

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 518 340**

51 Int. Cl.:

C07K 16/18	(2006.01)	G01N 33/50	(2006.01)
C07K 14/47	(2006.01)	C12Q 1/68	(2006.01)
C12N 9/12	(2006.01)		
A61K 39/395	(2006.01)		
A61K 48/00	(2006.01)		
A61K 38/00	(2006.01)		
A61P 35/00	(2006.01)		
A61P 37/00	(2006.01)		
C07K 16/40	(2006.01)		
A61K 31/7088	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.12.2005 E 05838184 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.10.2014 EP 1838347**

54 Título: **Composiciones farmacéuticas para tratar enfermedades asociadas con la actividad de NF-κB**

30 Prioridad:

27.12.2004 IL 16600604

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

05.11.2014

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 y
SHMUSHKOVICH, TAISA**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 518 340 T3

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

DESCRIPCIÓN

Composiciones farmacéuticas para tratar enfermedades asociadas con la actividad de NF- κ B

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a agentes para modular la unión de NIK a HC8 como se caracteriza en las reivindicaciones. Dichos agentes son útiles en métodos para tratar enfermedades asociadas con la actividad de NF- κ B, tal como cáncer.

Antecedentes de la invención

10 La degradación de la mayoría de las proteínas en células eucariotas es realizada por el proteasoma 26S dependiente de la ubiquitina. El proteasoma 26S está implicado en muchos procesos celulares diferentes, que varían desde la regulación del ciclo celular hasta el procesamiento de antígenos [Hershko and Ciechanover (1998) *Annu. Rev. Biochem.* 67:425-479]. El proteasoma está compuesto de dos unidades grandes: el complejo nuclear catalítico 20S y el complejo regulador 19S [Gerards (1998) *Cell. Mol. Life Sci.* 54:253-262]. Se requiere el complejo 19S para el reconocimiento de sustratos proteínicos poli-ubiquitinados que son degradados dentro del complejo 20S. La partícula 20S con forma de barril está constituida por cuatro anillos, cada uno de los cuales contiene siete subunidades diferentes. Los dos anillos interiores contienen subunidades de tipo β y los anillos exteriores comprenden subunidades de tipo α .

15 Se sabe que dos de las subunidades α del proteasoma 20S, HC8 ($\alpha 7$) y HC9 ($\alpha 3$), están fosforiladas en las células de mamíferos. Se ha demostrado que la proteína quinasa CK2 (caseína-quinasa II), que es co-purificada con las preparaciones del proteasoma 20S, fosforila HC8 en dos residuos de serina, Ser243 y Ser250, que están localizados en el extremo C de la subunidad HC8 [Mason (1996) *Eur. J. Biochem.* 238:453-462; Castaño (1996) *Biochemistry* 35:3782-3789]. Recientemente, Bose et al., [Biochem. J. (2004) 378:177-84] descubrieron que el tratamiento de células con interferón γ daba como resultado la desfosforilación de la subunidad HC8 y la desestabilización del proteasoma 26S.

20 La familia de factores de transcripción NF- κ B/Rel participa en las respuestas celulares inflamatorias e inmunitarias, la regulación del ciclo celular y la diferenciación y protección de la apoptosis [Baeuerle and 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 de cinco miembros: p65 (RelA), RelB, c-Rel, NF- κ B1 (que existe tanto en forma precursora, p105, como en forma procesada, p50) y NF- κ B2 (que existe tanto como precursora, p100, como su producto procesado, p52). Los homo- y hetero-dímeros de la proteína NF- κ B existen en el citoplasma, formando 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 inhibitoras homólogas a I κ B en el extremo C. Los dímeros que contienen estas proteínas NF- κ B son retenidos en el citoplasma en virtud de la función de las regiones homólogas a I κ B. Además, NF- κ B1/p105 y NF- κ B2/p100 pueden asociarse también con dímeros de otras proteínas NF- κ B e imponer la retención citoplasmática en ellos. La activación de NF- κ B se produce principalmente por la degradación inducida de 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 translocación consiguiente de los dímeros de NF- κ B al núcleo [Ghosh and Karin, (2002) *Cell* 881-96].

25 Debido a su papel en las respuestas celulares inflamatorias e inmunitarias, la regulación del ciclo celular, la diferenciación y protección de la apoptosis, la activación de NF- κ B desempeñan un papel importante en el desarrollo de diferentes enfermedades, tales como enfermedades inflamatorias, tales como artritis reumatoide, asma y enfermedad inflamatoria intestinal; enfermedades autoinmunitarias, tales como lupus eritematoso sistémico; o diferentes tipos de cáncer [Ruland and Mak, *Semin. Immunol.* 3:177-83, (2003)]. Por lo tanto, se han hecho considerables esfuerzos para descubrir agentes capaces de modular la actividad de NF- κ B para su uso en el tratamiento de enfermedades relacionadas con NF- κ B. Por consiguiente, se ha estudiado un gran número de moléculas con propiedades inmunosupresoras y anti-inflamatorias como inhibidores de NF- κ B. Estas incluyen glucocorticoides y otras hormonas esteroides, ciclosporina A, FK506, rapamicina, salicilatos y compuestos de oro. Sin embargo, la mayoría de estos compuestos tienen una amplia gama de actividades que con frecuencia dan como resultado inmunosupresión grave y otros efectos adversos graves.

30 Los autores de la presente invención han mostrado previamente que la quinasa inductora de NF- κ B (NIK) desempeña un papel central en la activación de NF- κ B por las vías canónicas y alternativas (Ramakrishnan et al., *Receptor-specific signaling for both the alternative and the canonical NF- κ B activation pathways by NF- κ B-inducing kinase (NIK)*, *Immunity* 21:477-489, 2004). El documento de patente WO 03/087380 describe la inhibición de la activación de NF- κ B mediada por NIK por medio de la interrupción de NIK-cyc, por ejemplo, por medio de un anticuerpo anti-NIK, pero no dice nada en cuanto a agentes moduladores de la interacción NIK-HC8.

35 Mientras realizaban la presente invención, los autores descubrieron inesperadamente que NIK se une a la subunidad HC8 proteasómica de 26S activando de ese modo su fosforilación. Por lo tanto, los autores de la presente invención proponen que el agente capaz de modular la interacción NIK-HC8 se pueda utilizar para activar o suprimir la actividad del proteasoma y/o la degradación de la NIK y como resultado regular los niveles de NF- κ B, facilitando así el tratamiento de enfermedades que están asociadas con la actividad de NF- κ B.

Sumario de la invención

De acuerdo con un aspecto de la presente invención, se proporciona un anticuerpo o fragmento de anticuerpo capaz de prevenir la formación de un complejo NIK-HC8, en el que un dominio de reconocimiento de antígenos del anticuerpo o su fragmento reconoce los aminoácidos 1-180 de la secuencia de aminoácidos descrita por la SEQ ID NO: 5.

De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporciona un polipéptido que comprende no más de 200 aminoácidos y que incluye la secuencia de aminoácidos limitada por las coordenadas 1-180 de la SEQ ID NO: 5, siendo el polipéptido capaz de prevenir la formación de un complejo NIK-HC8.

De acuerdo incluso con otro aspecto de la presente invención, se proporciona un método *in vitro* de identificación de un candidato a fármaco adecuado para tratar una enfermedad asociada con la actividad de NF- κ B, comprendiendo el método identificar una molécula capaz de modular la unión NIK-HC8, siendo dicha molécula el candidato a fármaco. Preferiblemente, dicha molécula se selecciona del grupo que consiste en una molécula química pequeña, un polinucleótido, un oligonucleótido, un aptámero, un polipéptido, un péptido y un anticuerpo.

La presente invención aborda con éxito las deficiencias de las configuraciones actualmente conocidas proporcionando agentes para modular la interacción NIK-HC8 caracterizada en las reivindicaciones. Dichos agentes son útiles en métodos para tratar enfermedades asociadas con la actividad de NF- κ B, tal como cáncer.

Salvo que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en esta memoria tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto en la técnica a la que pertenece esta invención. Aunque en la práctica o ensayos de la presente invención se pueden usar métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente memoria, más adelante se describen métodos y materiales adecuados. En caso de conflicto, prevalecerá la memoria descriptiva de la patente, incluyendo las definiciones. Además, los materiales, métodos y ejemplos son sólo ilustrativos y no pretenden ser limitativos.

Breve descripción de los dibujos

La invención se describe en la presente memoria sólo a modo de ejemplo, con referencia a los dibujos que se acompañan. Con referencia específica ahora a los dibujos en detalle, se enfatiza que los datos mostrados son solamente a modo de ejemplo y para fines de estudio ilustrativo de las realizaciones preferidas de la presente invención, y se presentan con el fin de 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 pretende mostrar detalles estructurales de la invención con más detalle del necesario para una comprensión fundamental de la invención, siendo evidente para los expertos en la técnica que el conjunto de la descripción y los dibujos abarca las diversas formas de la invención que pueden realizarse en la práctica.

En los dibujos:

Las Figuras 1a-b muestran análisis por transferencia de Western de ensayos de inmunoprecipitación que ilustran una interacción entre NIK y HC8 en células 293T transfectadas transitoriamente con ellas. La Figura 1a - panel izquierdo - muestra la presencia de HC8 en un inmunocomplejo de NIK. El panel inferior representa los lisados celulares totales que muestran mayores niveles de expresión de HC8 en células 293T co-transfectadas con NIK. La Figura 1b - panel derecho - muestra la presencia de NIK de tipo natural y no *aly* NIK en un inmunocomplejo de HC8. El panel inferior muestra los niveles de expresión de NIK y *aly* NIK en los lisados celulares totales.

Las Figuras 2a-b muestran análisis por transferencia de Western de ensayos de inmunoprecipitación que ilustran la fosforilación de HC8 por NIK. La Figura 2a - la HC8 etiquetada con His de tipo natural (en lo sucesivo WT, por la expresión inglesa *Wild Type*) o la HC8 etiquetada con His mutada SS243,250AA fueron co-expresadas con NIK etiquetada con myc en células 293T. La inmunoprecipitación se realizó utilizando anticuerpos anti-His para precipitar HC8 y la NIK unida a ella. Los inmunoprecipitados se incubaron con 5 μ Ci de γ ³²P ATP en tampón de reacción con quinasa durante 30 minutos a 30°C. Las muestras se resolvieron en SDS-PAGE al 12%, se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa y se visualizaron por auto-radiografía. La membrana se sondó posteriormente con anticuerpos anti-His y anti-myc. El panel inferior muestra la cantidad de HC8 de tipo natural y mutante inmunoprecipitada junto con NIK. La Figura 2b muestra la co-inmunoprecipitación de NIK, pero no *aly* NIK, con HC8 mutante. Los niveles de expresión de NIK y *aly* NIK en lisados celulares totales se muestran en el panel inferior.

Las Figuras 3a-g muestran análisis por delección de una región de NIK humana que se une a HC8. La NIK de longitud completa y diversos de sus mutantes por delección (con los residuos en N- y C-terminal indicados), enlazados a la etiqueta His, se co-expresaron transitoriamente en células HeLa con HC8 fusionada bien a la etiqueta His o myc y se evaluó su asociación por inmunoprecipitación de NIK en los lisados celulares utilizando anticuerpo monoclonal anti-NIK seguido por análisis de Western. La Figura 3a muestra la presencia del o de los restos de unión a C8 aguas arriba de la región C-terminal de NIK. La Figura 3b ilustra que el dominio de quinasa no se une a HC8. La Figura 3c ilustra una región de unión NIK-HC8 aguas abajo del aminoácido 187 de NIK. Las Figuras 3d-g ilustran la región o regiones de unión NIK-HC8 aguas abajo del aminoácido 180 de NIK.

La Figura 4 es un diagrama que resume los análisis por delección de las regiones de NIK capaces de unirse a HC8. El diagrama ilustra al menos dos regiones de unión para HC8 en NIK: una región de unión entre los aminoácidos 1-180 en el extremo N y otra región de unión en el extremo C (aminoácidos 650-947). El diagrama muestra además que no fue identificada ninguna región de unión en el resto quinasa de NIK (aminoácidos 400-650).

5 La Figura 5 muestra análisis por transferencia de Western de ensayos de inmunoprecipitación que ilustran que la unión NIK-HC8 se produce con HC8 asociada al proteasoma (y no con HC8 libre). La HC8 etiquetada con myc y la NIK etiquetada con His se expresaron transitoriamente en células HeLa. Se precipitaron proteasomas en los lisados celulares usando anticuerpo anti-componente proteasómico C2. Los análisis muestran la co-precipitación de las moléculas tanto HC8 como NIK etiquetadas con C2.

10 La Figura 6 muestra análisis por transferencia de Western de ensayos de inmunoprecipitación que ilustran que NIK de ratón se une también a C8 humana (HC8). NIK de ratón de longitud completa y varios de sus mutantes por delección (con los residuos N- y C-terminales indicados), enlazados a la etiqueta FLAG, se co-expresaron transitoriamente en células HeLa con HC8 fusionada bien a la etiqueta FLAG o myc. La asociación de NIK de ratón y HC8 se evaluó por inmunoprecipitación de NIK en los lisados celulares utilizando anticuerpo monoclonal anti-NIK seguido por análisis de Western.

15 La Figura 7 muestra análisis por transferencia de Western de ensayos de inmunoprecipitación que ilustran que la mutación *aly*, la sustitución de la lisina 670 por alanina y la variación polimórfica de un solo nucleótido natural de NIK (H674Y) que existe de forma natural no impiden la unión de NIK al proteasoma. La HC8 etiquetada con myc y NIK etiquetada con His se expresaron transitoriamente en células HeLa. Se precipitaron proteasomas en los lisados celulares utilizando anticuerpo anti-componente proteasómico C2.

20 La Figura 8 muestra análisis por transferencia de Western de ensayos de inmunoprecipitación que ilustran el efecto de mutar los residuos de serina 243 y 250 en HC8 (sitios de fosforilación de NIK) en la vía de NF-κB alternativa inducida por NIK y en la translocación nuclear de HC8 y NIK. NIK y HC8 humanas que tienen residuos de serina 243 y 250 sustituidos por alanina se co-expresaron con NIK y NF-κB (p100) en células HeLa. Después de 25 horas de incubación, se aislaron los núcleos y las fracciones citoplásmicas de las células y sondaron para p52 (indicativo del procesamiento de p100 inducido por activación de la vía alternativa), NF-κB p65, NIK y HC8. Los análisis muestran una disminución sustancial de p52 en las células que co-expresan HC8 mutada. Además, los análisis muestran la translocación de NIK y HC8 a núcleos de células que co-expresan HC8 de tipo natural pero no a núcleos de células que co-expresan HC8 mutada.

30 Descripción de las realizaciones preferidas

En la presente memoria se describe un método para tratar enfermedades asociadas con la actividad de NF-κB. Específicamente, los métodos de regulación de la actividad de NF-κB son por modulación de la interacción NIK-HC8.

Los principios y la realización de la presente invención pueden comprenderse mejor con referencia a los dibujos y descripciones que se acompañan.

35 La quinasa inductora de NF-κB (NIK) es una serina/treonina-quinasa que es capaz de estimular la actividad de NF-κB (Malinin et al., *Nature* 385:540-544,1997). Los estudios iniciales mostraron que NIK induce el procesamiento proteolítico de NF-κB2/p100 y por lo tanto la generación de dímeros de NF-κB, tal como p52;RelB. Recientemente, Ramakrishnan et al., (*Immunity* 21:477-489, 2004) mostraron que NIK participa en un conjunto único de eventos de señalización proximales, iniciados por inductores específicos, que activan los dímeros de NF-κB.

40 Mientras realizaban la presente invención, los autores descubrieron sorprendente e inesperadamente que NIK es capaz de unirse a la subunidad C8 del proteasoma 20S humano (HC8) en células de mamífero (Ejemplo 1) y que dicha unión puede dar como resultado la activación de la fosforilación de HC8 (Ejemplo 2). Puesto que la fosforilación de HC8 se asocia con la actividad del proteasoma 26S (como se describe en el apartado de introducción antes descrito), los autores de la presente invención han postulado que la modulación de la interacción NIK-HC8 podría estabilizar o desestabilizar eficazmente el proteasoma 26 y en consecuencia aumentar o disminuir la degradación mediada por proteasomas de NIK (que es necesaria para la actividad de NF-κB, como se ha descrito anteriormente) y/o la degradación de los precursores de NF-κB (por ejemplo, p100).

45 Por lo tanto, de acuerdo con un aspecto se describe un método para tratar una enfermedad asociada con la actividad de NF-κB. El método se realiza proporcionando a un sujeto que lo necesite una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente capaz de modular la unión NIK-HC8.

Como se usa en la presente memoria, la frase "un sujeto que lo necesite" se refiere a un mamífero, preferiblemente un sujeto humano, que tiene una enfermedad asociada con la actividad de NF-κB o está en riesgo de desarrollar una enfermedad asociada con la actividad de NF-κB (es decir, está predispuesto).

55 Como se utiliza en la presente memoria, el término "tratar" se refiere a revertir, aliviar, inhibir el progreso de la enfermedad, o prevenir la enfermedad, el trastorno o la afección al que se aplica dicho término, o uno o más síntomas de dicho trastorno o afección. El término "tratamiento" o "terapia" se refiere al acto de tratar al sujeto.

Una enfermedad asociada con la actividad de NF- κ B puede ser cualquier enfermedad, trastorno o afección que es inducido, aumentado o suprimido por la actividad de NF- κ B. Las enfermedades asociadas con la actividad de NF- κ B incluyen, aunque sin limitación, enfermedades inmunitarias (por ejemplo, lupus eritematoso sistémico), enfermedades inflamatorias (por ejemplo, artritis reumatoide, asma y enfermedad inflamatoria intestinal) y cáncer [Barnes P. J., *N. Engl. J. Med.* 336:1066-1071, 1997; Brand, et al., *J. Clin. Invest.* 97:1715-1722, 1996; Remick D. G., *J. Crit. Care*, 10:198-212, 1995; Behl et al., *J. Neural. Transm. Suppl.* 49:125-134, 1997; Brand et al., *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 17:1901-1909, 1997; Kaltschmidt et al., *J. Neuroimmunol.* 55:99-106, 1994; Luque et al., *Semin. Cancer Biol.* 8:103-111, 1997; y Ruland and Mak, *Semin. Immunol.* 3:177-183, 2003].

Como se ha mencionado anteriormente, la presente invención permite el tratamiento de enfermedades asociadas con la actividad reducida o elevada de NF- κ B. En los casos en los que la enfermedad está asociada con una reducción de la actividad de NF- κ B (por ejemplo, varios tipos de deficiencias inmunitarias), el sujeto se puede tratar con un agente capaz de disociar un complejo NIK-HC8 o prevenir su formación. El tratamiento con dicho agente suprimiría la fosforilación de HC8 dependiente de NIK y por lo tanto desestabilizaría el proteasoma 26S, dando como resultado la degradación reducida de NIK, la degradación reducida de NF- κ B y/o la activación alterada de NIK.

De acuerdo con la presente descripción, dicho agente puede ser, por ejemplo, un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo capaz de unirse a HC8 o a NIK. Preferiblemente, el anticuerpo se une específicamente al menos a un epítipo de NIK o de HC8. Más preferiblemente, el anticuerpo se une específicamente al menos a un epítipo de un sitio de unión a NIK de HC8 o al menos a un epítipo de un sitio de unión a HC8 de NIK. La presente invención se refiere a un anticuerpo que se une específicamente a un antígeno abarcado por los aminoácidos 1-180 de la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 5 y, preferiblemente, que no tenga una longitud mayor de 200 aminoácidos.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "epítipo" se refiere a cualquier determinante antigénico en un antígeno al que se une el paratopo de un anticuerpo.

Los determinantes epítópicos están compuestos por agrupaciones superficiales químicamente activas de moléculas tales como aminoácidos o cadenas laterales de carbohidratos y tienen normalmente características estructurales tridimensionales específicas, así como características de carga específicas. Los epítopos preferidos de NIK o HC8 son los que comprenden los sitios de unión NIK-HC8, tales como, por ejemplo, los sitios de unión en el extremo C de NIK o en el extremo N de NIK (entre los aminoácidos 650-947 y 1-180, respectivamente) descritos en el Ejemplo 2.

El término "anticuerpo", como se usa en la presente memoria, incluye moléculas intactas así como sus fragmentos funcionales, tales como Fab, F(ab')₂ y Fv. Estos fragmentos de anticuerpos funcionales se definen como sigue: (1) Fab, el fragmento que contiene un fragmento monovalente de unión a antígeno de una molécula de anticuerpo, puede ser producido por digestión de un anticuerpo completo con la enzima papaína obteniéndose 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, obteniéndose 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 reducción posterior; F(ab')₂ es un dímero de dos fragmentos Fab' mantenidos juntos por dos enlaces disulfuro; (4) Fv, definido como un fragmento modificado por ingeniería genética que contiene la región variable de la cadena ligera y la región variable de la cadena pesada expresado como dos cadenas; y (5) anticuerpo monocatenario (en adelante "SCA" por la expresión inglesa *Single Chain Antibody*), una molécula modificada por ingeniería genética que contiene la región variable de la cadena ligera y la región variable de la cadena pesada, unidas por un enlazador polipeptídico adecuado en forma de una molécula monocatenaria genéticamente fusionada.

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

Los fragmentos de anticuerpo de acuerdo con la presente invención se pueden preparar por hidrólisis proteolítica del anticuerpo o por expresión en *E. coli* o en células de mamíferos (por ejemplo, cultivo de células de ovario de hámster chino u otros sistemas de expresión de proteínas) del DNA 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 anticuerpos pueden ser producidos por escisión enzimática de anticuerpos con pepsina proporcionando un fragmento 5S denominado F(ab')₂. Este fragmento puede ser escindo adicionalmente usando un agente reductor tiol y opcionalmente un grupo de bloqueo para los grupos sulfhidrilo resultantes de la escisión de enlaces disulfuro, produciendo fragmentos monovalentes 3.5S Fab'. Alternativamente, una escisión enzimática que utiliza pepsina produce directamente dos fragmentos monovalentes Fab' y un fragmento Fc. Estos métodos han sido descritos, por ejemplo, por Goldenberg, en las Patentes de EE.UU. Nos. 4.036.945 y 4.331.647 y en las referencias contenidas en ellas.

Véase también Porter, R.R. [*Biochem. J.* 73:119-126 (1959)]. También se pueden utilizar otros métodos de escisión de anticuerpos, tales como la separación de cadenas pesadas para formar fragmentos de cadenas ligeras-pesadas

monovalentes, la escisión adicional de fragmentos u otras técnicas enzimáticas, químicas o genéticas, 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 han descrito Inbar et al. [*Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 69:2659-62 (1972)]. Alternativamente, las cadenas variables pueden estar unidas por un enlace disulfuro intermolecular o reticuladas por compuestos químicos, tal como glutaraldehído. Preferiblemente, los fragmentos Fv comprenden cadenas VH y VL conectadas por un enlazador peptídico. Estas proteínas de unión a antígenos monocatenarias (scFv) se preparan construyendo un gen estructural que comprende secuencias de DNA 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 hospedante, tal como *E. coli*.

El anticuerpo utilizado en la presente invención es preferiblemente un fragmento de anticuerpo que es capaz de ser suministrado a células de mamíferos o expresarse en ellas. Por lo tanto, se incluye preferiblemente una secuencia codificadora de scFv Ab en un vector adecuado para la expresión del fragmento scFv de NIK o HC8 en células de mamífero (véase más adelante para más detalles sobre la construcción de vectores de expresión). Un vector de expresión de scFv adecuado puede ser, por ejemplo, pIG6 [Ge: en *Antibody Engineering* (Boreback C. A. K ed.) 2nd ed. pp 229-261, 1995 Oxford University], pFab5c o pcDNA3.1 descrito por Khoshar (*PNAS* 99:1002-1007, 2002).

Las células hospedantes recombinantes sintetizan una única cadena polipeptídica con un péptido enlazador que une por puentes los dos dominios V. Los métodos para producir los scFv han sido descritos, por ejemplo, por [Whitlow and Filpula, *Methods* 2:97-105 (1991); Bird et al., *Science* 242:423-426 (1988); Pack et al., *Bio/Technology* 11:1271-77 (1993); y la Patente de EE.UU. No. 4.946.778.

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

Las formas humanizadas de anticuerpos no humanos (por ejemplo, de muridos) son moléculas quiméricas de inmunoglobulinas, cadenas de inmunoglobulinas o sus fragmentos (tales como, Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ u otras subsecuencias de unión a antígenos de anticuerpos) que contienen una secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. Los anticuerpos humanizados incluyen inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que residuos de una región determinante de la complementariedad (CDR) del receptor están sustituidos 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, residuos del armazón de Fv de la inmunoglobulina humana están sustituidos por residuos no humanos correspondientes. Los anticuerpos humanizados pueden comprender también residuos que no se encuentran ni en el anticuerpo receptor ni en las secuencias de CDR o del armazón 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 CDR corresponden a las de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las regiones FR son las de una secuencia de consenso de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado comprenderá también óptimamente 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 más residuos de aminoácidos introducidos en 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 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); Verhoeyen et al., *Science*, 239:1534-1536 (1988)], sustituyendo las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano por las CDR o secuencias de CDR de roedores. Por consiguiente, dichos anticuerpos humanizados son anticuerpos quiméricos (Patente de EE.UU. N°. 4.816.567), en donde ha sido sustituido sustancialmente menos de un dominio variable humano intacto 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 están sustituidos por residuos de sitios análogos en anticuerpos de roedores.

Los anticuerpos humanos también se pueden producir usando diversos métodos conocidas en la técnica, incluyendo genotecas de presentación de fagos [Hoogenboom and Winter, *J. Mol. Biol.*, 227:381 (1991); Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222:581 (1991)]. También están disponibles las técnicas de Cole et al. y Boerner et al., para la preparación de anticuerpos monoclonales humanos (Cole et al., *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, p.77 (1985) y Boerner et al., *J. Immunol.*, 147(1):86-95 (1991)]. Similarmente, los anticuerpos humanos se pueden preparar por introducción de locus de inmunoglobulina humana en animales transgénicos, por ejemplo, ratones en los que los genes de inmunoglobulina endógenos han sido parcial o completamente inactivados. Por estimulación, se observa la producción de anticuerpos humanos, que se asemeja mucho en todos los aspectos a los observados en seres

humanos, incluyendo la transposición de genes, el ensamblaje y la gama de anticuerpos. Este procedimiento está descrito, por ejemplo, en las Patentes de EE.UU. Nos. 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 and Huszar, *Intern. Rev. Immunol.* 13, 65-93 (1995).

El anticuerpo de la presente invención puede ser generado también produciendo inicialmente antisuero policlonal específico de NIK o de HC8, utilizando métodos estándares conocidos en la técnica, como se ha descrito anteriormente. A continuación se hacen pasar partes alícuotas de antisueros a través de una pluralidad de columnas de unión por afinidad cada una de las cuales contiene una porción específica de aminoácidos de NIK o de HC8, de modo que se purifique una pluralidad de subconjuntos de anticuerpos policlonales monoespecíficos (cada subconjunto reconoce específicamente uno o varios epítomos de NIK o de HC8). A continuación se criban y seleccionan los subconjuntos por su capacidad de romper la unión NIK-HC8 o disociar un complejo NIK-HC8 en células de mamíferos utilizando métodos, tales como los descritos más adelante.

Un agente capaz de prevenir la formación de un complejo NIK-HC8 puede ser también una pequeña molécula de RNA interferente (siRNA) capaz de suprimir la expresión de NIK o de HC8. La interferencia de RNA es un proceso de dos etapas, en la primera etapa, que se denomina etapa de iniciación, se digiere el dsRNA de entrada en pequeños RNA interferentes (siRNA) de 21-23 nucleótidos (nt), probablemente por la acción de Dicer, un miembro de la familia de RNasa III de ribonucleasas específicas de dsRNA, que procesa (escinde) dsRNA (introducido directamente o a través de un transgén o un virus) de una manera dependiente de ATP. Eventos de escisión sucesivos degradan el RNA en dúplex (siRNA) de 19-21 pb, cada uno con colgantes en 3' de 2-nucleótidos [Hutvagner and Zamore, *Curr. Opin. Genetics and Development* 12:225-232 (2002); y Bernstein, *Nature* 409:363-366 (2001)].

En la etapa efectora, los dúplex de siRNA se unen a un complejo de nucleasas formando el complejo de silenciamiento inducido por RNA (RISC). Se requiere un desenrollamiento dependiente de ATP del dúplex de siRNA para la activación del RISC. El RISC activo se dirige entonces a la transcripción homóloga por interacciones con apareamiento de bases y escinde el mRNA en fragmentos de 12 nucleótidos desde el extremo 3' del siRNA [Hutvagner and 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 todavía no se ha esclarecido el mecanismo de escisión, la investigación indica que cada RISC contiene un solo siRNA y una RNasa [Hutvagner and Zamore, *Curr. Opin. Genetics and Development* 12:225-232 (2002)].

Debido a la notable potencia del RNAi, se ha sugerido una etapa de amplificación dentro de la vía de RNAi. La amplificación podría ocurrir copiando los dsRNA de entrada lo que generaría más siRNA o replicando los siRNA formados. Alternativa o adicionalmente, la amplificación podría ser efectuada por múltiples eventos de renovación del RISC [Hammond et al., *Nat. Rev. Gen.* 2:110-119 (2001), Sharp, *Genes. Dev.* 15:485-90 (2001); Hutvagner and Zamore, *Curr. Opin. Genetics and Development* 12:225-232 (2002)]. Para más información sobre RNAi véanse las siguientes revistas *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 RNAi adecuada para uso con la presente invención se puede efectuar como sigue. En primer lugar, se escanea la secuencia de RNAm de NIK o de HC8 aguas abajo del codón de iniciación AUG para las secuencias de dinucleótidos AA. La aparición de cada AA y los 19 nucleótidos adyacentes en 3' se registra como potenciales sitios diana de siRNA. Preferiblemente, los sitios diana de siRNA se seleccionan del marco de lectura abierto, puesto que las regiones no traducidas (UTR) son más ricas en sitios de unión a proteínas reguladoras. Las proteínas de unión a UTR y/o los complejos de iniciación de la traducción pueden interferir con la unión del complejo de endonucleasas siRNA [Tuschl *ChemBiochem.* 2:239-245]. Se apreciará, sin embargo, que los siRNA dirigidos a regiones no traducidas también pueden ser eficaces, como se ha demostrado para GAPDH en donde siRNA dirigido a la UTR en 5' medió una disminución de aproximadamente el 90% en el RNAm de GAPDH celular y suprimió completamente el nivel de proteínas (www.ambion.com/techlib/tn/91/912.html).

En segundo lugar, los potenciales sitios diana se comparan con una base de datos genómica apropiada (por ejemplo, de ser humano, de ratón, de rata, etc) usando cualquier programa informático de alineación de secuencias, tal como el programa informático BLAST disponible en el servidor NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/). Se eligen por filtración los supuestos sitios diana que presentan una homología significativa con otras secuencias codificantes.

Las secuencias diana clasificadas se seleccionan como molde para la síntesis de siRNA. Las secuencias preferidas son las que incluyen un bajo contenido de G/C, puesto que éstas han demostrado ser más eficaces en la mediación del silenciamiento de genes en comparación con las que tienen un contenido de G/C mayor del 55%. A lo largo de la longitud del gen diana se seleccionan preferiblemente para evaluación varios sitios diana. Para una mejor evaluación de los siRNA seleccionados, se utiliza preferiblemente también un control negativo. El siRNA de control negativo incluye preferiblemente la misma composición de nucleótidos que los siRNA, pero carece de una homología significativa con el genoma. Por lo tanto, se utiliza preferiblemente una secuencia de nucleótidos codificada del siRNA, con la condición de que no muestre ninguna homología significativa con cualquier otro gen. Como ejemplo, las secuencias de siRNA que se pueden usar para romper un complejo NIK-HC8 o impedir su formación de acuerdo con la

enseñanza de la presente invención se exponen en las SEQ ID NO: 1-2 (sentido/antisentido) y las SEQ ID NO: 3-4 (sentido/antisentido).

Otro agente capaz de impedir la formación de un complejo NIK-HC8 es una molécula DNAzima capaz de escindir específicamente una secuencia de transcrito de mRNA o DNA que codifica NIK o HC8. Las DNAzimas son polinucleótidos monocatenarios, que son capaces de escindir secuencias diana tanto monocatenarias como bicatenarias (Breaker, R.R. and Joyce, G. *Chemistry and Biology* 1995; 2:655; Santoro, SW & Joyce, G. F. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1997; 943: 42-62). Se ha propuesto un modelo general (el modelo "10-23") para la DNAzima. Las DNAzimas "10-23" tienen un dominio catalítico de 15 desoxirribonucleótidos cada uno, flanqueado por dos dominios de reconocimiento de sustratos de siete a nueve desoxirribonucleótidos. Este tipo de DNAzima puede escindir eficazmente su RNA sustrato en las uniones purina:pirimidina (Santoro, S.W. & Joyce, G. F. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 199; para una revisión de las DNAzimas véase Khachigian, L.M. [*Curr. Opin. Mol. Ther.* 4: 119-21 (2002)].

Ejemplos de construcción y amplificación de sitios de escisión dianas monocatenarias y bicatenarias, que reconocen DNAzimas modificadas genéticamente sintéticas se han descrito en la patente de EE.UU. nº 6.326.174 de Joyce et al. Se observaron recientemente DNAzimas de diseño similar dirigidas contra el receptor de uroquinasa humana para inhibir la expresión del receptor de uroquinasa, e inhibir satisfactoriamente *in vivo* la metástasis de células cancerosas de colon (Itoh et al., 2002, *Abstract 409, Ann. Meeting Am. Soc. Gen. Ther.* www.asgt.org). En otra aplicación, las DNAzimas complementarias de los oncogenes bcr-abl inhibieron satisfactoriamente la expresión de oncogenes en células de leucemia, y disminuyeron las tasas de recidivas en el trasplante autólogo de médula ósea en los casos de leucemia mielocítica crónica (abreviadamente CML por sus iniciales en inglés) y leucemia linfocítica aguda

La evitación de la formación de un complejo NIK-HC8 se puede efectuar también usando un polinucleótido antisentido capaz de hibridarse específicamente con un transcrito de mRNA que codifica NIK o HC8.

El diseño de dicha molécula antisentido debe efectuarse teniendo en cuenta dos aspectos importantes para el enfoque antisentido. El primer aspecto es la entrega del oligonucleótido al citoplasma de las células apropiadas, mientras que el segundo aspecto es el diseño de un oligonucleótido que se una específicamente al mRNA diseñado dentro de las células de una manera que inhiba su traducción.

La técnica anterior enseña un número de estrategias de entrega que pueden ser utilizadas para entregar eficazmente oligonucleótidos en una amplia variedad de tipos de células [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)].

Además, también están disponibles algoritmos para la identificación de las secuencias con la afinidad de unión predicha más alta para su mRNA diana basados en un ciclo termodinámico que da cuenta de los aspectos energéticos de las alteraciones estructurales, tanto en el mRNA diana como en el oligonucleótido [véase, por ejemplo, Walton et al., *Biotechnol. Bioeng.* 65: 1-9 (1999)].

Tales algoritmos se han utilizado satisfactoriamente para implementar un método antisentido en células. Por ejemplo, el algoritmo desarrollado por los científicos facultados Walton et al., para diseñar satisfactoriamente oligonucleótidos antisentido para la beta-globina de conejo (abreviadamente RBG por sus iniciales en inglés) y los transcritos del factor alfa de necrosis tumoral de ratón (TNF-alfa). El mismo grupo de investigación ha descrito recientemente que la actividad antisentido de oligonucleótidos seleccionados racionalmente contra tres modelos de mRNA diana (lactato-deshidrogenasa A y B humana y gp130 de rata) en cultivo celular como se evaluó por una técnica de PCR cinética demostró ser eficaz en casi todos los casos, incluyendo ensayos contra tres dianas diferentes en dos tipos de células con químicas de oligonucleótidos fosfodiéster y fosforotioato.

Además, también se publicaron varios métodos para diseñar y predecir la eficacia de los oligonucleótidos específicos utilizando un sistema *in vitro* (Matveeva et al., *Nature Biotechnology* 16: 1374-1375 (1998)).

Varios ensayos clínicos han demostrado la seguridad, factibilidad y actividad de los oligonucleótidos antisentido. Por ejemplo, los oligonucleótidos antisentido adecuados para el tratamiento del cáncer se han utilizado satisfactoriamente [Holmund et al., *Curr. Opin. Mol. Ther.* 1: 372-85 (1999)], mientras que el tratamiento de neoplasias hematológicas por oligonucleótidos antisentido dirigidos al gen c-myb, p53 y Bcl-2 ha entrado en ensayos clínicos y ha demostrado ser tolerado por los pacientes [Gerwitz, *Curr. Opin. Mol. Ther.* 1: 297-306 (1999)].

Más recientemente, se ha descrito la supresión mediada por antisentido de la expresión del gen de la heparanasa humana para inhibir la diseminación pleural 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 antisentido que, como se describió anteriormente, han conducido a la generación de algoritmos de diseño antisentido de alta precisión y a una amplia variedad de sistemas de entrega de oligonucleótidos, permiten a un experto en la técnica diseñar e implementar métodos de antisentido adecuados para la sub-regulación de la expresión de secuencias conocidas sin También otro agente capaz de impedir la formación de un complejo NIK-HC8 es una molécula de ribozima capaz de

escindir específicamente un transcrito de mRNA que codifica una NIK o una HC8. Las ribozimas se están utilizando cada vez más para la inhibición específica de secuencias de la expresión génica por la escisión de los mRNA que codifican proteínas de interés [Welch et al., *Curr. Opin. Biotechnol.* 9: 486-96 (1998)]. La posibilidad de diseñar ribozimas para escindir cualquier RNA diana específico hace que sean valiosas herramientas en aplicaciones tanto de investigación básica como terapéuticas. En el campo terapéutico, las ribozimas han sido explotadas para dirigir los RNA virales en enfermedades infecciosas, oncogenes dominantes en cánceres y mutaciones somáticas específicas en trastornos genéticos [Welch et al., *Clin. Diagn. Virol.* 10: 163-71 (1998)]. Más notablemente, ya están disponibles en ensayos de Fase 1, varios protocolos de terapia génica con ribozimas para pacientes con VIH. Más recientemente, las ribozimas se han utilizado para la investigación en animales transgénicos, validación de genes dianas y la elucidación de vías. Varios ribozimas se encuentran en diversas fases de ensayos clínicos. La Angiozima fue la primera ribozima sintetizada químicamente para ser estudiada en ensayos clínicos humanos. La Angiozima inhibe específicamente la formación del VEGF-r (receptor del factor de crecimiento endotelial vascular), un componente clave en la vía de la angiogénesis. Ribozyme Pharmaceuticals, Inc., así como otras empresas han demostrado la importancia de la terapéutica anti-angiogénesis en modelos animales. La Heptazima, una ribozima diseñada para destruir selectivamente el RNA del virus de la hepatitis C (VHC), se ha encontrado eficaz en la disminución del RNA viral la hepatitis C en ensayos de cultivos celulares (Ribozyme Pharmaceuticals, Incorporated - página de inicio en la WEB).

La síntesis de moléculas de oligonucleótidos (por ejemplo, siRNA, antisentido, etc) adecuadas para uso con la presente invención se puede efectuar usando métodos habituales muy conocidos en la técnica y se especifican, por ejemplo, en P. Herdewijn, Ed., *Oligonucleotide Synthesis*, Humana Press, 2004.

La rotura de un complejo NIK-HC8 o la evitación de su formación también se puede efectuar utilizando un péptido que incluye una secuencia de aminoácidos derivada de HC8 capaz de unirse a NIK o una secuencia de aminoácidos derivada de NIK capaz de unirse a HC8. Más preferiblemente, el péptido es una secuencia de aminoácidos derivada de NIK abarcada por los aminoácidos 650-947 o 1-180 de la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 5.

Tal como se utiliza en la presente memoria, los términos "polipéptido" y "péptido" se usan indistintamente e incluyen péptidos naturales (ya sean productos de degradación, péptidos obtenidos sintéticamente o péptidos recombinantes) y peptidomiméticos (típicamente, péptidos obtenidos sintéticamente), tales como peptoides y semipeptoides que son análogos de péptidos, que pueden tener, por ejemplo, modificaciones que hacen a los péptidos más estables mientras están en el cuerpo, o menos inmunógenos. Tales modificaciones incluyen, pero sin limitación, ciclación, modificación en el extremo N, modificación en el extremo C, modificación de enlaces peptídicos, incluyendo, pero sin limitación, CH₂NH, CH₂S, CH₂S=, O=C-NH, CH₂-O, CH₂CH₂, S=C-NH, CH=CH o CF=CH, modificación de la cadena principal y modificación de residuos. Las secuencias de aminoácidos de HC8 de mamíferos (por ejemplo número de acceso en GeneBank XM_050947) y NIK (por ejemplo número de acceso en GeneBank Y10256) son fácilmente accesibles. La síntesis de moléculas de péptidos adecuadas para uso con la presente invención se puede efectuar usando métodos habituales bien conocidos en la técnica y especificados, por ejemplo, en CA Ramsden Ed., *Quantitative Drug Design*, Chapter 17.2, F. Choplin Pergamon Press, 1992.

En los casos en que la enfermedad está asociada con un aumento de la actividad de NF-κB (por ejemplo, linfoma de Hodgkin y otros muchos tipos de cáncer; enfermedades inflamatorias crónicas, tales como la enfermedad de Crohn y la artritis reumatoide) el sujeto puede ser tratado con un agente capaz estabilizar un complejo NIK-HC8 o aumentar su formación. El tratamiento con dicho agente promovería la fosforilación de HC8 dependiente de NIK y por lo tanto estabilizaría el proteasoma 26S, lo que daría como resultado un aumento de la degradación de NIK y/o NF-κB.

Un agente adecuado capaz de estabilizar un complejo NIK-HC8 o aumentar su formación puede ser un polinucleótido que codifica NIK o HC8. Alternativamente, el agente puede ser un polipéptido que incluye al menos una porción activa de NIK o HC8 o una de sus porciones que forman el complejo.

Como se ha mencionado anteriormente, la formación de complejos NIK-HC8 conduce a aumento de la fosforilación de HC8 y como resultado a un aumento de la estabilidad y la actividad del proteasoma 26S.

Por lo tanto, la presente descripción también contempla la estabilización o desestabilización del proteasoma 26S por aumento o disminución de la fosforilación de HC8 dependiente de NIK. Los agentes que pueden ser utilizados para alterar la fosforilación de HC8 dependiente de NIK incluyen, por ejemplo, los mutantes de NIK que carecen de actividad quinasa o inhibidores de la quinasa dirigidos a NIK-HC8.

Los agentes de la presente invención se pueden usar en el tratamiento de enfermedades relacionadas con NF-κB *per se* o como parte (ingrediente activo) de una composición farmacéutica.

Tal como se usa en la presente memoria una "composición farmacéutica" se refiere a una preparación de uno o más de los ingredientes activos descritos en la presente memoria con otros componentes químicos, tales como vehículos y excipientes fisiológicamente adecuados. El fin de una composición farmacéutica es facilitar la administración de un compuesto a un organismo.

De aquí en adelante, las frases "vehículo fisiológicamente aceptable" y "vehículo farmacéuticamente aceptable" que pueden ser usadas de forma intercambiable se refieren a un vehículo o un diluyente que no causa irritación significa-

tiva a un organismo y no anula la actividad biológica y las propiedades del compuesto administrado. En estas frases está incluido un coadyuvante.

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

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

10 Las vías adecuadas de administración pueden incluir, por ejemplo, oral, rectal, transmucosal, especialmente transnasal, suministro intestinal o parenteral, incluyendo inyecciones intramusculares, subcutáneas e intramedulares, así como inyecciones intratecales, intraventriculares directas, intravenosas, intraperitoneales, intranasales o intraoculares.

Alternativamente, se puede administrar la composición farmacéutica en una forma local en lugar de sistémica, por ejemplo, por inyección de la composición farmacéutica directamente en una región de tejido óseo de un paciente.

15 Las composiciones farmacéuticas de la presente invención se pueden fabricar por procedimientos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, por medio de procesos convencionales de mezclamiento, disolución, granulación, fabricación de grageas, levigación, emulsionamiento, encapsulación, atrapamiento o liofilización.

20 Las composiciones farmacéuticas para uso de acuerdo con la presente invención pueden ser formuladas de manera convencional usando uno o más vehículos fisiológicamente aceptables que comprenden excipientes y agentes auxiliares, que facilitan el procesamiento de los ingredientes activos en preparaciones que pueden ser usadas farmacéuticamente. La formulación apropiada depende de la vía de administración elegida.

25 Para inyección, los ingredientes activos de la composición farmacéutica pueden ser formulados en soluciones acuosas, preferiblemente en tampones fisiológicamente compatibles, tales como solución de Hank, solución de Ringer, o tampón salino fisiológico. Una vía de administración que es adecuada para las composiciones farmacéuticas de la presente invención es la inyección sub-perióstica, como se describe en la patente de EE.UU. n° 6.525.030 de Eriksson. Para la administración transmucosal, se utilizan en la formulación agentes penetrantes apropiados para la barrera que ha de ser permeada. Tales agentes penetrantes son generalmente conocidos en la técnica.

30 Para administración oral, la composición farmacéutica se puede formular fácilmente combinando los compuestos activos con vehículos farmacéuticamente aceptables bien conocidos en la técnica. Tales vehículos permiten que la composición farmacéutica sea formulada como comprimidos, píldoras, grageas, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, pastas, suspensiones, y similares, para la ingestión oral por 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, añadiendo después, si se desea, agentes auxiliares adecuados 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, hidroxipropilmetilcelulosa, carbo-
35 metilcelulosa sódica; y/o polímeros fisiológicamente aceptables, tal como polivinilpirrolidona (PVP). Si se desea, pueden añadirse agentes disgregantes, tales como polivinilpirrolidona reticulada, agar-agar o ácido algínico o una de sus sales, tal como alginato de sodio. Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "administración oral" incluye la administración del compuesto farmacéutico a cualquier superficie oral, incluyendo la lengua, encías, paladar, u otras superficies bucales. Métodos adicionales de administración oral incluyen el suministro de la composición farmacéutica en una niebla, pulverización o suspensión compatibles con los tejidos de la superficie oral.

45 Los núcleos de grageas se proporcionan con recubrimientos adecuados. Para este fin, pueden ser utilizadas soluciones de azúcar concentradas que pueden contener opcionalmente goma arábica, talco, polivinilpirrolidona, gel de Carbopol, polietilenglicol, dióxido de titanio, soluciones de laca y disolventes orgánicos adecuados o mezclas de disolventes. Se pueden añadir a los comprimidos o recubrimientos de grageas colorantes o pigmentos para identificación o para caracterizar diferentes combinaciones de dosis de compuestos activos.

50 Las composiciones farmacéuticas que se pueden usar por vía oral, incluyen cápsulas de dos piezas hechas de gelatina, así como cápsulas blandas selladas hechas de gelatina y un plastificante, tal como glicerol o sorbitol. Las cápsulas de dos piezas pueden contener los ingredientes activos mezclados con una carga, tal como lactosa, aglutinantes, tales como almidones, lubricantes, tales como talco o estearato de magnesio y, opcionalmente estabilizantes. En las cápsulas blandas, los ingredientes activos pueden estar disueltos o en suspensión en líquidos adecuados, tales como aceites grasos, parafina líquida o polietilenglicoles líquidos. Además, se pueden añadir estabilizantes. Todas las formulaciones para administración oral deben estar en dosis adecuadas para la vía de administración
55 elegida.

Para administración bucal, las composiciones pueden tomar la forma de comprimidos o pastillas para chupar formuladas de manera convencional.

Para administración por inhalación nasal, los ingredientes activos para uso de acuerdo la presente invención se suministran convenientemente en forma de una presentación pulverizable en aerosol desde un envase presurizado o un nebulizador con el uso de un agente propulsor adecuado, por ejemplo, diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano o dióxido de carbono. En el caso de un aerosol presurizado, la unidad de dosificación puede determinarse proporcionando una válvula para administrar una cantidad medida. Las cápsulas y cartuchos de, por ejemplo, gelatina para uso en un dispensador pueden ser formuladas de forma que contengan una mezcla en polvo del compuesto y un polvo base adecuado, tal como lactosa o almidón.

La composición farmacéutica descrita en la presente memoria puede ser formulada para administración parenteral, por ejemplo, por inyección de bolo o infusión continua. Las formulaciones para inyección pueden presentarse 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 puesta en suspensión, estabilizantes y/o dispersantes.

Las composiciones farmacéuticas para administración parenteral incluyen soluciones acuosas de la preparación activa en forma soluble en agua. Adicionalmente, las suspensiones de los ingredientes activos se pueden preparar en forma de suspensiones para inyección de base oleosa o acuosa apropiada. Los disolventes o vehículos lipófilos adecuados incluyen aceites grasos, tal como aceite de sésamo, o ésteres de ácidos sintéticos, 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 carboximetilcelulosa sódica, sorbitol o dextrano. Opcionalmente, la suspensión también puede contener estabilizantes o agentes adecuados que aumentan la solubilidad de los ingredientes activos para permitir la preparación de soluciones altamente concentradas.

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

La composición farmacéutica se puede formular también en composiciones para la vía rectal, tales como supositorios o enemas de retención, usando, por ejemplo, bases de supositorios convencionales, tales como manteca de cacao u otros glicéridos.

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 fin pretendido. Más específicamente, una cantidad terapéuticamente eficaz significa una cantidad de ingredientes activos (por ejemplo, oligonucleótido antisentido) eficaz para prevenir, aliviar o mejorar los síntomas de un trastorno (por ejemplo, la progresión del tumor mamario) o prolongar la supervivencia del sujeto que está siendo tratado.

La determinación de una cantidad terapéuticamente eficaz está dentro de la capacidad de los expertos en la técnica, especialmente a la luz de la descripción detallada proporcionada en la presente memoria.

Para cualquier preparación utilizada en los métodos descritos en esta memoria, la cantidad o la dosis terapéuticamente eficaz se puede estimar inicialmente a partir de ensayos *in vitro* y de cultivo celular. La toxicidad y la eficacia terapéutica de los ingredientes activos descritos en la presente memoria se pueden determinar por procedimientos farmacéuticos estándares *in vitro*, en cultivos celulares o en animales experimentales. Los datos obtenidos de estos ensayos *in vitro* y de cultivos celulares y de estudios en animales se pueden usar para formular un intervalo de dosificación para uso en seres 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 pueden ser seleccionadas por cada médico teniendo en cuenta el estado del paciente. (Véase, por ejemplo, Fingl, et al., 1975, en "*The Pharmacological Basis of Therapeutics*", Ch. 1, p. 1).

La cantidad y el intervalo de dosificación se pueden ajustar individualmente a los niveles de ingrediente activo que sean suficientes para, por ejemplo, retardar la progresión del tumor en el caso de metástasis blásticas (concentración eficaz mínima, CEM). La CEM variará para cada preparación, pero puede estimarse a partir de datos *in vitro*. Las dosificaciones necesarias para conseguir la CEM dependerán de las características individuales y la vía de administración. Los ensayos de detección se pueden utilizar para determinar las concentraciones plasmáticas.

Dependiendo de la gravedad y la respuesta de la afección que se ha de tratar, la dosificación puede ser de una sola o de una pluralidad de administraciones, durando el tratamiento desde varios días hasta varias semanas o hasta que se logre disminución del estado morbosos.

La cantidad de una composición que se ha de administrar dependerá, por supuesto, del sujeto que ha de tratarse, la gravedad de la afección, el modo de administración, el juicio del médico que prescribe, etc.

Las composiciones como las descritas en esta memoria pueden, ser presentadas, si se desea, en un envase o dispositivo dispensador, tal como un kit aprobado por la FDA, que puede contener una o más formas de dosificación unitaria que contengan el ingrediente activo. El envase puede comprender, por ejemplo, una lámina de metal o plástico, tal como un envase blíster. El envase o dispositivo dispensador puede ir acompañado de instrucciones para la administración. El envase o dispositivo dispensador puede tener insertado un prospecto asociado al recipiente en

una forma prescrita por una agencia gubernamental que regule la fabricación, uso o venta de productos farmacéuticos, cuyo prospecto refleje la aprobación por la agencia de la forma de las composiciones o de la administración humana o veterinaria. Dicho prospecto, por ejemplo, puede llevar una etiqueta aprobada por la *Food and Drug Administration* de Estados Unidos para los medicamentos de venta con receta o de una notificación del producto aprobado. También se pueden preparar composiciones que comprenden una preparación de la invención formulada en un vehículo farmacéutico compatible, ser colocadas en un recipiente apropiado y ser etiquetadas para el tratamiento de una afección indicada, como se ha detallado anteriormente.

Con el fin de facilitar la práctica de los métodos descritos anteriormente, y/o la producción de las composiciones farmacéuticas descritas anteriormente, la presente invención proporciona además un método *in vitro* de identificación de nuevos candidatos a fármacos para el tratamiento de enfermedades asociadas con la actividad de NF- κ B, comprendiendo el método identificar una molécula capaz de modular la unión NIK-HC8, siendo dicha molécula el candidato a fármaco.

El método se lleva a cabo por cribado de una pluralidad de moléculas, preferiblemente un compuesto químico de pequeño tamaño molecular, un polinucleótido, un oligonucleótido, un aptámero, un polipéptido, un péptido o un anticuerpo, para detectar una capacidad de disociar un complejo NIK-HC8 o evitar su formación en células de mamíferos. El cribado se puede efectuar usando un ensayo de co-inmunoprecipitación en lisados de células cultivadas que co-expresan HC8 y NIK. Un ensayo de cribado ilustrativo se describe con detalle en el Ejemplo 1 del apartado de Ejemplos más adelante. Alternativamente, los candidatos a fármacos pueden ser cribados para determinar la capacidad de modular la fosforilación de HC8 dependiente de NIK, utilizando un ensayo de quinasa *in vitro*, tal como se describe en detalle en el Ejemplo 2 del apartado Ejemplos más adelante.

Una vez que se identifican las moléculas capaces de modular *in vitro* la fosforilación de HC8 dependiente de NIK, se lleva a cabo un análisis adicional con el fin de determinar sus capacidades de penetración en las células y su toxicidad para los mamíferos. Si es necesario, los candidatos a fármacos adecuados se modifican con el fin de aumentar su penetración celular y disminuir su toxicidad sin afectar sustancialmente a su actividad en la modulación de la fosforilación de HC8 dependiente de NIK.

Los objetos, ventajas y nuevas características adicionales de la presente invención serán evidentes para un experto habitual en la técnica tras el examen de los siguientes ejemplos, que no pretenden ser limitativos. Además, cada uno de las diversas realizaciones y aspectos de la presente invención, tal como se exponen anteriormente y como se reivindica en el apartado de reivindicaciones más adelante, encuentra apoyo experimental en los siguientes ejemplos.

Ejemplos

A continuación se hace referencia a los siguientes ejemplos, que junto con las descripciones anteriores, ilustran la invención de una manera no limitativa.

Generalmente, la nomenclatura utilizada en la presente memoria y los procedimientos de laboratorio utilizados en la presente invención incluyen técnicas moleculares, bioquímicas, microbiológicas y de DNA recombinante. Tales técnicas están explicadas completamente en la bibliografía. Véanse, por ejemplo, "*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*", Sambrook et al, (1989); "*Current Protocols in Molecular Biology*" Volumes I-III, Ausubel, R. M., ed. (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, New York (1988); Watson et al., "*Recombinant DNA*", Scientific American Books, New York; Birren et al. (Eds) "*Genome Analysis: A Laboratory Manual Series*", Vols. 1-4, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1998); metodologías como las establecidas en las patentes de EE.UU. nº 4.666.828; 4.683.202; 4.801.531; 5.192.659 y 5.272.057; "*Cell Biology: A Laboratory Handbook*", Volumes I-III, Cellis, J. E., ed. (1994); "*Current Protocols in Immunology*", Volumes I-III, Coligan J. E., ed. (1994); Stites et al., (eds), "*Basic and Clinical Immunology*" (8th Edition), Appleton & Lange, Norwalk, CT (1994); Mishell and Shiigi (eds), "*Selected Methods in Cellular Immunology*", W. H. Freeman and Co., New York (1980); los inmunoensayos disponibles están descritos extensamente en la bibliografía de patentes y científica, véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. nº 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; "*Oligonucleotides Synthesis*" Gait, M. J., ed. (1984); "*Nucleic Acid Hybridization*" Hames, B. D., y Higgins S. J., eds. (1985); "*Transcription and Translation*", Hames, B. D., y S. J. and Higgins, Eds. (1984); "*Animal Cell Culture*" Freshney, R. I., ed. (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).

Otras referencias generales se proporcionan en esta memoria. Se cree que los procedimientos mencionados en la presente memoria son bien conocidos en la técnica y se proporcionan para comodidad del lector.

Ejemplo 1**NIK interacciona con la subunidad HC8 del proteasoma 20S****Materiales y procedimientos experimentales**

5 **Construcciones:** Se generaron construcciones NIK-pCS3MTNIK con 6 etiquetas myc N-terminales, aly NIK, quina-
sa NIK inactiva, NIK K670A y SniP NIK H674Y a partir de pCS3MTNIK por mutagénesis dirigida al sitio utilizando
DNA-polimerasa Pfu siguiendo el protocolo del fabricante (Stratagene).

Se subclonó HC8 de la proteína presa (*prey*) de 2 híbridos en el vector pCDNA3 con la etiqueta His en el extremo N
y luego se subclonó en pCDNA3 con una etiqueta *myc* añadida en el extremo C.

10 El mutante HC8 SS 243,250AA fue generado por mutagénesis dirigida al sitio. Todas las deleciones en NIK fueron
creadas ya sea por digestión con restricción en la región correspondiente o ya sea por amplificación por PCR y se
clonaron en el vector pCDNA-His.

15 **Ensayo de cribado de doble híbrido en levadura:** Se clonaron NIK o sus deleciones en el vector pGBKT7 como
proteína cebo (*bait*) y se volvieron a clonar las proteínas presas en el vector pGADT7 para ensayo en la cepa de
levadura SFY526. El sistema utilizado para el cribado fue la versión III de Matchmaker (Clontech). La proteína presa
era una mezcla de genotecas de médula ósea humana pre-transformadas (nº de catálogo HY4053AH) de 51 hom-
bres/mujeres en el intervalo de edad 22-70 años. Pertenece a una nueva generación de genotecas de 2 híbridos
que ofrece alta selección estricta de desecho cuádruple (abreviadamente QDO por la expresión inglesa *Quadruple*
Drop Out) junto con ensayo de α -gal. Los clones que crecen en placas sin Leu, Trp, His y Ade fueron reconfirmados
20 por el ensayo de α -gal. Los plásmidos de los clones positivos se prepararon por lisis de las células de levadura con
detergente y estrés mecánico seguido por extracción con fenol y precipitación del DNA con etanol. Los insertos codi-
ficados de los plásmidos se amplificaron por PCR con los cebadores específicos para el vector pACT2.de la genote-
ca.

Células: Se utilizaron células HEK 293T y células HeLa.

25 **Transfección:** La transfección se realizó utilizando el método de precipitación con fosfato de calcio como se descri-
be por Sambrook et al., (*Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. SE. Press CSH, 1989). Brevemente, se sembraron
1,5 millones de células 293-T en placas de 10 cm. Tras un período de incubación de 24 h, los cultivos se transfecta-
ron con los plásmidos respectivos, manteniendo mientras una concentración de DNA total de 15 μ g por placa por
adición de vector vacío.

30 **Preparación del lisado y co-inmunoprecipitación:** Las células se recogieron 24 h después de la transfección,
luego se lisaron en tampón de lisis Triton X-100 al 1% [(Triton X-100 al 1%, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, Tris-Cl 20
mM (pH 7,6) e inhibidor de proteasa completo 1X (Roche)]. Todas las inmunoprecipitaciones se llevaron a cabo por
incubación durante 4 horas a 4°C con los anticuerpos respectivos y perlas de proteína G-Sepharose (Amersham
Pharmacia).

Transferencia de Western: Las transferencias de Western fueron desarrolladas por ECL (Pierce).

Resultados

35 Se efectuó un cribado de 2 híbridos de levadura utilizando como proteína presa cDNA intacto de NIK (nº de acceso
en GenBank Y10256; SEQ ID NO: 5), extremo C de NIK (aminoácidos 624-947 de SEQ ID NO: 5) o extremo N de
NIK (amino ácidos 1-367). La proteína presa más prevalente que se encontró en estos cribados fue la subunidad α 7
(HC8) (nº de acceso en GenBank XM_050947). Estas interacciones fueron validadas en la cepa de levadura heteró-
40 loga, SFY526, en la que las interacciones de HC8 con el extremo C de NIK-C o con el extremo N de NIK- se encon-
traron sustancialmente mucho más fuertes que la interacción de HC8 con NIK de longitud completa (véase Tabla 1,
siguiente).

Tabla 1

Proteína cebo	Proteína presa	Fuerza de la interacción
NIK	HC8	++
NIK	TRAF2	-
Extremo C de NIK	HC8	++++
Extremo C de NIK	TRAF2	+
Extremo N de NIK	HC8	+++
Extremo N de NIK	TRAF2	-

"++++" y "++" designan el desarrollo de color fuerte (expresión de β -gal) en 30 minutos y 1 h después de la iniciación del ensayo, respectivamente; "+" Indica el desarrollo de color fuerte después 3 h de la iniciación del ensayo; "-" designa ningún desarrollo de color 24 después de la iniciación del ensayo.

5 Para estudiar la interacción NIK-HC8 en células de mamífero, se realizó un ensayo de co-inmunoprecipitación en lisados de células 293T que co-expresan transitoriamente NIK (Nº de acceso Y10256; SEQ ID NO: 5) y/o HC8 (Nº de acceso XM_050947). Como es evidente en las Figuras 1a-b, los experimentos de co-inmunoprecipitación demuestran que NIK y HC8 interactúan bidireccionalmente, es decir, inmunoprecipitano NIK co-precipitaba HC8 (Figura 1a), mientras que inmunoprecipitando HC8 co-precipitaba NIK (Figura 1b). Una mutación *aly* en NIK [que causa una sustitución de aminoácidos en el extremo C (Shikura (1999) *Nat. Genet.* 22: 74-7)] abolió completamente su interacción con HC8 (Figura 1b). Además, se encontró que la NIK de ratón era capaz de unirse a HC8 (Figura 6).

10 Los análisis por delección de NIK humana revelaron la presencia de al menos dos regiones de unión a HC8: una entre de los aminoácidos 650-947 en el extremo C de NIK (Figura 3a), y otra entre los aminoácidos 1-180 en el extremo N de NIK (Figuras 3b-c, 4).

15 Los experimentos de co-inmunoprecipitación que utilizan HC8 etiquetada con myc-His y NIK etiquetada con His co-expresadas transitoriamente en células HeLa muestran que la unión NIK-HC8 se produce dentro de la HC8 asociada al proteasoma (en oposición al HC8 libre; Figura 5). Una mutación *aly*, la sustitución de la lisina 670 por alanina o una variación polimórfica natural de un solo nucleótido de NIK (H674Y) no afectó a la unión de NIK a HC8 asociada al proteasoma (Figura 7).

Ejemplo 2

NIK fosforila HC8 en dos residuos de serina en su extremo C1

20 La HC8 contiene dos residuos de serina conservados, S243 y S250, que son dianas para la fosforilación de caseína quinasa 2 (CK2) (Castaño et al., *Biochemistry* 35: 3782-789, 1996). Con el fin de analizar la capacidad de NIK para fosforilar HC8, se efectuó un ensayo de quinasa *in vitro*.

Materiales y procedimientos experimentales

25 El ensayo de quinasa *in vitro* y la transferencia de Western se realizaron esencialmente como ha sido descrito por Ramakrishnan et al., (*Immunity*, 21: 477-489, 2004).

Resultados

30 Como se muestra en las Figuras 2a-b, se encontró que HC8 era un sustrato para la fosforilación de NIK en un ensayo de quinasa *in vitro*. La sustitución de dos residuos de serina en HC8 (aminoácidos 243 y 250) por alanina abolió completamente la fosforilación de HC8 inducida por NIK (Figura 2a). Sin embargo, mientras que el mutante de HC8 se unía a NIK (similarmemente a HC8 de tipo natural) no se unía a *aly* NIK (Figura 2b).

Como se muestra en la Figura 8, la mutación de los residuos de serina 243 y 250 de HC8 inhibía sustancialmente la vía de NF- κ B alternativa inducida por NIK, así como la translocación nuclear de HC8 y NIK. Los datos adicionales sugieren que la fosforilación de HC8 inducida por NIK que resulta de la unión NIK-HC8 puede servir para potenciar la degradación de NIK.

35 Se aprecia que ciertas características de la invención, que son, para mayor claridad, descritas en el contexto de realizaciones separadas, también pueden proporcionarse en combinación en una sola realización. A la inversa, diversas características de la invención, que, por brevedad, se describen en el contexto de una única realización, también pueden proporcionarse por separado o en cualquier sub-combinación adecuada.

40 La cita o identificación de cualquier referencia en esta solicitud no se interpretará como una admisión de que dicha referencia está disponible como técnica anterior a la presente invención.

Listado de secuencias

<110> Yeda Research and Development Co. Ltd. WALLACH, David RAMAKRISHNAN, Parameswaran SHMUSHKOVICH, Taisia

5 <120> Composiciones farmacéuticas para tratar enfermedades asociadas con la actividad de NF-kappaB

<130> 1020

10 <150> 166006
<151> 2004-12-26

<160> 5

15 <170> PatentIn version 3.1

<210> 1
<211> 21
<212> DNA

20 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido de siRNA sintético

25 <400> 1

uaccuccacu cacgaaggat t 21

<210> 2
<211> 21
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> Oligonucleótido de siRNA sintético

35 <400> 2

uaccuccacu cacgaaggat t 21

40 <210> 3
<211> 21
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Oligonucleótido de siRNA sintético

50 <400> 3

gcagaaugcc ucccaggaut t 21

<210> 4
<211> 21
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

55 <220>
<223> Oligonucleótido de siRNA sintético

60 <400> 4

auccugggag gcauucugct t 21

65 <210> 5

ES 2 518 340 T3

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

5 <400> 5

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
 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

10

ES 2 518 340 T3

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
 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

ES 2 518 340 T3

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

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

ES 2 518 340 T3

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

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo o fragmento de anticuerpo capaz de evitar la formación de un complejo NIK-HC8, en donde un dominio de reconocimiento de antígenos del anticuerpo o su fragmento reconoce los aminoácidos 1-180 de la secuencia de aminoácidos representada en la SEQ ID NO: 5.
- 5 2. Un polipéptido que comprende no más de 200 aminoácidos y que incluye la secuencia de aminoácidos representada por las coordenadas 1-180 de la SEQ ID NO: 5, siendo el polipéptido capaz de evitar la formación de un complejo NIK-HC8.
3. Un método *in vitro* de identificación de un candidato a fármaco adecuado para tratar una enfermedad asociada con la actividad de NF- κ B, comprendiendo dicho método identificar una molécula capaz de modular la unión NIK-HC8, siendo dicha molécula el candidato a fármaco.
- 10 4. El método de la reivindicación 3, en donde dicha molécula se selecciona del grupo que consiste en un compuesto químico de pequeño tamaño molecular, un polinucleótido, un oligonucleótido, un aptámero, un polipéptido, un péptido y un anticuerpo.

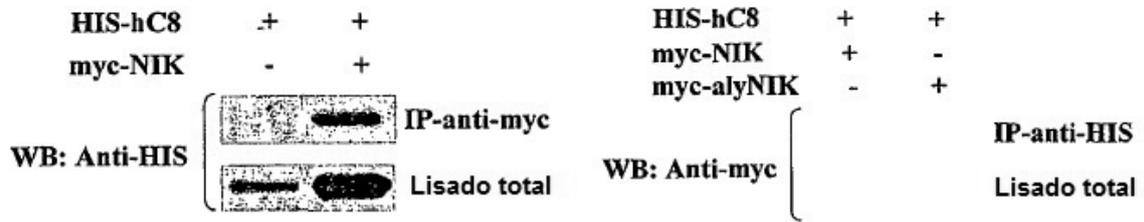


Figura 1a-b

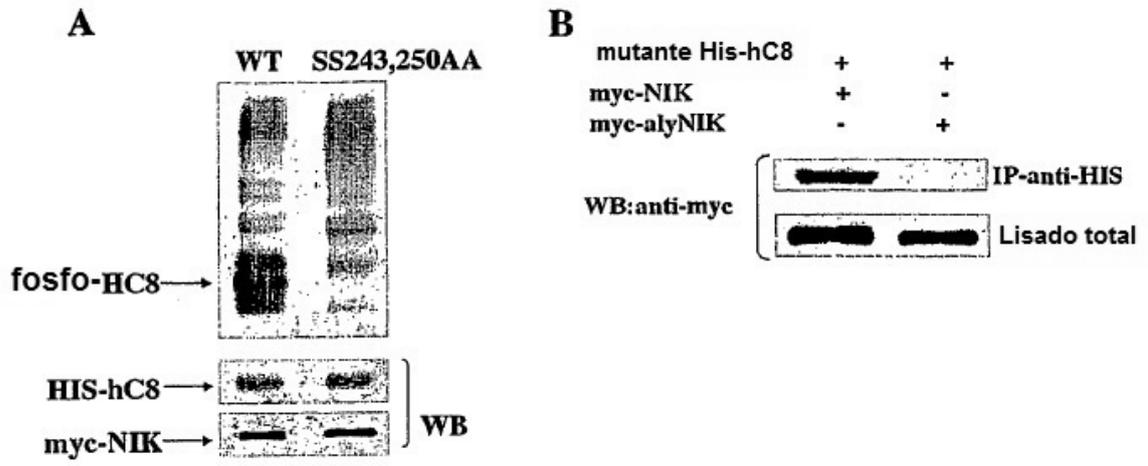
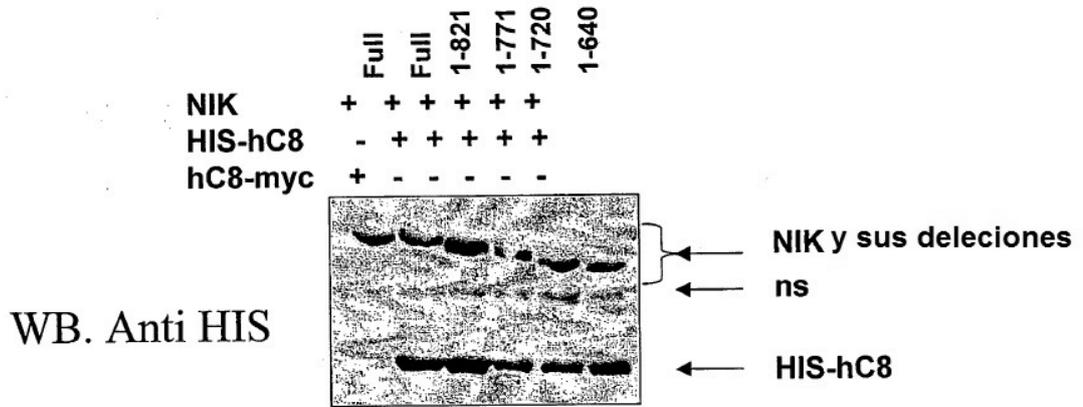


Figura 2a-b



hC8 se une a todas las deleciones del extremo C de NIK

Fig.3a

La delección de 187 aa del extremo N de NIK no afecta a la unión a hC8

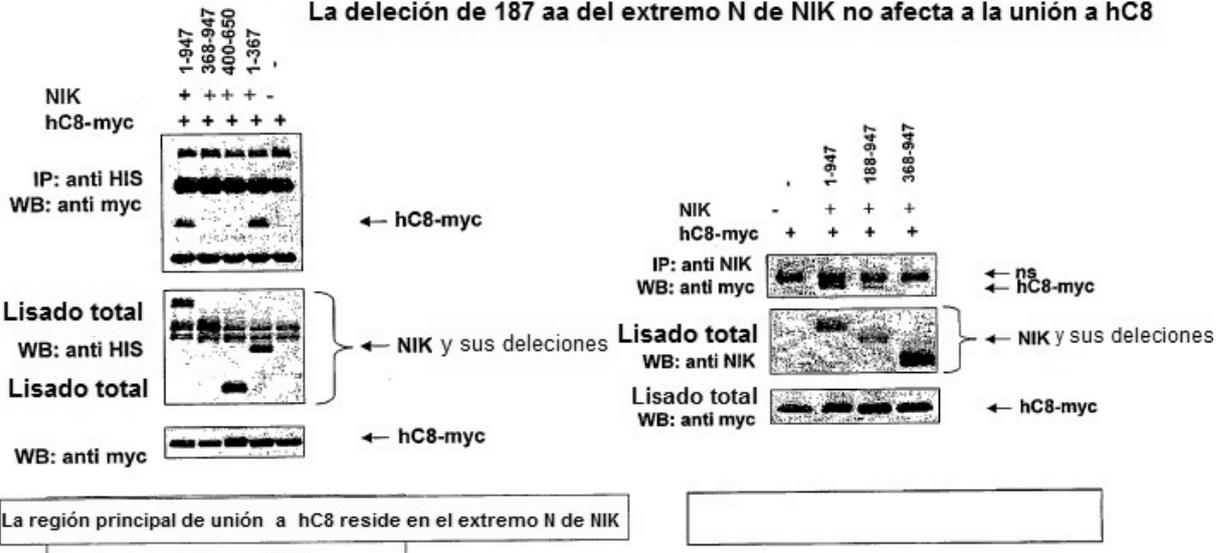


Fig.3b

Fig.3c

Fig.3d

IP antimyc
WB antiHIS

Lisado total

1 2 1 2



1. NIK1-237+hC8myc
2. 1-367 "

Fig.3e

IP antimyc
WB antiHIS

Lisado total

1 2 3 1 2 3



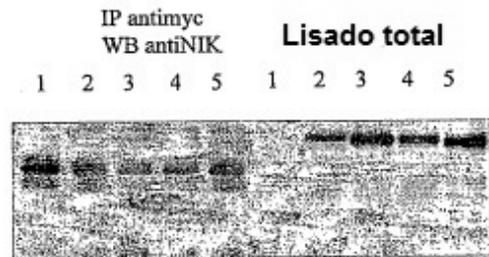
1. NIK1-180+hC8myc
2. 1-201 "
3. 1-220 "



Fig.3f

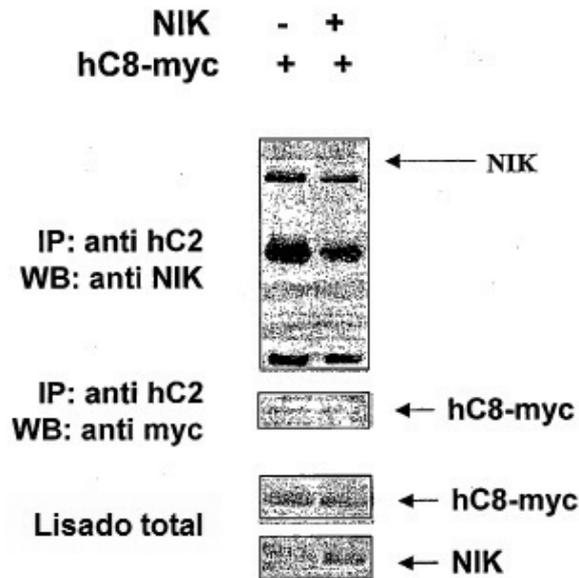
1. NIK238-947+hC8myc
2. 251-947 "
3. 281-947 "
4. 321-947 "
5. 368-947 "

Fig.3g



- | | |
|------------------|---------|
| 1. pc | +hC8myc |
| 2. NIK 259-947 " | |
| 3. 281-947 " | |
| 4. 305-947 " | |
| 5. 321-947 " | |

Fig 5

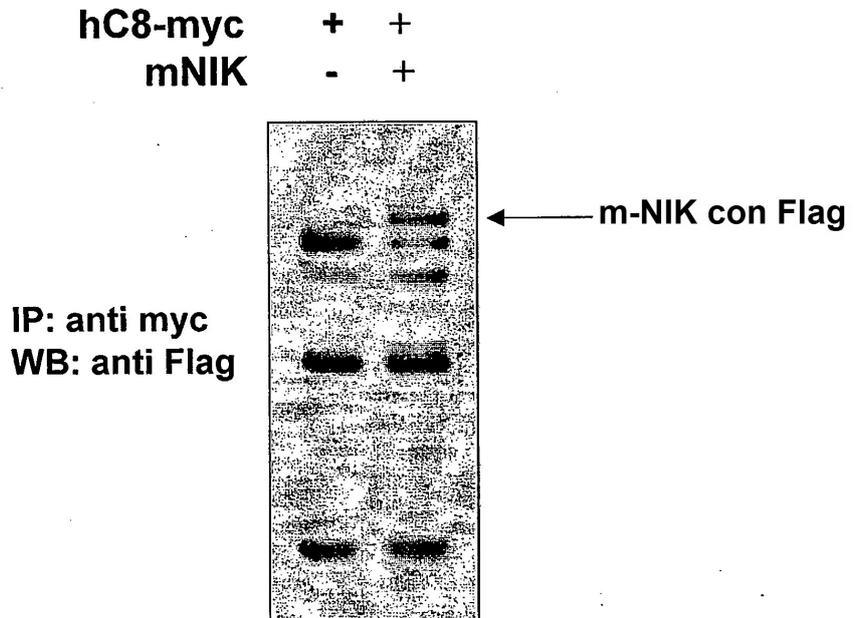


NIK sobre-expresada se une al proteasoma

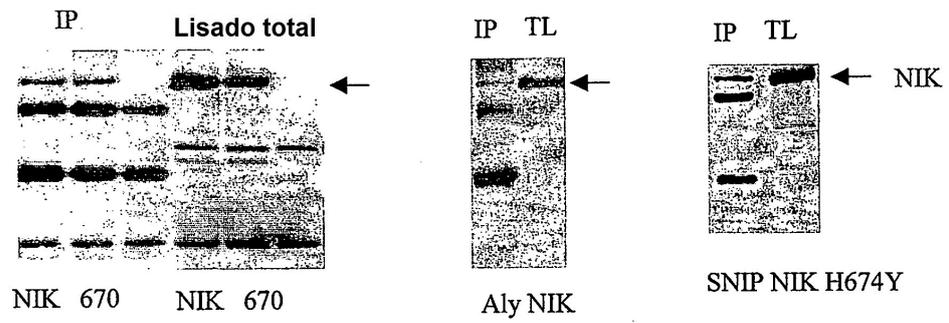
hC8-myc sobre-expresada se incorpora en el proteasoma

Fig 6

mNIK se une con hC8



WT-NIK, NIK K670A, alyNIK y SNIP H674Y NIK se unen todas al proteasoma



IP anti

C2

WB antiNIK

Fig 7

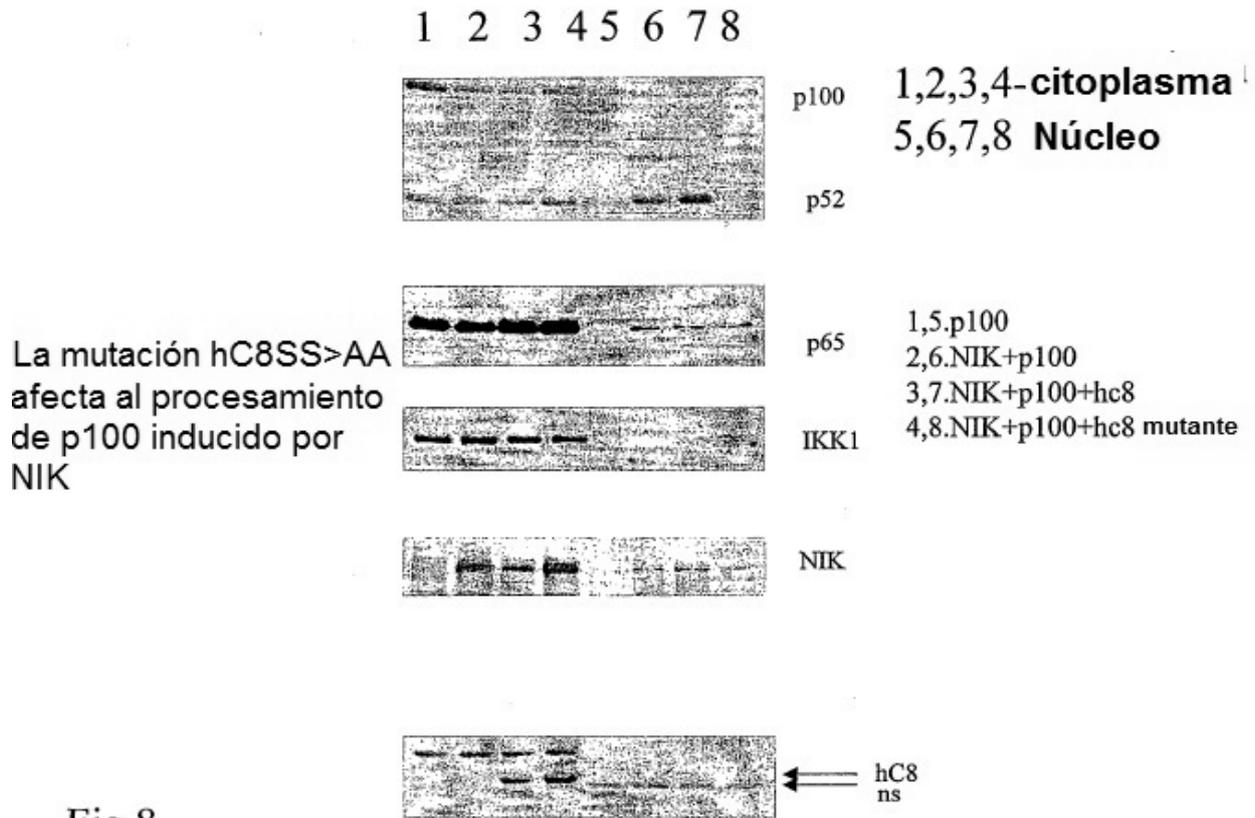


Fig 8