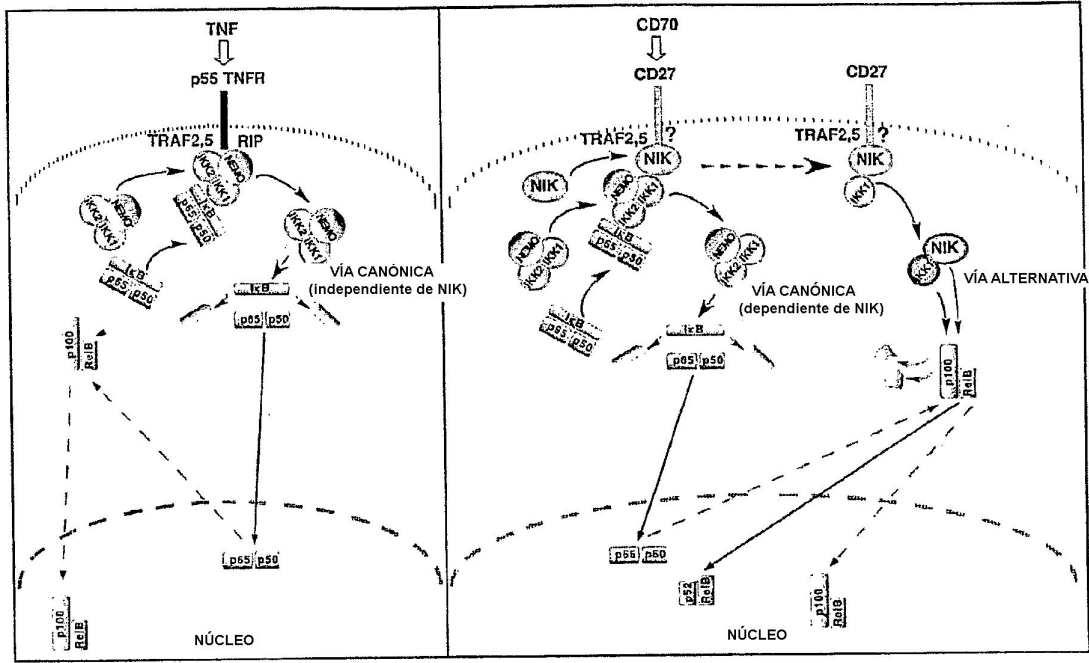


FIGURA 7