

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 606 950**

51 Int. Cl.:

C07K 14/435 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.02.2008 PCT/EP2008/052399**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.09.2008 WO08104575**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.02.2008 E 08735412 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.09.2016 EP 2125879**

54 Título: **Mediador del sistema inmune**

30 Prioridad:

28.02.2007 GB 0703887

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

28.03.2017

73 Titular/es:

ARABIAN GULF UNIVERSITY (50.0%)

P.O. Box 26671

Manama, BH y

BAKHJET, ABDELMOIZ (50.0%)

72 Inventor/es:

BAKHJET, ABDELMOIZ y

TAHA, SAFA

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 606 950 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

Mediador del sistema inmune

- 5 La presente invención se relaciona con un mediador del sistema inmune y, particularmente, un nuevo polipéptido que se induce por un estímulo nervioso y que se ha encontrado que media la transmisión de señales entre el sistema inmune y el sistema nervioso a continuación de un reto inmune.
- 10 Una desconcertante variedad de agentes infecciosos y parásitos ganan subsistencia a expensas de sus huéspedes. Aunque la interacción huésped-parásito depende de la virulencia de los parásitos y la resistencia del huésped, los primeros eventos de inmunidad innata durante las interacciones huésped-parásito son muy importantes en la dirección del patrón final de la respuesta inmune. Estos primeros eventos de la respuesta inmune innata están, sin embargo, mucho menos bien caracterizados que las respuestas inmunes secundarias posteriores.
- 15 Las respuestas inmunes no están aisladas de otros sistemas de órganos en el organismo, y de hecho hay varios medios de comunicación entre estos sistemas de órganos y el sistema inmune. Entre estas comunicaciones están las interacciones reguladoras entre el sistema nervioso y el sistema inmune. El sistema nervioso de los vertebrados se divide en el sistema nervioso central (CNS), que consiste en el cerebro y la médula espinal y el sistema nervioso periférico (PNS), que consiste en todos los otros nervios que no forman parte del CNS. El PNS se subdivide, además, en sistemas simpático, parasimpático y entérico. El sistema nervioso simpático prepara al organismo para situaciones estresantes y activa lo que se denomina a menudo la respuesta de 'lucha o huida'. Esta respuesta se conoce, además, como la respuesta simpático-adrenal del organismo, ya que los nervios adrenérgicos liberan noradrenalina y adrenalina como neurotransmisores para el sistema nervioso simpático. Los canales de contacto entre el sistema nervioso y el sistema inmune incluyen la inervación simpática noradrenérgica de los órganos linfoides primarios y secundarios, adicionalmente a la estimulación de los linfocitos y otras células inmunocompetentes en virtud de sus receptores β y α -adrenérgicos (Hadden y otros, 1970, Sanders y Munsson, 1985, Saito H, 1990, Madden y Livnat, 1991, Elenkov y otros, 2000).
- 25 La vía de señalización del sistema nervioso con el inmune de las primeras respuestas naturales a la infección ya se ha investigado, y el bazo se ha demostrado que desempeña un papel importante. El bazo, que es un importante órgano linfóide implicado en las respuestas inmunes contra todos los tipos de antígenos que aparecen en la circulación, está ricamente inervado por neuronas adrenérgicas que entran en su parénquima y permanecen en gran parte asociadas con la vasculatura esplénica.
- 30 Estudios recientes han ilustrado que las células dentro del sistema nervioso central (CNS) tienen la capacidad de producir moléculas de la inmunidad innata, que durante ciertos retos, pueden causar enfermedades inflamatorias y/o autoinmunes. Tales moléculas se han mostrado, además, que actúan como importantes moduladores del destino de las neuronas (Simard y Rivest, 2005) y se mostraron vitalmente involucradas en el desarrollo del cerebro (Bakhiet y otros, 2001).
- 35 Interacciones críticas entre el sistema nervioso y el sistema inmunológico se investigaron aún más durante la Miastenia gravis autoinmune experimental (EAMG). Se han demostrado efectos sustanciales del sistema nervioso en las respuestas inmunes que influyen en el resultado de la EAMG, ya que la desnervación quirúrgica del bazo redujo significativamente la gravedad clínica de la enfermedad, suprimió el número de células secretoras de IgG e IFN-gamma, reguló por disminución la expresión de ARNm de citoquinas y redujo la producción de corticosterona y PGE₂ (Bakhiet y otros, 2006). Además, se encontraron respuestas inmunes a la infección de parásitos en los primeros estadios de la tripanosomiasis africana experimental (EAT) que se modularon a través de la inervación autónoma del bazo (Liu y otros, 2000, Liu y otros, 2004), pero el(los) factor(es) que está(n) involucrado(s) en este mecanismo no se conoce(n).
- 40 Hasta la fecha no se ha identificado alguna molécula o grupo de moléculas que funcionan como mediadores entre los sistemas nervioso e inmune en respuesta a un estímulo nervioso a continuación de un reto inmune. Los presentes inventores, sin embargo, han ahora identificado una molécula tal, y cuya molécula puede ser particularmente ventajosa en la comprensión adicional del mecanismo de puesta en marcha y acción de la inmunidad innata. Además, tal mediador ofrece también beneficios particulares como un agente terapéutico potencial para modular las respuestas naturales en los trastornos del sistema inmunológico o en individuos inmunosuprimidos o inmunocomprometidos. Además, los compuestos o moléculas que inhiben esa función de un mediador tal, pueden ser particularmente ventajosos como un tratamiento terapéutico en los individuos con un sistema inmune sobreestimulado.
- 45 Por lo tanto, de acuerdo con un primer aspecto de la presente invención, se proporciona una molécula de ácido nucleico aislado que codifica un polipéptido designado en la presente descripción como ISRAA (agente de activación liberado por el sistema inmune), cuyo polipéptido se ha encontrado que ventajosamente desempeña un papel de mediación importante en la transmisión de señales entre el sistema nervioso y el sistema inmune. La molécula de ácido nucleico de la presente invención puede comprender la secuencia de nucleótidos de longitud completa para ISRAA (sec. con núm. de ident.: 1) o consistir en esa de marco de lectura abierto identificada en la sec. con núm. de ident.: 2 o secuencias complementarias a estas. En otra modalidad, la presente invención proporciona moléculas de ácido nucleico que codifican para un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que exhibe cualquiera de al menos 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 100 % de homología con la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 1 o 2.

80 %, 85 %, 90 %, 95 % ó 99 % de homología o identidad de secuencia de aminoácidos de acuerdo con la sec. con núm. de ident.: 3.

5 El término "aislado" se refiere a un ácido nucleico sustancialmente libre de material celular o medio de cultivo cuando se produce mediante técnicas de ADN recombinante, o de precursores químicos u otros productos químicos, cuando se sintetiza químicamente. Una molécula de ácido nucleico "aislada" está, además, libre de secuencias que flanquean naturalmente el ácido nucleico (es decir, secuencias localizadas en los extremos 5' y 3' del ácido nucleico) en el organismo del que se deriva el ácido nucleico. El término molécula de "ácido nucleico" se pretende que incluya ADN y ARN y puede ser de doble cadena o de simple cadena. En una modalidad, el ácido nucleico es un ADNc que comprende una secuencia de nucleótidos que se muestra en la sec. con núm. de ident.: 1. En otra modalidad, el ácido nucleico es un ADNc que consiste en la región codificante de la secuencia de nucleótidos, que se muestra en la sec. con núm. de ident.: 2. En otra modalidad, el ácido nucleico codifica una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que se muestra en la sec. con núm. de ident.: 3.

15 Se proporcionan ácidos nucleicos que tienen homología de secuencia sustancial con la secuencia de nucleótidos que se muestra en la sec. con núm. de ident.: 1 o sec. con núm. de ident.: 2 que codifican proteínas que tienen homología sustancial con la secuencia de aminoácidos que se muestra en la sec. con núm. de ident.: 3. La homología se refiere a la similitud de secuencia entre secuencias y puede determinarse mediante la comparación de una posición en cada secuencia que puede alinearse para fines de comparación. Cuando una posición en la secuencia comparada está ocupada por la misma base de nucleótidos o aminoácido, entonces las moléculas son homólogas en esa posición. Un grado de homología entre secuencias es una función del número de posiciones coincidentes u homólogas compartidas por las secuencias.

25 El término "secuencias de ácidos nucleicos que tienen una homología de secuencia sustancial" significa aquellas secuencias de nucleótidos que tienen variaciones de secuencia ligeras o intrascendentes de las secuencias descritas en la sec. con núm. de ident.: 1 y sec. con núm. de ident.: 2, es decir, los ácidos nucleicos homólogos funcionan, sustancialmente, de la misma manera para producir, sustancialmente, los mismos polipéptidos como las secuencias existentes. Las variantes de empalme alternativas correspondientes a un ADNc de la invención se incluyen, además.

30 "Por ciento (%) de identidad de secuencia de aminoácidos" con respecto a las secuencias polipeptídicas de ISRAA identificadas en la presente descripción, se define como el porcentaje de residuos de aminoácidos en una secuencia candidato que son idénticos con los residuos de aminoácidos en la secuencia polipeptídica de ISRAA específica, después del alineamiento de secuencias e introducción de interrupciones, si fuese necesario, para lograr el por ciento máximo de identidad de secuencia, y sin considerar cualquiera de las sustituciones conservativas como parte de la identidad de secuencia. El alineamiento para fines de la determinación del por ciento de identidad de secuencia de aminoácidos puede lograrse de varias maneras que están dentro del conocimiento en la técnica, por ejemplo, mediante el uso de programas de ordenador disponibles públicamente tal como el programa BLAST, BLAST-2, ALIGN o Megalign (DNASTAR). Aquellos expertos en la técnica pueden determinar los parámetros adecuados para la medición del alineamiento, que incluyen cualquiera de los algoritmos necesarios para lograr el alineamiento máximo sobre la longitud completa de las secuencias que se comparan.

45 Los valores porcentuales de identidad de secuencia de aminoácidos pueden obtenerse, además, tal como se describe más abajo mediante el uso del programa de ordenador WU-BLAST-2 (Altschul y otros, Methods in Enzymology 266:460-480 (1996)). La mayor parte de los parámetros de búsqueda de WU-BLAST-2 se ajustan con los valores predeterminados. Los que no se ajustan a los valores predeterminados, es decir, los parámetros ajustables, se ajustan con los siguientes valores: intervalo de superposición=1, fracción de superposición=0,125, umbral de palabra (T)=11, y matriz de puntuación=BLOSUM62. Cuando se emplea WU-BLAST-2, un valor de % de identidad de secuencia de aminoácidos se determina mediante la división (a) del número de residuos de aminoácidos de apareamiento idéntico entre la secuencia de aminoácidos del polipéptido ISRAA de interés que tiene una secuencia derivada del polipéptido ISRAA nativo y la comparación de la secuencia de aminoácidos de interés (es decir, la secuencia contra la que se compara el polipéptido ISRAA de interés que puede ser un polipéptido variante de ISRAA) según se determina por WU-BLAST-2 por (b) el número total de residuos de aminoácidos del polipéptido ISRAA de interés. Por ejemplo, en la afirmación "un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos A que tiene al menos 80 % de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos B", la secuencia de aminoácidos A es la secuencia de aminoácidos de comparación de interés y la secuencia de aminoácidos B es la secuencia de aminoácidos del polipéptido ISRAA de interés.

60 El por ciento de identidad de secuencia de aminoácidos puede determinarse, además, mediante el uso del programa de comparación de secuencias NCBI-BLAST2 (Altschul y otros, Nucleic Acids Res. 25:3389-3402 (1997)). NCBI-BLAST2 usa varios parámetros de búsqueda, en donde todos esos parámetros de búsqueda se ajustan con los valores predeterminados que incluyen, por ejemplo, desenmascarar= sí, cadena= todas, ocurrencias esperadas= 10, longitud mínima de baja complejidad= 15/5, valor-e multipaso = 0,01, constante de multipaso= 25, desprendimiento del alineamiento final discontinuo = 25 y la matriz de puntuación = BLOSUM62

65 Se proporciona un ácido nucleico que se hibrida bajo condiciones de alta o baja rigurosidad, a un ácido nucleico que

tiene la totalidad o una porción de unas secuencias de ácido nucleico que se muestran en la sec. con núm. de ident.: 1 ó 2, o un ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 3.

5 "Rigurosidad" de las reacciones de hibridación es fácilmente determinable por un experto en la técnica, y generalmente es un cálculo empírico dependiente de la longitud de la sonda, temperatura de lavado y concentración de sales. En general, las sondas más largas requieren temperaturas más elevadas para una hibridación apropiada, mientras que sondas más cortas necesitan temperaturas más bajas. La hibridación depende generalmente de la capacidad del ADN desnaturalizado para rehibridarse cuando las cadenas complementarias están presentes en un entorno por debajo de su temperatura de fusión. Cuanto mayor sea el grado de homología deseada entre la sonda y la secuencia hibridable, mayor será la temperatura relativa que puede usarse. Como resultado, se deduce que temperaturas relativas más altas tenderían a hacer las condiciones de reacción más rigurosas, mientras que temperaturas más bajas menos. Para detalles adicionales y explicación de la rigurosidad de las reacciones de hibridación, ver Ausubel y otros, Current Protocols in Molecular Biology, Wiley Interscience Publishers, (1995).

15 Los ácidos nucleicos aislados que codifican el polipéptido de la invención, y que tienen una secuencia que difiere de una secuencia de nucleótidos que se muestra en la sec. con núm. de ident.: 1 ó 2 debido a la redundancia en el código genético, se proporcionan, además. Tales ácidos nucleicos codifican proteínas funcionalmente equivalentes (por ejemplo, una proteína inducida por la primera señal del sistema nervioso hacia el sistema inmune) pero difieren en la secuencia, a partir de la sec. con núm. de ident.: 1 ó 2 debido a la redundancia en el código genético. Redundancia significa que un número de aminoácidos se designan por más de un triplete. Además existirán polimorfismos de la secuencia de ADN que sí conducen a cambios en las secuencias de aminoácidos de una proteína ISRAA dentro de una población. Se proporcionan todas y cada una de tales variaciones de nucleótidos y polimorfismos de aminoácidos resultantes.

25 La presente invención se relaciona, además, con un ácido nucleico no codificante, o un fragmento de oligonucleótido de este, de un ácido nucleico de la invención. Un ácido nucleico no codificante puede comprender una secuencia de nucleótidos que es complementaria a una cadena codificante de un ácido nucleico, por ejemplo, complementaria a una secuencia de ARNm, construida de acuerdo con las reglas de apareamiento de bases de Watson y Crick, y puede enlazar hidrógeno a la cadena codificante del ácido nucleico. La secuencia no codificante complementaria a una secuencia de un ARNm puede ser complementaria a cualquier secuencia que se encuentra en la región codificante del ARNm o puede ser complementaria a una región no traducida 5' o 3' del ARNm. Además, un ácido nucleico no codificante puede ser complementario en secuencia a una región reguladora del gen que codifica el ARNm, por ejemplo una secuencia de iniciación o elemento regulador de la transcripción. Preferentemente, se usa un ácido nucleico no codificante complementario a una región que precede o abarca el codón de iniciación o en la región no traducida 3' de un ARNm. Un ácido nucleico no codificante puede diseñarse en base a las secuencias de nucleótidos que se muestran en la sec. con núm. de ident.: 1 o 2.

40 La presente invención proporciona vectores recombinantes que comprenden moléculas de ácido nucleico que codifican el polipéptido de la invención, como se describió en la presente descripción. Estos vectores recombinantes pueden ser plásmidos. En otras modalidades, estos vectores recombinantes son vectores de expresión procariotas o eucariotas. El ácido nucleico que codifica para los polipéptidos de la invención puede, además, estar unido operativamente a una secuencia de control reguladora.

45 Los ácidos nucleicos de la presente invención que codifican los polipéptidos de la invención pueden incorporarse en un vector de expresión recombinante mediante el uso de técnicas conocidas en la técnica, lo que asegura así una buena expresión de la proteína codificada o parte de esta. Los vectores de expresión recombinantes son "adecuados para la transformación de una célula huésped", lo que significa que los vectores de expresión recombinantes contienen un ácido nucleico o un fragmento de oligonucleótido de este de la invención, adicionalmente a una secuencia reguladora, seleccionada sobre la base de las células huésped que se usan para la expresión, que está operativamente unida al ácido nucleico o fragmento de oligonucleótido. Unida operativamente pretende denotar que el ácido nucleico está ligado a una secuencia reguladora de una manera que permite la expresión del ácido nucleico. Por lo tanto, un ácido nucleico está "operablemente unido" cuando se coloca en una relación funcional con otra secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, el ADN para una presecuencia o guía secretora está operablemente unido al ADN para un polipéptido si se expresa como un preproteína que participa en la secreción del polipéptido; un promotor o potenciador está operablemente unido a una secuencia codificante si afecta la transcripción de la secuencia; o un sitio de unión al ribosoma está operablemente unido a una secuencia codificante si se posiciona para facilitar la traducción. Generalmente, "operablemente unido" significa que las secuencias de ADN que se unen son contiguas, y, en el caso de un líder secretor, contiguo y en fase de lectura. Sin embargo, los potenciadores no tienen que ser contiguos. La unión se logra por ligación en los sitios de restricción convenientes. Si esos sitios no existen, se usan adaptadores sintéticos de oligonucleótidos o enlazadores de acuerdo con la práctica convencional. Las secuencias reguladoras se reconocen en la técnica y se seleccionan para dirigir la expresión de la proteína deseada en una célula huésped apropiada. Por consiguiente, el término de secuencia reguladora incluye promotores, potenciadores y otros elementos de control de la expresión. Tales secuencias reguladoras se conocen por los expertos en la técnica.

65 El término "secuencias de control" se refiere a las secuencias de ADN necesarias para la expresión de una secuencia codificante operablemente unida en un organismo huésped particular. Las secuencias de control que son adecuadas

para los organismos procariotas, por ejemplo, incluyen un promotor, opcionalmente una secuencia operadora, y un sitio de unión al ribosoma. Se conoce que las células eucariotas utilizan promotores, señales de poliadenilación, y potenciadores.

5 La expresión de estos vectores de expresión recombinantes se lleva a cabo en células procariotas o eucariotas mediante el uso de técnicas estándar de biología molecular.

10 Los vectores de expresión recombinantes de la invención pueden usarse para hacer una célula huésped transformante, que incluye el vector de expresión recombinante. El término "célula huésped transformante" pretende incluir células procarióticas y eucarióticas que se han transformado o transfectado con un vector de expresión recombinante de la invención. Los términos "transformadas con", "transfectadas con", "transformación" y "transfección" pretenden abarcar la introducción de ácido nucleico (por ejemplo, un vector) en una célula mediante una de las muchas técnicas posibles conocidas en la técnica. Las células procariotas pueden transformarse con ácido nucleico mediante, por ejemplo, electroporación o transformación mediada por cloruro de calcio. El ácido nucleico puede introducirse en células de mamíferos mediante técnicas convencionales tales como coprecipitación con fosfato de calcio o cloruro de calcio, transfección mediada por DEAE-dextrano, lipofectina, electroporación, microinyección o cualquier otra técnica conocida.

15 La presente invención proporciona, además, células huésped que comprenden un ácido nucleico que codifica para los polipéptidos de la invención. La invención proporciona, además, un método de preparación de la proteína ISRAA. El método comprende cultivar una célula huésped transformante que incluye un vector de expresión recombinante que comprende un ácido nucleico de la invención y una secuencia reguladora unida operativamente al ácido nucleico en un medio adecuado y después de eso, aislar la proteína.

20 Los ácidos nucleicos que codifican los polipéptidos de la invención pueden usarse para generar tanto animales transgénicos o animales "knock out" que, a su vez, pueden ser útiles en la comprensión aún más del mecanismo de acción de ISRAA. Un mamífero transgénico (por ejemplo, una rata o un ratón) es un mamífero que tiene células que contienen un transgén, que se introdujo en el mamífero o en un ancestro del mamífero en una fase prenatal, por ejemplo, una fase embrionaria. Un transgén es una molécula de ADN que está integrado en el genoma de una célula de la que se desarrolla un animal transgénico.

25 Las moléculas de ácido nucleico que codifican para proteínas ISRAA de mamíferos, tal como ISRAA de ratón, pueden estar contenidas dentro de vectores recombinantes tales como plásmidos, fagos, virus, transposones, cósmidos o cromosomas artificiales. Tales vectores pueden incluir, además, elementos reguladores que controlan la replicación y expresión de secuencias de ácidos nucleicos de ISRAA. Los vectores pueden, además, contener secuencias que permitan la detección o selección de células que contienen el vector. Tales secuencias de detección o de selección pueden incluir genes de resistencia a antibióticos. Los vectores recombinantes pueden ser vectores de expresión procariotas o vectores de expresión eucariotas. El ácido nucleico que codifica ISRAA puede unirse a un promotor heterólogo.

30 Una molécula de ácido nucleico es un "polinucleótido", que es un polímero monocatenario o bicatenario, de bases de desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos leídas desde el extremo 5' al extremo 3'. Los polinucleótidos incluyen ARN y ADN, y pueden aislarse de fuentes naturales, sintetizarse in vitro, o prepararse a partir de una combinación de moléculas naturales y sintéticas. Los tamaños de los polinucleótidos se expresan como pares de bases (abreviado "pb"), nucleótidos ("nt"), o kilobases ("kb"). Cuando el contexto lo permite, los dos últimos términos pueden describir polinucleótidos que son monocatenarios o bicatenarios. Cuando el término se aplica a moléculas bicatenarias, este se usa para denotar la longitud total y se entenderá que es equivalente al término "pares de bases". Se reconocerá por los expertos en la técnica que las dos cadenas de un polinucleótido bicatenario pueden diferir ligeramente en longitud y que los extremos de estas pueden biselarse como resultado de la escisión enzimática; por tanto, todos los nucleótidos dentro de una molécula bicatenaria de polinucleótidos pueden no estar apareados.

35 "Sondas y/o cebadores" como se usa en la presente descripción puede ser ARN o ADN. El ADN puede ser tanto ADNc como ADN genómico. Las sondas de polinucleótidos y cebadores son ADN monocatenario o bicatenario o ARN, generalmente oligonucleótidos sintéticos, pero pueden generarse a partir de secuencias de ADNc clonado o genómicas o sus complementarias. Las sondas analíticas serán generalmente de al menos 20 nucleótidos de longitud, aunque pueden usarse sondas algo más cortas (14-17 nucleótidos). Los cebadores de PCR son al menos de 5 nucleótidos de longitud, preferentemente 15 o más nt, con mayor preferencia 20 a 30 nt. Los polinucleótidos cortos pueden usarse cuando una pequeña región del gen se elige como objetivo para su análisis. Para el análisis burdo de genes, una sonda de polinucleótido puede comprender un exón entero o más. Las sondas pueden marcarse para proporcionar una señal detectable, tal como con una enzima, biotina, un radionúclido, fluoróforo, agente quimioluminiscente, partícula paramagnética y similares, que están disponibles comercialmente de muchas fuentes, tales como Molecular Probes, Inc., Eugene, OR, y Amersham Corp., Arlington Heights, IL, mediante el uso de técnicas que se conocen bien en la técnica.

40 La presente invención proporciona, además, un polipéptido aislado, designado en la presente descripción como ISRAA. En una modalidad preferida, la proteína tiene una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70 %, 75 %, 80 %, 85

%, 90 %, 95 % ó 99 % de homología o identidad con la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la sec. con núm. de ident.: 3.

5 Un "polipéptido" es un polímero de residuos de aminoácidos unidos por enlaces peptídicos, ya sea producidos naturalmente o sintéticamente. Los polipéptidos de menos de aproximadamente 10 residuos de aminoácidos se denominan comúnmente como "péptidos". Una "proteína" es una macromolécula que comprende una o más cadenas polipeptídicas. Una proteína puede comprender, además, componentes no peptídicos, tales como grupos de carbohidratos. Los carbohidratos y otros sustituyentes no peptídicos pueden añadirse a una proteína por la célula en la que se produce la proteína, y variarán con el tipo de célula. Las proteínas se definen en la presente descripción en 10 términos de sus estructuras de cadena principal de aminoácidos; sustituyentes tales como grupos carbohidrato generalmente no se especifican, pero, no obstante, pueden estar presentes.

15 Los aminoácidos esenciales en los polipéptidos de la presente invención pueden identificarse de acuerdo con procedimientos conocidos en la técnica, tales como mutagénesis dirigida al sitio o mutagénesis de barrido con alanina (Cunningham y Wells, Science 244: 1081-5, 1989 ; Bass y otros, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:4498-502, 1991). Natl. Acad. Sci. USA 88:4498-502, 1991). En la última técnica, las mutaciones individuales de alanina se introducen en cada residuo en la molécula, y las moléculas mutantes resultantes se prueban para la actividad biológica (por ejemplo, unión a ligando y la transducción de señales) como se describe más abajo para identificar los residuos de aminoácidos que son críticos para la actividad de la molécula. Ver además, Hilton y otros, J. Biol. Chem. 271:4699-4708, 1996. Los sitios 20 de ligando-receptor, proteína-proteína u otra interacción biológica pueden determinarse, además, por análisis físico de la estructura, como se determina por técnicas tales como resonancia magnética nuclear, cristalografía, difracción de electrones o marcaje de fotoafinidad, junto con mutación de aminoácidos de sitio de contacto putativo. Ver, por ejemplo, de Vos y otros, Science 255:306-312, 1992 ; Smith y otros, J. Mol. Biol. 224:899-904, 1992 ; Wlodaver y otros, FEBS Lett. 309:59-64, 1992. Las identidades de los aminoácidos esenciales pueden inferirse, además, de análisis de 25 homología con receptores relacionados.

30 La determinación de residuos de aminoácidos que están dentro de regiones o dominios que son críticos para el mantenimiento de la integridad estructural pueden determinarse. Dentro de estas regiones uno puede determinar los residuos específicos que serán más o menos tolerantes al cambio y mantendrán la estructura terciaria global de la molécula. Los métodos para el análisis de estructura de la secuencia incluyen, pero no se limitan a, alineamiento de múltiples secuencias con alta identidad de aminoácidos o nucleótidos y el análisis computarizado mediante el uso de programas de ordenador disponible (por ejemplo, el Insight II viewer y herramientas de modelación de homología; MSI, San Diego, CA), propensiones de estructura secundaria, patrones binarios, empaquetado complementario e interacciones polares ocultas (Barton, Current Opin. Struct. Biol. 5:372-376, 1995 ; y, Cordes y otros, Current Opin. Struct. Biol. 6:3-10, 1996). En general, al diseñar modificaciones a moléculas o identificar fragmentos específicos, la 35 determinación de la estructura estará acompañada por la evaluación de actividad de las moléculas modificadas.

40 La presente invención se relaciona, además, con un método para la preparación de polipéptidos aislados de acuerdo con la invención, cuyo método comprende cultivar una célula huésped transformante que incluye un vector de expresión recombinante en un medio adecuado hasta que se forma dicho polipéptido, y posteriormente aislar el polipéptido. Las etapas de un método de este tipo representan técnicas estándar de laboratorio.

45 Se proporcionan, además, las células huésped que comprenden un ácido nucleico que codifica para ISRAA de mamíferos. Se proporcionan, además, las células huésped que comprenden un ácido nucleico que está unido operativamente a la secuencia reguladora del vector de expresión recombinante para permitir la expresión de una molécula de ARN que es no codificante para el ácido nucleico aislado de sec. con núm. de ident.: 1 ó 2. Las células huésped pueden prepararse mediante transfección de un ácido nucleico apropiado en una célula mediante el uso de técnicas de transfección conocidas en la técnica. Estas técnicas incluyen coprecipitación con fosfato de calcio, microinyección, electroporación y transferencia génica mediada por liposomas. 50

55 La presente invención proporciona además un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno específico para un epítipo de una proteína de la invención. Los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno pueden ser policlonales o monoclonales. Tales anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno policlonales o monoclonales pueden acoplarse a una sustancia detectable. Los anticuerpos pueden incorporarse en composiciones adecuadas para la administración en un portador farmacéuticamente aceptable.

60 Las porciones inmunogénicas de la proteína de la invención pueden usarse para preparar anticuerpos específicos para las proteínas. Los anticuerpos pueden prepararse que se unan a un epítipo en una región de la proteína. El término anticuerpo pretende incluir, además, fragmentos que son específicamente reactivos con una proteína, o péptido de esta, de ISRAA. Los anticuerpos pueden fragmentarse con el uso de técnicas convencionales, por ejemplo, los fragmentos F(ab')₂ pueden generarse mediante tratamiento del anticuerpo con pepsina. El fragmento F(ab')₂ resultante puede tratarse para reducir los puentes disulfuro para producir fragmentos Fab'. Los anticuerpos policlonales son anticuerpos que se derivan de diferentes líneas de células B y son una mezcla de moléculas de inmunoglobulina secretadas contra un antígeno específico, cada uno que reconoce un epítipo diferente. Los anticuerpos monoclonales son anticuerpos 65 que son idénticos, ya que se produjeron por un solo tipo de células B y son todos clones de una sola célula madre. Las técnicas estándar se usan para producir anticuerpos policlonales. El procedimiento de rutina basado en la técnica de

hibridoma desarrollada originalmente por Kohler y Milstein (Nature 256,495497 (1975)) se usa para producir anticuerpos monoclonales.

Los "fragmentos de anticuerpos" comprenden una porción de un anticuerpo intacto, preferentemente la región de unión al antígeno o variable del anticuerpo intacto. Ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen los fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂, y Fv; diacuerpos; anticuerpos lineales (Zapata y otros, Protein Eng. 8(10):1057-1062); moléculas de anticuerpo de cadena simple; y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos.

La digestión con papaína de anticuerpos produce dos fragmentos idénticos de unión al antígeno, llamados fragmentos "Fab", cada uno con un solo sitio de unión al antígeno, y un fragmento residual "Fc", una designación que refleja la capacidad de cristalizar fácilmente. El tratamiento con pepsina produce un fragmento F(ab')₂ que tiene dos sitios de combinación al antígeno y todavía es capaz de reticular el antígeno.

"Fv" es el fragmento de anticuerpo mínimo que contiene un sitio completo de reconocimiento y unión al antígeno. Esta región consiste en un dímero de un dominio variable de una cadena pesada y de una cadena ligera en estrecha asociación no covalente. Es en esta configuración que las tres CDR de cada dominio variable interactúan para definir un sitio de unión al antígeno en la superficie del dímero VH-VL. Conjuntamente, las seis CDR confieren especificidad de unión al antígeno al anticuerpo. Sin embargo, incluso un único dominio variable (o la mitad de un Fv que comprende sólo tres CDR específicas para un antígeno) tiene la capacidad de reconocer y unirse al antígeno, aunque en una afinidad menor que el sitio de unión completo.

El fragmento Fab contiene, además, el dominio constante de la cadena ligera y el primer dominio constante (CH1) de la cadena pesada. Los fragmentos Fab difieren de los fragmentos Fab' por la adición de unos pocos residuos en el extremo carboxi terminal de la cadena pesada de dominio CH1 que incluyen una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo. Fab'-SH es la designación en la presente descripción para Fab' en el que el(los) residuo(s) de cisteína de los dominios constantes portan un grupo tiol libre. Los fragmentos de anticuerpos F(ab')₂ se produjeron originalmente como pares de fragmentos Fab' que tienen cisteínas en bisagra entre ellos. Se conocen otros acoplamientos químicos de fragmentos de anticuerpos.

Las "cadenas ligeras" de los anticuerpos (inmunoglobulinas) de cualquier especie de vertebrados pueden asignarse a uno o dos tipos claramente distintos, llamado kappa (κ) y lambda (λ), basado en las secuencias de aminoácidos de sus dominios constantes.

En dependencia de la secuencia de aminoácidos del dominio constante de sus cadenas pesadas, las inmunoglobulinas pueden asignarse a diferentes clases. Existen cinco clases principales de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG, e IgM, y diversas de estas pueden dividirse adicionalmente en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, e IgA2.

"Fv de una sola cadena" o fragmentos de anticuerpos "scFv" comprenden los dominios VH y VL del anticuerpo, en donde estos dominios están presentes en una sola cadena polipeptídica. Preferentemente, el polipéptido Fv comprende además un enlazador de polipéptido entre los dominios VH y VL que permite que el scFv forme la estructura deseada para la unión al antígeno. Para una revisión de scFv, ver Pluckthun en The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg y Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994).

Un anticuerpo "aislado" es uno que se ha identificado y separado y/o recuperado de un componente de su entorno natural. Los componentes contaminantes de su entorno natural son materiales que interferirían con los usos diagnósticos o terapéuticos para el anticuerpo, y pueden incluir enzimas, hormonas, y otros solutos proteicos o no proteicos. En modalidades preferidas, el anticuerpo se purificará (1) hasta más de 95 % en peso de anticuerpo según se determina por el método de Lowry, y con mayor preferencia más de 99 % en peso, (2) hasta un grado suficiente para obtener al menos 15 residuos de secuencia de aminoácidos N-terminal o interna mediante el uso de un secuenciador de copa giratoria, o (3) hasta homogeneidad mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras o no reductoras mediante el uso de azul de Coomassie o, preferentemente, tinción de plata. El anticuerpo aislado incluye el anticuerpo in situ dentro de células recombinantes ya que al menos un componente del entorno natural del anticuerpo no estará presente. Normalmente, sin embargo, el anticuerpo aislado se preparará mediante al menos una etapa de purificación.

La palabra "marcador" cuando se usa en la presente descripción, se refiere a un compuesto detectable o a la composición que se conjuga directa o indirectamente con el anticuerpo con el fin de generar un anticuerpo "marcado". El marcador puede detectarse por sí mismo (por ejemplo, los marcadores de radioisótopos o marcadores de fluorescencia) o, en el caso de un marcador enzimático, puede catalizar la modificación química de un compuesto o composición de sustrato que es detectable.

Los anticuerpos de la invención pueden comprender además anticuerpos humanizados o anticuerpos humanos. Las formas humanizadas de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) son inmunoglobulinas quiméricas, cadenas de inmunoglobulinas o fragmentos de estas (tales como Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ u otras subsecuencias de unión al antígeno de los anticuerpos) que contienen una secuencia mínima derivada de la inmunoglobulina no humana. Los anticuerpos humanizados incluyen inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que residuos de una región determinante de complementariedad (CDR) del receptor se sustituyen por residuos de una especie no humana (anticuerpo donante) tal como ratón, rata o conejo que tiene la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos ejemplos, los residuos de la región marco Fv de la inmunoglobulina humana se sustituyen por los residuos no humanos

5 correspondientes. Los anticuerpos humanizados pueden comprender además residuos que no se encuentran ni en el anticuerpo receptor ni en las secuencias CDR o marco importadas. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todo de al menos uno, y típicamente dos, dominios variables, en los cuales 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 consenso de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado óptimamente comprenderá además al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente la de una inmunoglobulina humana [Jones y otros, Nature, 321:522-525 (1986); Riechmann y otros, Nature, 332:323-329 (1988); y Presta, Curr. Op. Struct. Biol., 2:593-596 (1992)].

10 Los métodos para humanizar anticuerpos no humanos se conocen bien en la técnica. Generalmente, un anticuerpo humanizado tiene uno o más residuos de aminoácidos introducidos en él a partir de una fuente que no es humana. Estos residuos de aminoácidos no humanos se denominan frecuentemente como residuos "importados", que típicamente se obtienen a partir de un dominio variable "importado". La humanización puede realizarse esencialmente por medio del método de Winter y colaboradores [Jones y otros, Nature, 321:522-525 (1986); Riechmann y otros, Nature, 332:323-327 (1988); Verhoeyen y otros, Science, 239:1534-1536 (1988)], mediante la sustitución de las CDR de roedor o secuencias de la CDR por las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. Por consiguiente, tales anticuerpos "humanizados" son anticuerpos quiméricos (patente de Estados Unidos núm. 4,816,567), en donde sustancialmente menos de un dominio variable humano intacto se ha 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.

25 Los anticuerpos humanos pueden producirse además por medio del uso de varias técnicas conocidas en la técnica, que incluyen genotecas de presentación en fagos [Hoogenboom and Winter, J. Mol. Biol., 227:381 (1991); Marks y otros, J. Mol. Biol., 222:581 (1991)]. Las técnicas de Cole y otros y Boerner y otros están además disponibles para la preparación de anticuerpos monoclonales humanos (Cole et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, p. 77 (1985) y Boerner y otros, J. Immunol., 147(1):86-95 (1991)]. Del mismo modo, los anticuerpos humanos pueden hacerse mediante la introducción de loci de inmunoglobulina humana en animales transgénicos, por ejemplo, ratones en los que los genes endógenos de inmunoglobulinas se han inactivado parcial o completamente. Tras la exposición, se observa la producción de anticuerpos humanos, que se parecen mucho a los observados en los seres humanos en todos los aspectos, que incluyen el reordenamiento génico, ensamblaje y repertorio de anticuerpos. Este enfoque se describe, por ejemplo, en las patentes de Estados Unidos núms. 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 y otros, Bio/Technology 10, 779-783 (1992); Lonberg y otros, Nature 368 856-859 (1994); Morrison, Nature 368, 812-13 (1994); Fishwild y otros, Nature Biotechnology 14, 845-51 (1996); Neuberger, Nature Biotechnology 14, 826 (1996); Lonberg y Huszar, Intern. Rev. Immunol. 13 65-93 (1995).

35 Una composición farmacéutica adecuada para la administración que comprende un anticuerpo policlonal o un anticuerpo monoclonal está, además, dentro del alcance de la invención. Una composición de anticuerpo puede administrarse a un sujeto en un portador o diluyente apropiados, coadministrado con inhibidores enzimáticos o en un portador apropiado tal como liposomas. El término "portador farmacéuticamente aceptable" como se usa en la presente descripción pretende incluir diluyentes tales como solución salina y soluciones tampón acuosas.

40 La presente invención proporciona, además, un método para la estimulación de la respuesta inmune innata *in vitro* en células inmunodeprimidas y un método para la inhibición de la respuesta inmune innata *in vitro* en ciertas células. Se proporcionan, además, kits terapéuticos para la realización de tales métodos.

50 Por lo tanto, en un aspecto adicional la invención proporciona un método para la estimulación de la respuesta inmune innata *in vitro* en las células inmunodeprimidas que comprende poner en contacto las células con un polipéptido purificado de acuerdo con la invención.

55 En una modalidad adicional, la invención comprende un método para la estimulación de la respuesta inmune innata *in vitro* en células inmunodeprimidas que comprende la transfección de las células con una molécula de ácido nucleico aislada de acuerdo con la invención, mediante el uso de un vector de expresión recombinante como se describe en la presente descripción.

60 Se proporciona, además, por la presente invención un método de identificación de compuestos o agentes que inhiben o estimulan la actividad o expresión del polipéptido de acuerdo con la invención y que el método comprende poner en contacto *in vitro* una célula que expresa dicho polipéptido con un compuesto candidato o agente y establecer si en respuesta a un reto inmune, el compuesto o agente inhibe o potencia la respuesta inmune en comparación con una célula que no se ha puesto en contacto con dicho compuesto.

65 La presente invención proporciona además composiciones farmacéuticas adecuadas para la administración que comprende tales compuestos o agentes discutidos en la presente descripción, junto con un portador farmacéuticamente aceptable.

La presente invención proporciona, además, mamíferos transgénicos no humanos que contienen las células

5 transfectadas con un ácido nucleico de acuerdo con la sec. con núm. de ident.: 1 o 2. Se proporcionan mamíferos transgénicos no humanos que contienen células que tienen un gen que normalmente comprende una secuencia de nucleótidos que tiene homología de secuencia sustancial con el ácido nucleico de sec. con núm. de ident.: 1 ó 2, en donde dicho gen se ha alterado mediante recombinación homóloga de tal forma que el animal no puede expresar la proteína ISRAA funcional.

10 Se proporcionan los mamíferos transgénicos no humanos que contienen células transfectadas con un ácido nucleico en donde el ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos o secuencia de nucleótidos complementaria de esta que es capaz de hibridar al menos bajo condiciones de baja rigurosidad con el ácido nucleico aislado de sec. con núm. de ident.: 1 ó 2 o su secuencia de nucleótidos complementaria.

Se proporcionan mamíferos transgénicos no humanos en donde uno o ambos alelos del gen endógeno *israa* se han mutados. El mamífero transgénico no humano puede ser una rata o un ratón o cualquier mamífero adecuado.

15 La presente invención abarca, además, métodos para la modulación de las respuestas del sistema inmune. En particular, la presente invención incluye un método para la estimulación de la respuesta inmune innata *in vitro* en células inmunodeprimidas mediante el uso de los ácidos nucleicos o polipéptidos de la invención. Tal método puede comprender poner en contacto células con polipéptidos purificados de la invención y/o transfectar células con ácidos nucleicos aislados de acuerdo con la invención.

20 La presente invención proporciona, además, un método para la inhibición de la respuesta inmune innata en las células *in vitro* mediante la inhibición de la expresión o actividad de ISRAA. Un método tal de inhibición de la expresión o actividad de ISRAA puede comprender poner en contacto células con una molécula que se une a un polipéptido de acuerdo con la presente invención. Preferentemente, esta molécula puede ser lo mismo un anticuerpo policlonal o un anticuerpo monoclonal. Un método tal de inhibición de la expresión o actividad de ISRAA puede además comprender la introducción en las células de una molécula de ácido nucleico aislado u oligonucleótido capaz de hibridarse a una secuencia genética que codifica dicho ISRAA. Esta molécula de ácido nucleico aislado u oligonucleótido puede ser ARN, y puede ser complementaria a la cadena codificante de una secuencia genética que codifica dicho ISRAA. Tal molécula de ácido nucleico aislado u oligonucleótido puede ser complementaria en la secuencia a la siguiente; una región reguladora del gen que codifica ISRAA, una región de iniciación de la transcripción de un gen que codifica ISRAA, una región 5' o 3' no traducida de un gen que codifica ISRAA, o el codón de iniciación de la traducción de un gen que codifica ISRAA.

35 Una amplia variedad de agentes de ensayo puede ensayarse en los métodos de selección de la presente invención. Por ejemplo, compuestos de moléculas pequeñas, conocidas en la técnica, productos químicos, ácidos nucleicos, péptidos y proteínas tales como hormonas, anticuerpos, y porciones de estos, pueden actuar como agentes de prueba. En un ejemplo no limitante, la estructura tridimensional del sitio activo de ISRAA puede determinarse mediante cristalización del complejo formado por la proteína y un inhibidor conocido. El diseño racional de fármacos puede usarse entonces para identificar nuevos agentes de prueba al hacer alteraciones en la estructura de un inhibidor conocido o mediante el diseño de compuestos de pequeñas moléculas que se unen al sitio activo de la proteína.

40 En otra modalidad, la interferencia de ARN puede usarse como un inhibidor de ISRAA. La interferencia de ARN se relaciona con el silenciamiento génico postranscripcional específico de secuencia, provocado por ARN bicatenario que es homólogo a la diana de genes silenciados. Métodos para la inhibición de la producción de una proteína que utiliza pequeños ARN de interferencia son bien conocidos en la técnica, y se describen en, por ejemplo, las solicitudes de patente Internacional núms. WO01/75164 ; WO00/63364; WO01/92513 ; WO00/44895 ; y WO99/32619.

50 Los agentes pueden administrarse por una amplia variedad de rutas. Las rutas ilustrativas de administración incluyen la administración oral, parenteral, transdérmica, y pulmonar. Por ejemplo, los agentes pueden administrarse por vía intranasal, intramuscular, subcutánea, intraperitoneal, intravaginal y cualquier combinación de estas. Para la administración pulmonar pueden usarse nebulizadores, inhaladores o dosificadores de aerosoles para suministrar el agente terapéutico en una formulación apropiada (es decir, con un agente aerolizante). Adicionalmente, los agentes pueden administrarse solos o en combinación con otros agentes o fármacos conocidos. En combinación, los agentes pueden administrarse simultáneamente o cada agente puede administrarse en momentos diferentes. Cuando se combina con uno o más fármacos conocidos, los agentes y fármacos pueden administrarse simultáneamente o el agente puede administrarse antes o después del (de los) fármaco(s).

60 En una modalidad, los agentes se administran en un portador farmacéuticamente aceptable. Cualquier portador adecuado conocido en la técnica puede usarse. Se prefieren los portadores que solubilizan eficazmente los agentes. Los portadores incluyen, pero no se limitan a un sólido, líquido o una mezcla de un sólido y un líquido. Los portadores pueden tener la forma de cápsulas, comprimidos, píldoras, polvos, pastillas, suspensiones, emulsiones o jarabes. Los portadores pueden incluir sustancias que actúan como agentes saborizantes, lubricantes, solubilizantes, agentes de suspensión, aglutinantes, estabilizantes, agentes de disgregación de comprimidos y material de encapsulación.

65 Los comprimidos para la administración oral sistémica pueden incluir excipientes, como se conoce en la técnica, tales como carbonato de calcio, carbonato de sodio, azúcares (por ejemplo, lactosa, sacarosa, manitol, sorbitol), celulosas

(por ejemplo, metil celulosa, carboximetil celulosa de sodio), gomas (por ejemplo, arábica, goma de tragacanto), junto con agentes disgregantes, tales como maíz, almidón o ácido algínico, agentes aglutinantes, tales como gelatina, colágeno o acacia y agentes lubricantes, tales como estearato de magnesio, ácido esteárico o talco.

5 En polvos, el portador puede ser un sólido finamente dividido, que se mezcla con una cantidad efectiva de un agente finamente dividido. En soluciones, suspensiones o jarabes, una cantidad efectiva del agente puede disolverse o suspenderse en un portador tal como agua estéril o un disolvente orgánico, tal como propilenglicol acuoso. Otras composiciones pueden hacerse mediante dispersión del inhibidor en una solución acuosa de almidón o carboximetil celulosa de sodio o un aceite adecuado conocido en la técnica.

10 Un estuche terapéutico se incluye dentro del alcance de la presente invención para la realización de tales métodos para modular las respuestas del sistema inmune. Preferentemente, estos estuches incluyen medios para la adición a las células de las moléculas o agentes descritos anteriormente.

15 La presente invención se describirá adicionalmente con referencia a los siguientes ejemplos que ilustran las modalidades de la invención con referencia adicional a los siguientes dibujos.

20 La Figura 1 es una representación gráfica que ilustra la acción de ISRAA en células no tratadas a las que se ha añadido los sobrenadantes de esplenocitos de ratas inoculadas con tripanosoma y los efectos de la desnervación esplénica en la inducción de ISRAA. (A) Sobrenadantes de esplenocitos de ratas inoculadas con *T.b.brucei* durante menos de un minuto y células no tratadas estimuladas significativamente se cultivaron durante 48h para producir IFN- γ ($p < 0,0001$) como se detecta mediante el ensayo ELISPOT. Nota: inhibición significativa de la actividad del sobrenadante por denervación esplénica ($p < 0,0001$). Con-A se usó como control +ve. Las barras indican la media \pm SD ($n=9$). Los experimentos se repitieron 6 veces con resultados similares. (B) Sobrenadantes de esplenocitos de ratas inoculadas con *T.b.brucei* durante menos de un minuto y células no tratadas estimuladas significativamente se cultivaron durante 48h para proliferar ($p < 0,0001$) como se detecta mediante el ensayo de proliferación celular. La captación de ^3H -timidina se expresó en cuentas por minuto (CPM) y fue altamente significativa en las ratas inoculadas con *T.b.brucei* sin desnervación en comparación con las ratas inoculadas con PBS sin desnervación ($p < 0,0001$). Las ratas operadas con simulación demostraron alta respuesta proliferativa sin desnervación. Nota: inhibición significativa de la actividad del sobrenadante por denervación esplénica ($p < 0,0001$). Con-A se usó como control +ve. Las barras indican la media \pm SD ($n=9$). Los experimentos se repitieron 6 veces con resultados similares.

35 La Figura 2A es una ilustración de los resultados de una FDD usada para clonar más aún el gen para ISRAA. La hoja de FDD muestra los resultados de la selección exhaustiva de la FDD automatizada mediante el uso del Sistema de Electroforesis con FDD Horizontal. El análisis de las bandas de ADNc y BDD y la confirmación de los genes expresados diferencialmente reveló el descubrimiento de un nuevo gen que se expresa diferencialmente en esplenocitos obtenidos en menos de un minuto de ratones inoculados por vía subcutánea con *T.b.brucei*, pero no en ratones de control inoculados con PBS (banda 4CC).

40 La Figura 2B ilustra la secuencia original de la banda de la 4CC a partir de la FDD. Las búsquedas en GenBank no identificaron similitudes en la secuencia de nucleótidos.

45 La Figura 3A es la nueva secuencia del gen *israa* de la presente invención. Para obtener la secuencia de longitud completa del ADNc para ISRAA, el ARNm de longitud completa se clonó en un vector de expresión de mamífero y la genoteca se seleccionó mediante cebadores específicos construidos a partir de la secuencia original de la FDD de la banda de 4CC mostrada en la Figura 2B. La figura demuestra la secuencia de longitud completa del ADNc que mostró el residuo 2093 de la secuencia de partida "CCCCAGTTA". Una búsqueda en GenBank no reveló ninguna homología significativa. Se realizó la expresión de proteínas y se purificó, caracterizó, y analizó ISRAA para las actividades biológicas (ver más abajo).

50 La Figura 3B es el marco de lectura abierto de la secuencia para el nuevo gen (ORF marcado con His) de la invención.

La Figura 3C es la secuencia de aminoácidos del marco de lectura abierto para el nuevo gen de la invención.

55 La Figura 4A es una representación gráfica que ilustra las acciones de rISRAA clonado y los sobrenadantes de esplenocitos de ratas inoculadas con tripanosoma en células no tratadas junto con los efectos de bloqueo del anticuerpo anti-ISRAA en la actividad. (A) rISRAA y sobrenadantes de esplenocitos de ratas inoculadas con *T.b.brucei* durante menos de un minuto y las células no tratadas estimuladas significativamente se cultivaron durante 48h para producir IFN- γ ($p < 0,0001$) como se detecta mediante el ensayo ELISPOT. Nota: inhibición significativa de rISRAA y las actividades del sobrenadante mediante preincubación de las células con anticuerpo policlonal anti-ISRAA ($p < 0,001$). Con-A se usó como control +ve. Las barras indican la media \pm SD ($n=9$). Los experimentos se repitieron 6 veces con resultados similares.

65 La Figura 4B ilustra el reconocimiento de rISRAA e ISRAA nativo en los sobrenadantes de esplenocitos de ratas inoculadas con tripanosoma, por el anticuerpo anti-rISRAA como se detectó por transferencia Western. Electroforesis con SDS y transferencia Western mediante el uso de un anticuerpo policlonal de conejo anti-rISRAA.

(A) rISRAA

(B) sobrenadante de esplenocitos de ratas inoculadas con tripanosoma recogido de células cultivadas 48h

(C) Control (sobrenadante recogido de esplenocitos cultivados 48h preparados de ratas inoculadas con PBS por vía subcutánea).

5 Nota bandas de ~15 kD en (A) y (B).

10 La Figura 5A es una representación gráfica que ilustra el papel de ISRAA en la modulación de la enfermedad de inmunosupresión. Este gráfico demuestra efectos de ISRAA en esplenocitos inmunodeprimidos. Las células obtenidas a partir de ratas sin desnervación 3 semanas después de la infección fracasaron en la proliferación después de la estimulación mediante con-A. ISRAA se añadió tanto solo como con esplenocitos estimulados mediante con-A obtenidos en la semana 3 después de la infección. Se registraron las respuestas proliferativas significativas (*= $p < 0,01$, ***= $p < 0,0001$). IL-2 se incubó de manera similar en los pocillos de control, pero se observó aumento de la proliferación. Los datos representan grupos de dos experimentos (se muestra la media \pm desviación estándar).

15 La Figura 5B ilustra los tipos de células que producen ISRAA. En estos experimentos, los ratones se inocularon por vía subcutánea durante menos de un minuto con *T.b.brucei*. Los esplenocitos se aislaron y enriquecieron para obtener poblaciones purificadas de (A) CD4+, (B) CD8+, (C) células B y (D) monocitos/macrófagos. Con el uso de inmunohistoquímica todas las células purificadas mostraron capacidad de producir ISRAA. (E) representa los experimentos de control (esplenocitos de ratones no inoculados).

20 La Figura 5C ilustra los tipos de células que responden a ISRAA. Los esplenocitos de ratón se estimularon por rISRAA y después de eso se purificaron CD4+ (A), CD8+(B), células B (C) y los monocitos/macrófagos (D) y se ensayaron para la producción de IFN- γ por inmunohistoquímica. Nota: Todos los tipos de células se tiñeron positivamente para IFN- γ en respuesta a la estimulación de ISRAA. (E) representa las células no estimuladas.

25 Los resultados obtenidos proporcionan la base para el potencial terapéutico de la nueva proteína ISRAA codificada por el nuevo gen *israa*. Los experimentos se llevaron a cabo para lograr estos resultados se resumen en los siguientes párrafos.

30 El presente trabajo se relaciona con un nuevo mediador del sistema inmune que se ha encontrado que media la transmisión de señales entre el sistema inmune y el sistema nervioso después de un reto inmune. Los sobrenadantes de esplenocitos cultivados 48h preparados a partir de bazo de ratas inoculadas con tripanosoma por vía subcutánea obtenidos directamente después de la inoculación y se añadieron a células no tratadas, mostraron una mayor producción de IFN- γ y proliferación celular, una acción que fue bloqueada significativamente por la denervación quirúrgica del bazo. Para identificar los genes expresados diferencialmente en este proceso se usó la técnica de visualización diferencial fluorescente. Se identificó y secuenció un nuevo gen en esplenocitos de ratón. El ARNm de longitud completa se clonó en un vector de expresión de mamífero y la genoteca se seleccionó mediante cebadores específicos y la secuencia de longitud completa de un nuevo gen se obtuvo y se encontró que se localiza en el cromosoma 14. La expresión de proteínas se realizó y se purificó la proteína recombinante. El análisis de transferencia Western mediante el uso del anticuerpo policlonal de conejo contra la proteína, mostró la banda de masa molecular ~15 kD. La proteína recombinante mostró actividades biológicas similares a las de los sobrenadantes de cultivo. Además, la proteína fue capaz de reactivar las células experimentalmente inmunodeprimidas mediante la recuperación de su capacidad de proliferar. Por lo tanto, se demostró secreción simpática que se dirige al bazo en respuesta a un estímulo de Tripanosoma, lo que conduce a la generación de un nuevo agente de activación liberado por el sistema inmune (ISRAA) en pocos segundos después de la exposición parasitaria.

35 La tripanosomiasis africana, una enfermedad de África tropical que afecta principalmente el CNS y se caracteriza por profunda inducción de citoquinas tales como IFN- γ de forma temprana durante las infecciones (Olsson y otros 1991, Olsson y otros 1993, Vaidya y otros 1997) y la inmunosupresión tardía (Askonas 1984, Wei G, Tabel H 2008), se usó en este estudio como un modelo para demostrar las interacciones críticas entre el CNS y el sistema inmune. En pocos segundos después de la exposición parasitaria en la EAT, se describió una expresión dramática de un nuevo gen en el bazo, junto con la regulación positiva de su proteína de codificación (agente de activación liberado por el sistema inmune; ISRAA). El sistema nervioso autónomo está críticamente involucrado en este proceso.

55 Materiales y Métodos

Animales, cepa de parásitos y procedimiento de infección

60 Se usaron ratas Sprague-Dawley (Alab, Estocolmo) de 2 meses de edad y aproximadamente 200 g de peso. El AnTat 1.1E tipo antígeno variable de la cepa de *Trypanosoma brucei brucei* (*T.b.brucei*) aislado del antílope africano se obtuvo de Dr. Nestor van Meirvenne, Laboratorio de Serología - Instituto de Medicina Tropical Prins Leopold - Amberes - Bélgica. Cada rata (desnervada o no desnervada simulada) se inyectó por vía subcutánea con 0,1 ml de una suspensión de tripanosomas en un amortiguador fosfato salino/glucosa, pH 8,0, que contenía aproximadamente 10^6 parásitos por ml. La aprobación ética se obtuvo del Comité de Estocolmo para la Ética Animal - Suecia. Todos los experimentos se realizaron de acuerdo con directrices y regulaciones relevantes. Para clonar el gen de ISRAA y analizar su producto génico (ISRAA recombinante; ISRAAr), se usó la cepa de ratones Balb/c con 2 meses de edad y aproximadamente 25 g

de peso (suministrada por el Centro de Reproducción Animal en la Facultad de Medicina de la Universidad de Golfo Pérsico - Reino de Bahrein). Los animales se alojaron 4 por jaula, se les dio alimento y agua ad libitum, y se mantuvieron en un ciclo de 12/12-h de luz/oscuridad hasta el sacrificio.

5 Simpatectomía y simulación quirúrgica

Las ratas se pesaron antes de la cirugía. Bajo anestesia con pentobarbital sódico (50 mg/kg), se afeitó el pelaje en la zona de operación y la piel se esterilizó con alcohol al 70 %. Se realizó una incisión larga de cinco mm a través de la piel y las capas de los músculos para exponer la cavidad abdominal. Se cortó el ligamento gastroesplénico. El nervio esplénico se aisló de la vasculatura esplénica y del tejido conectivo cerca de la bifurcación de la arteria celiaca, y después se cortó todo el manojito de nervios. Inmediatamente después de la cirugía, cada animal recibió una inyección intraperitoneal de sulfadimetóxido (100 mg/rata) y después se regresaron a la colonia. La desnervación exitosa se confirmó mediante estudios histológicos al final del estudio. Las ratas controles simuladas se manipularon de forma similar, pero sin la simpatectomía. A los animales se les dejó recuperarse de la cirugía durante 5 días, y una semana más tarde se inocularon con el parásito.

Preparación de los esplenocitos

Se inyectaron 10^5 parásitos por vía subcutánea en ratas (i) no desnervadas (ii) desnervadas (iii) simuladas (3 por grupo). Además, se usaron ratas no desnervadas inoculadas con PBS como control negativo (no estimuladas). Inmediatamente después de la inyección, los bazoos se diseccionaron y los esplenocitos se prepararon mediante el paso forzado de los bazoos a través de una malla de acero inoxidable. Las células sueltas se lavaron una vez en Medio MOD Eagle de Dulbecco (Life Technology) complementado con L-glutamina (Flow) 2 mM, 50 IU de penicilina (Astra, Södertälje, Suecia), MEM (Flow) al 1 % (v/v) y FCS al 5 % (v/v) (Gibco, Paisley, Escocia). Los eritrocitos en los sedimentos celulares se hemolizaron mediante la adición de 2 ml de agua fría durante 30 segundos mediante la adición de 1 ml de solución salina al 2,7 %. Las células se lavaron dos veces en el medio de lavado y se volvieron a diluir para obtener una concentración de 5×10^6 ml. Se aplicaron alícuotas de 200 μ l a pocillos individuales de una placa de microtitulación. No se observaron cambios en la viabilidad de las células obtenidas a partir de ratas desnervadas y no desnervadas. Los esplenocitos a partir de animales que se inocularon con parásitos se cultivaron durante 48 horas y a partir de entonces se recolectaron y se añadieron a esplenocitos vírgenes y se analizaron para su capacidad de inducir a las células vírgenes a producir IFN- γ y a proliferar. El periodo de incubación de 48 h se seleccionó después de realizar el estudio cinético para evaluar la mejor actividad en el ensayo de tamizaje.

Enriquecimiento celular

Para obtener preparaciones celulares purificadas de células T CD4⁺ y CD8⁺, células B y monocitos/macrófago se prepararon las suspensiones de esplenocitos de ratón como anteriormente. Las poblaciones celulares purificadas de células T CD4⁺, CD8⁺, células B y monocitos/macrófagos se prepararon mediante el uso de perlas magnéticas (Dynabeads) recubiertas con anticuerpos monoclonales (mAb) anti-CD4, anti-CD8, anti-IgG de ratón y anti-PAN de ratón, respectivamente, siguiendo las instrucciones del fabricante (Dyna, Noruega). Las preparaciones celulares purificadas se analizaron con mAb fluorescentes mediante Citometría de flujo (Mix y otros 1990).

Ensayo de células individuales para la producción de IFN- γ

Para evaluar la actividad en sobrenadantes cultivados y finalmente de ISRAAr, se usó el ensayo de puntos por inmunoabsorción unido a enzimas (ELISPOT) para detectar la producción de IFN- γ por células secretoras individuales (Mustafa y otros 1991). En principio, las placas de microtitulación de 96 pocillos de fondo de nitrocelulosa (Millipore, Bedford - MA) se recubrieron toda la noche con alícuotas de 100 μ l del anticuerpo monoclonal (mAb) DB1, que es específico para IFN- γ , a una concentración de 5 μ g/ml (Van der Meide y otros 1986). Después de lavados repetidos con PBS, se aplicó albúmina sérica humana al 2 % durante 2-4 h, las placas se lavaron en PBS, y las suspensiones de esplenocitos se aplicaron seguido por la estimulación con sobrenadantes de cultivo de esplenocitos obtenidos a partir de ratas desnervadas y no desnervadas inoculadas con *T.b.brucei* o 5 μ g de ISRAAr. Algunas células control se estimularon con con-A, o se mantuvieron sin estimulación. Después de la incubación toda la noche a 37 °C en una atmósfera húmeda de CO₂ al 7 %, las células se eliminaron sacudiendo la placa, seguido por lavados repetidos en PBS. Se aplicó anticuerpo policlonal de conejo anti-IFN- γ de rata (Van der Meide y otros 1986), diluido 1/1000, durante 4 h. Después del lavado, se aplicó anticuerpo de carnero anti-IgG de conejo biotinilado (Vector Lab, Burlingame, CA) durante 4 h seguido por el complejo avidina-biotina-peroxidasa (ABC Vectastain Elite Kit, Vector Lab). El desarrollo de color se realizó con 3-amino-9-etilcarbazol y H₂O₂. Los puntos que corresponden a células que secretaron IFN- γ se contaron mediante el uso de un microscopio de disección.

Ensayo de incorporación de ³H-Timidina

Se aplicaron 200 μ l de suspensión de esplenocitos (5×10^6 /ml de medio) a cada pocillo de una placa de microtitulación de 96 pocillos de poliestireno de fondo redondo (Nunc, Roskilde, Dinamarca). Seis pocillos recibieron ya sea sobrenadantes de cultivo de esplenocitos obtenidos a partir de ratas desnervadas y no desnervadas inoculadas con *T.b.brucei*, o con-A a una concentración final de 5 μ g/ml o agente no estimulante. En determinados experimentos (ver

más abajo) se añadieron 5 µg de ISRAAr o IL-2r ya sea solos o junto con con-A a esplenocitos obtenidos en momentos tardíos durante la infección. Las células se incubaron durante 72h. Diez horas antes se añadieron alícuotas de 10 µl cosechadas que contenían 1 µCi de [³H]-metiltimidina (actividad específica 42 Ci/mmol) (Amersham, Little Chalfont, UK) en solución salina a cada pocillo. Las células se cosecharon en filtros de fibras de vidrio con un dispositivo de cosecha semiautomático de múltiples canales (Titertek, Skatron AS, Lierbyen, Noruega) y la incorporación de timidina se midió como recuentos por minuto (CPM) en un contador de centelleo líquido para beta (Mark II, Searle Analytic, Des Plaines, IL, Estados Unidos).

Ensayo de Visualización Diferencial de Fluorescencia (FDD)

Para aislar el gen de ISRAA se usó el ensayo de FDD (Liang, P. y A.B. Pardee 1992). Brevemente, se extrajo el ARN celular total a partir de cultivos de esplenocitos de dos grupos de animales (infectados experimentalmente durante pocos segundos, y controles inoculados con PBS no infectados) mediante el uso de Reactivo RNAPure™ (GenHunter Corporation, Nashville, TN) de acuerdo con el fabricante. Se usó el Estuche Message Clean® (GenHunter Corporation, Nashville, TN) para eliminar posibles trazas remanentes de contaminantes del ADN genómico. La Visualización Diferencial se realizó como se describe en las instrucciones del estuche RNAspectra™ Green (Sistema de Visualización Diferencial Fluorescente de ARNm-GenHunter® Corporation, Nashville, TN). Las primeras cadenas de ADNc (20 µl) se sintetizaron para cada muestra de ARN de forma separada mediante el uso de uno de los tres cebadores H-T₁₁M diferentes anclados en una base (Donde M puede ser G, A o C). 200 ng de ARN celular total, 4 µl de amortiguador 5X RT, 1.6 µl de 4dNTP (250 µM) y 2 µl de cebador T₁₁M (10 pmol/µl) con H₂O hasta 19 µl. Los tubos de reacción se incubaron durante 5 minutos a 65 °C y durante 10 minutos a 37 °C. Después, se añadió 1 µl de MMLV transcriptasa inversa (200U/µl) a todos los tubos de reacción y la incubación se continuó durante 50 minutos a 37 °C. MMLV RT se inactivó mediante la incubación durante 5 minutos a 95 °C. Por cada 20 µl de reacciones de PCR, se mezclaron 9,2 µl de H₂O con 2 µl de amortiguador de PCR 10X, 1,6 µl de mezcla de 4dNTP (25 µM), 2 µl de cebador arbitrario (Cebador H-AP 2 µM), 2 µl de cebador FH-T₁₁M (M puede ser G, A o C), 2 µl de ADNc y 0,2 µl de Taq ADN polimerasa (5U/µl) (Qiagen). El perfil de ciclos de PCR fue 40 ciclos (94 °C, 30 segundos) (40 °C, 2min.) (72 °C, 60 segundos), 1 ciclo (72 °C, 5 min). Las muestras se mantuvieron en la oscuridad después de la reacción por PCR.

Los productos de FDDRT-PCR desnaturalizados se colocaron en un gel de poliacrilamida desnaturalizante al 6 % para la secuenciación del ADN (Urea 7 M, TBE 1X). Se mezcló 3,5 µl de cada muestra con 2 µl de colorante de carga de FDD y se incubó a 80 °C durante dos min y se pasaron por electroforesis durante 2-3 horas a una electricidad constante de 60 watts. Se escaneó el gel en un Fluorescence Imager (Hitachi FMBIO® II) con filtro de 505 nm siguiendo las instrucciones del fabricante. Se escindieron las bandas de interés con una cuchilla limpia, se remojaron en 100 µl de H₂O durante 10 min a temperatura ambiente (RT) en un tubo de microcentrífuga, después se hirvieron durante 10 minutos. Los tubos se centrifugaron y los sobrenadantes que contenían el ADN se transfirieron a tubos limpios y se precipitaron con 10 µl de NaAcetato 3M, 5 µl de glucógeno (10 mg/ml), 400 µl de etanol al 100 % mediante incubación a -70 °C durante al menos 30 minutos. Los tubos se centrifugaron durante 10 minutos a 4 °C para sedimentar el ADN que después se lavó con EtOH al 85 % y el sedimento se redisolvió en 10 µl de H₂O.

La reamplificación se realizó mediante el uso de la misma combinación de cebadores y las condiciones de PCR descritas antes excepto que se usó el cebador anclado H-T₁₁M no marcado en vez de FH-T₁₁M marcado con fluoresceína. Se preparó 40 µl de mezcla de reacción mediante la mezcla de 23,3 µl de H₂O, 4 µl de amortiguador de PCR 10X, 0,3 µl de mezcla de dNTP, 4 µl de cebador H-AP (2 µM), 4 µl de H-T₁₁M, 4 µl del ADNc aislado y 0,4 µl de Taq ADN polimerasa (Qiagen). Se corrieron 30 µl de las muestras de PCR en un gel de agarosa al 1,5 % y se tiñeron con bromuro de etidio. El tamaño de los productos reamplificados se verificó contra su tamaño en el gel original de secuenciación de ADN. Se usó el fragmento de PCR aislado directamente para la secuenciación de ciclos, la subclonación o como sonda para transferencias de northern. Las bandas reamplificadas se clonaron en el Sistema de Clonación PCR-TRAP (GenHunter® Corporation, Nashville, TN). Las colonias de cada banda se verificaron para los insertos mediante PCR de colonias. La secuenciación de ADN se realizó en un Applied Biosystems (ABI-3100). Las secuencias se compararon con la base de datos de secuencias no redundantes del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI) mediante el uso de los programas BLASTX y BLASTN.

Confirmación de la expresión génica de ISRAA aislado por FDD

Se usó el método de Visualización Diferencial Binaria (BDD) para confirmar la expresión del gen expresado de ISRAA aislado por FDD de acuerdo con los protocolos de GenHunter Corporation, Nashville, TN, Estados Unidos). Las mismas muestras de ARN del tamizaje por FDD del gen objetivo de ISRAA se analizaron mediante BDD.

Clonación del gen de ISRAA en toda su extensión y expresión y purificación de proteínas

Los protocolos de QIAexpressionist™ se usaron para la clonación del gen de ISRAA en toda su extensión y para un alto nivel de expresión y purificación de la proteína etiquetada con 6xHis de acuerdo con las instrucciones del fabricante (QIAGEN Inc. Stanford, Valencia, CA, Estados Unidos). En resumen, el gen de ISRAA en toda su extensión se obtuvo mediante la clonación del ARNm en toda su extensión en un vector de expresión en mamífero seguido por el tamizaje de la genoteca. La subclonación del primer ORF en el vector de expresión en bacterias como una proteína de fusión con etiqueta de His se realizó mediante el análisis de ADNc en toda su extensión, la determinación de ORF, la

reamplificación de ORF mediante el uso de cebadores personalizados y la clonación por PCR de ORF en el sistema de clonación PCR-TRAP, mini-prep y digestión con enzimas de restricción del plásmido para el inserto ORF y el vector de expresión en bacterias PQE32. Después se llevaron a cabo la purificación en gel de la digestión enzimática para el inserto ORF y el vector de expresión, la subclonación del inserto ORF en el vector de expresión para crear una proteína de fusión con etiqueta de His y después la secuenciación para determinar si se añade el ORF correcto en el marco y confirmar que la etiqueta de His se fusionó en el marco en el N-terminal (x).

La expresión y purificación de proteínas se realizó mediante la inoculación de dos constructos del vector de expresión en bacterias en 5mL de cultivo LB y se indujo la expresión de proteínas con IPTG. Un constructo del vector de expresión en bacterias se inoculó en 5mL de cultivo LB seguido por la reinoculación de 1L de cultivo LB con 5mL de cultivo y se indujo la expresión de proteínas. Se llevó a cabo la purificación de proteínas por cromatografía en columna bajo condiciones desnaturizantes con perlas Ni-NTA seguido por SDS-PAGE para determinar si la proteína se expresó y se purificó y el gel del SDS-PAGE con la proteína para determinar si la proteína se expresa en el sobrenadante.

15 Anticuerpos policlonales anti-ISRAA

Se produjo un antisuero policlonal mediante la inmunización de 2 conejos con la proteína ISRAA purificada del gel como un antígeno específico. El anticuerpo se verificó para la especificidad mediante transferencia de Western y mediante su actividad biológica para bloquear la producción de IFN- γ inducida por ISRAA por los esplenocitos.

20 Detección de ISRAA e IFN- γ mediante inmunohistoquímica

En principio, la inmunotinción se realizó como se describe anteriormente (Sander y otros 1991, Lore 1998). En resumen, los esplenocitos vírgenes cultivados se cosecharon después de la estimulación con sobrenadantes de cultivos de esplenocitos obtenidos a partir de ratones inoculados con *T.b.brucei*. Las células se lavaron en PBS y se transfirieron a portaobjetos de adhesión (BioRad Lab, Munich, Alemania). Las células se dejaron adherir a los portaobjetos durante 30 minutos a 37 °C. Las células en exceso se eliminaron por lavado. La fijación de las células se realizó en formaldehído al 2 % en PBS a pH 7,4 durante 10 minutos. Las células se almacenaron después a -20 °C hasta que se requieran para investigaciones adicionales. La peroxidasa endógena se bloqueó con H₂O₂ al 1 % en solución salina equilibrada de Earl 1x (BSS) (Gibco) complementada con amortiguador HEPES 0,01 M (Gibco) y saponina al 0,1 % (Riedel-de Haen, Seelze, Alemania) durante 30 minutos a RT. Para reducir los riesgos de interacciones de anticuerpos no específicos e hidrofóbicas, se tuvieron en cuenta las siguientes precauciones: incubación con FBS al 2 % durante 5 minutos a 37 °C seguido por la incubación con sueros normales de ratón al 1 % durante 30 minutos a 37 °C. Se realizó una incubación adicional con el estuche de bloqueo (Vector Laboratories, Burlingame, CA) para bloquear la biotina endógena o las proteínas de unión a biotina. Las células se permeabilizaron con saponina al 0,1 % disuelta en BSS para permitir el acceso intracelular del anticuerpo específico de citocinas. Se añadieron el policlonal de conejo anti-IFN- γ de ratón (Van der Meide y otros 1986) y el anticuerpo policlonal anti-ISRAA de conejo diluidos 1/000 en BSS-saponina y se dejaron incubar durante 30 minutos a 37 °C seguido por varios lavados en BSS. La tinción no específica por el anticuerpo de carnero biotinilado del segundo paso provocada por las interacciones Fc se evitó mediante una incubación posterior con suero de carnero 1 % (Dako, Glostrup, Dinamarca) disuelto en BSS-saponina durante 15 minutos a RT. Después del lavado, se usó anticuerpo de carnero anti-IgG de conejo biotinilado (Vector Lab, Burlingame, CA) a una dilución de 1/600 en BSS-saponina. Después de tres lavados adicionales con BSS, las células se incubaron con un complejo de peroxidasa de rábano picante con avidina-biotina (Vectastain, Vector Laboratories) durante 30 minutos a RT. Se desarrolló una reacción de color con 3'-diaminobenzidina tetrahidrocloruro (DAB) (Vector Laboratories) y se paró después de 2-10 minutos en la oscuridad mediante lavados en BSS. Las células se contrastaron con hematoxilina y los portaobjetos se dejaron secar antes del montaje en glicerol amortiguado. Las células teñidas inmunocitoquímicamente se examinaron en un microscopio Leica RXM (Leica, Wetzlar, Alemania) equipado con una cámara a color 3CDD (Sony, Tokio, Japón). La enumeración de células productoras de citocinas se realizó manualmente a un aumento original X 630. La frecuencia de células expresadoras de citocinas se evaluó mediante la revisión de al menos 10⁴ células.

50 Electroforesis en gel con SDS y transferencia de Western

El sobrenadante recolectado de esplenocitos cultivados de 48h preparados a partir de bazos de ratones obtenidos rápidamente después de la inoculación subcutánea de *T.b.brucei* e ISRAAr se analizaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE, Bio-Rad, CA, Estados Unidos). Los geles se sometieron a transferencia de Western en principio de acuerdo con Towbin y otros 1979 mediante el uso de antisuero policlonal de conejo contra ISRAAr y a inmunotinción con fosfatasa alcalina. Los sustratos, NMT y BCIP, se disolvieron en un amortiguador veronal-acetato 0,15 M, pH 9,6. Los estándares de peso molecular se corrieron en paralelo.

60 Análisis estadístico

Se usó la prueba de Mann-Whitney para calcular el nivel de significación (*=p<0,01, **=p<0,001, ***=p<0,0001).

65 Resultados

Detección de la actividad de ISRAA y efectos de la desnervación esplénica en la acción de ISRAA

El IFN- γ es una citocina inmunorreguladora potencial de las respuestas inmunológicas innatas y adaptativas. Mediante el uso de inmunoensayos de IFN- γ y de ensayos de incorporación de ^3H -Timidina, se analizó una hipótesis de comunicaciones nerviosas-inmunológicas esenciales en la inmunidad innata después de recolectar los sobrenadantes de cultivos de esplenocitos de 48 horas a partir de ratas desafiadas durante menos de un minuto con *T.b.brucei* inoculado por vía subcutánea. Estos sobrenadantes se añadieron después a células vírgenes. Los sobrenadantes de esplenocitos de las ratas inoculadas con tripanosoma estimularon significativamente a las células vírgenes a producir IFN- γ (Fig. 1A) y a proliferar (Fig. 1B) en comparación con las células inoculadas con PBS no estimuladas ($p < 0.0001$).

Para analizar si el nervio esplénico está implicado directamente en esta actividad, los sobrenadantes de esplenocitos recolectados a partir de los bazo de ratas desnervadas desafiadas por vía subcutánea con *T.b.brucei* durante menos de un minuto y cultivados durante 48 horas no mostraron actividad biológica cuando la inducción de IFN- γ y las respuestas proliferativas se redujeron significativamente con la desnervación esplénica ($p < 0.0001$). Los sobrenadantes de las ratas simuladas mostraron actividad similar a los de las ratas no desnervadas. Con-A se usó como un control positivo y mostró una inducción alta de IFN- γ y un aumento de la proliferación en ambos esplenocitos desnervados y no desnervados (Fig. 1).

Resultados de la Visualización Diferencial Fluorescente (FDD)

Para identificar los genes que se expresan de forma diferenciada en los esplenocitos obtenidos en menos de un minuto a partir de ratones inoculados por vía subcutánea con *T.b.brucei* en comparación con los ratones control inoculados con PBS se usó la técnica de FDD para detectar genes encendidos/apagados y regulados positivamente/regulados negativamente. Los resultados del tamizaje exhaustivo por FDD automatizado mediante el uso del Sistema de Electroforesis FDD Horizontal se muestran en la Fig. 2A. Veinte bandas de ADNc presentaron diferencias reproducibles. Todas las 20 bandas de ADNc se buscaron para la reamplificación, la clonación y la secuenciación del ADN. El análisis de las bandas de ADNc y BDD y la confirmación de genes expresados de forma diferenciada revelaron el descubrimiento de un nuevo gen que se expresa de forma diferenciada en el grupo experimental (banda 4CC). Este gen no mostró similitudes con la secuencia nucleotídica (Fig. 2B). Además, la secuencia aminoacídica predicha fue única.

Secuenciación del gen en toda su extensión y expresión y purificación de proteínas

Para obtener el ADNc en toda su extensión del gen seleccionado, se clonó el ARNm en toda su extensión en un vector de expresión en mamíferos y la genoteca se tamizó mediante cebadores específicos construidos a partir de la secuencia original aislada por FDD de la banda 4CC (Fig. 2B). Se obtuvo la secuencia en toda su extensión (Fig. 3A) y una búsqueda en geneBank no reveló ninguna homología significativa. Se detectaron los Marcos de Lectura Abiertos (ORF) y el primer ORF (más largo) que se subclonó en el vector de expresión en bacterias como una Proteína de Fusión con etiqueta de His se muestra en la Fig. 3B. La búsqueda Blat se llevó a cabo para localizar la secuencia de ISRAA en el genoma. El resultado de la búsqueda describe que el gen de ISRAA se localiza en el cromosoma 14 (chr14:26423008-26425122).

Se realizó la expresión de proteínas y se purificó, caracterizó, y analizó ISRAAr para las actividades biológicas (ver más abajo).

Caracterización biológica de ISRAAr

Mediante el uso de la inmunohistoquímica, ISRAAr se analizó para su capacidad de producir IFN- γ . La estimulación de esplenocitos de ratones con ISRAAr reveló una inducción significativa de esta citocina ($p < 0.0001$). La cocultivación de los esplenocitos con el antisuero policlonal anti-ISRAAr inhibió la producción de IFN- γ estimulada por ISRAAr ($p < 0.001$). De manera similar, la actividad de estimulación de IFN- γ de los sobrenadantes de cultivos de esplenocitos de 48 horas a partir de ratones desafiados durante menos de un minuto con *T.b.brucei* inoculado por vía subcutánea disminuyó por el antisuero policlonal anti-ISRAAr ($p < 0.001$) (Fig. 4A).

El análisis por electroforesis con SDS y por transferencia de Western de ISRAAr y los sobrenadantes de cultivos de esplenocitos de 48 horas a partir de ratones desafiados durante menos de un minuto con *T.b.brucei* inoculado por vía subcutánea mediante el uso de un antisuero policlonal anti-ISRAAr mostraron bandas con un peso molecular de ~ 15 kD (Fig. 4B y C).

El papel de ISRAA en la modulación de respuestas innatas y supresión de enfermedades

La inmunosupresión es una característica conocida de la enfermedad tardía de tripanosomiasis africana donde las células obtenidas 3 semanas después de las infecciones fracasaron en proliferar cuando se estimularon con con-A. Sin embargo, la adición de ISRAA a esplenocitos estimulados con con-A obtenidos a la semana 3 después de la infección resultó en una respuesta proliferativa significativa ($p < 0.01$ cuando se añade ISRAA solo y $p < 0.0001$ cuando se añade ISRAA con con-A), pero no se registró respuesta proliferativa significativa con IL-2 en comparación con cultivos no estimulados (Fig. 5A).

Células productoras de ISRAA y respondedoras a ISRAA

Para explorar el tipo de células que pueden producir ISRAA, los ratones se desafiaron durante menos de un minuto con *T.b.brucei* inoculado por vía subcutánea. Los esplenocitos se aislaron y se enriquecieron para obtener poblaciones purificadas de CD4⁺, CD8⁺, células B y monocitos/macrófagos. Todos estos tipos celulares mostraron la capacidad de producir ISRAA según se detecta mediante inmunohistoquímica. En los experimentos control, los esplenocitos a partir de ratones no inoculados no expresaron producción de ISRAA (Fig. 5B). Para estudiar, además, los tipos de células que pudieran responder a ISRAA mediante la producción de IFN- γ , los esplenocitos de ratones se estimularon por ISRAA y desde entonces se purificaron las células T CD4⁺, CD8⁺, las células B y los monocitos/macrófagos y se analizaron para la producción de IFN- γ mediante inmunohistoquímica. Además, todos los tipos de células respondieron a la estimulación de ISRAA ya que la producción de IFN- γ se registró en todas las poblaciones. Las células no estimuladas se usaron como controles y no se registró producción de IFN- γ (Fig. 5C).

Análisis

Los datos del presente trabajo mostraron una inducción rápida del Agente Activador de la Liberación del Sistema Inmunológico (ISRAA) de ~15 kD inducido por el sistema nervioso en el bazo a los pocos segundos después del desafío parasitario. La aparición de este factor se asoció con la expresión génica rápida en el bazo que se demostró ser de una secuencia nucleotídica individual y que se localiza en el cromosoma 14.

El bazo se encuentra muy innervado por neuronas adrenérgicas que entran en su parénquima y permanecen muy asociados con la vasculatura esplénica. Por lo tanto, se sugiere que el bazo juega un papel fundamental en los procesos de señalización nerviosos a inmunológicos documentados en este estudio. De acuerdo con esta sugerencia, se registró la actividad del nervio simpático sólo a partir del nervio esplénico después de la inyección intravenosa de LPS en ratas adultas, con un tiempo de aparición corto de 17,1-23,5 min (MacNeil y otros 1996). De manera interesante, la exposición de pocos segundos a parásitos vivos resultó en la inducción de ISRAA, lo que activó las células del sistema inmunológico para producir IFN- γ y para la proliferación. Además, ISRAA disminuye por la desnervación simpática del bazo. Un tiempo menor de 1 min es más corto que el tiempo de la actividad eléctrica registrada anteriormente en el nervio esplénico (MacNeil y otros 1996). Sin embargo, el agente de desafío era diferente del parásito muy virulento usado aquí, y además las actividades eléctricas pueden comenzar inmediatamente pero no pueden registrarse mediante nuestros métodos actuales antes de que se amplifiquen después de varios minutos. La inhibición de las reacciones innatas tempranas mediante la desnervación esplénica regula negativamente el proceso de la enfermedad y prolonga la sobrevivencia de los animales mediante la supresión del crecimiento de los parásitos (Liu y otros 2000) y reduce significativamente la severidad de la enfermedad en EAMG (Bakhiet y otros 2006). Ya que los parásitos necesitan su huésped para su sobrevivencia no pueden insultarlo. Sin embargo, en sus procesos para evadir el ataque inmunológico innato pueden dañar al huésped. Esto puede lograrse mediante, por ejemplo, su ocultamiento en el tejido y su multiplicación allí o el uso de las citocinas derivadas del huésped (Bakhiet y otros 1996), expresar moléculas homólogas del huésped (Petry y otros 1987, MacNeil y otros 1990, Jauberteau 1991, Duvaux-Miret 1992), cambiar su revestimiento superficial (Borst 1991) o activar la producción de anticuerpos policlonales por las células inmunológicas (Minoprio 1986). Uno o más de estos mecanismos junto con la sobreproducción de mediadores casi seguro afectarán negativamente el estado del sistema inmunológico y resultará en la disfunción inmunológica. Estos mecanismos pueden explicar el curso leve de la enfermedad registrado en las ratas desnervadas (Liu y otros 2000, Bakhiet y otros 2006) ya que la desnervación disminuye ISRAA e inhibe las respuestas inmunológicas innatas tempranas lo que sugiere que la inhibición de estas reacciones especialmente durante las infecciones tempranas puede ser beneficiosa para el huésped.

Al contrario de los efectos tempranos de ISRAA, esta molécula se requiere para la protección de la inmunosupresión sucesiva que evoluciona últimamente durante la infección. Esto fue demostrado por el fracaso de los esplenocitos de proliferar después de la estimulación con con-A a la semana 3 después de la inoculación en ratas no desnervadas, lo que se alivió mediante la desnervación o la adición de ISRAA, pero no de IL-2. Las consecuencias de la respuesta inmunológica temprana pueden apagar ISRAA para entelecer la reacción inmunológica. Siempre que se requiera ISRAA, como en el estado de inmunosupresión de tripanosomiasis, su gen ya puede haberse apagado. Esto explica posiblemente los efectos proliferativos registrados después de añadir ISRAA a los esplenocitos inmunosuprimidos.

En la vida normal, el huésped sobrevive a muchos agentes infecciosos en ausencia de la inmunidad adaptativa específica debido a la presencia de varios mecanismos protectores que son independientes del reconocimiento antigénico específico. Estos mecanismos independientes de antígeno forman la inmunidad innata. Como se presenta en la presente descripción, esta investigación ha demostrado que las señales generadas como resultado de los contactos entre los parásitos o los factores de desafío y las terminaciones nerviosas en las barreras innatas, tales como la piel, se transmiten por los nervios autonómicos (simpáticos o parasimpáticos) al bazo. Esto ha sugerido, por lo tanto, que el bazo contiene una unidad control central (CCU) del sistema inmunológico que recibe señales durante los desafíos peligrosos, tales como, infecciones parasitarias, y asume una función de coordinación en la movilización de los mecanismos de defensa. Sin limitarse a cualquier teoría en particular, una hipótesis actual es que cuando la CCU del bazo recibe estas señales de alarma da órdenes en forma de mediadores liberados tales como ISRAA para emitir respuestas primarias por las células implicadas en la inmunidad innata en respuesta a estos mediadores después de que el huésped se desafía con infecciones. A partir de la masa molecular relativamente baja de ISRAA, su acción biológica sobre un amplio espectro de tipos celulares tales como células T y B y monocitos/macrófagos y, además, a

partir de la capacidad de las mismas poblaciones celulares para responder a ISRAA mediante la producción de citocinas como IFN- γ , parece que ISRAA es una citocina de la inmunidad innata. Esto es apoyado por la alineación de ISRAA al cromosoma 14 ya que varias citocinas de baja masa molecular se localizan en el cromosoma 14 (Hunt y otros 1997). Además, se encontró un locus muy importante que controla en suero la citocina inflamatoria IL-6 en el cromosoma 14 (Végyvári y otros 2005).

En conclusión, los datos presentes demuestran que las comunicaciones tempranas entre el CNS y el sistema inmunológico durante los desafíos peligrosos resultan en la inducción de ISRAA, el primer ejemplo de un factor inducido por el sistema nervioso que induce citocinas en las células inmunológicas innatas. Hasta la fecha no se ha identificado ninguna molécula individual o grupo de moléculas que funcionen como mediadores entre los sistemas nerviosos e inmunológicos en respuesta a un estímulo nervioso después de un desafío inmunológico. El presente trabajo, sin embargo, ahora ha identificado una molécula tal y dicha molécula puede ser particularmente ventajosa en la comprensión adicional del mecanismo para el inicio y acción de la inmunidad innata. Además, tal mediador ofrece también beneficios particulares como un agente terapéutico potencial para modular las respuestas naturales en los trastornos del sistema inmunológico o en individuos inmunosuprimidos o inmunocomprometidos. Además, los compuestos o moléculas que inhiben esta función de tal mediador pueden ser particularmente beneficiosos como un tratamiento terapéutico en individuos con un sistema inmunológico sobreestimulado.

Referencias

1. Hadden, J.W., Handden, E.M., y Middleton, E.JR. Lymphocyte blast transformation. Demonstration of adrenergic receptors in human peripheral lymphocyte. *Cell. Immunol.* 1970; 1: 583-595.
2. Sanders, V.M., y Munson, A.E. Norepine and the antibody response. *Pharmacolog. Rev.* 1985; 37: 229-248.
3. Saito H. Innervation of the guinea pig spleen studied by electron microscopy. *Am J Anat.* 1990; 189: 213-235.
4. Madden, K.S., y Livnat, S. 1991. Catecholamine action and immunologic reactivity. In *Psychoneuroimmunology* (ed.), Ader, R., Felten, D.L. y Cohen, N., páginas 283-310. Academic press, N.Y.
5. Elenkov IJ, Wilder RL, Chrousos GP, Vizi ES. The sympathetic nerve--an integrative interface between two supersystems: the brain and the immune system. *Pharmacol Rev.* 2000; 52: 595-638.
6. Simard, A.R., Rivest, S. Do pathogen exposure and innate immunity cause brain diseases? *Neurol Res.* 2005; 7: 717-725.
7. Bakhiet, M., Tjernlund, A., Mousa, A., Gad A., Strömlblad, S., Seiger, Å y Andersson, J. Rantes promotes growth and survival of human first trimester forebrain astrocytes. *Nature Cell Biol.* 2001; 2:150-157.
8. Bakhiet M, Yu L, Ozenci V, Khan A, Shi F-D. Modulation of immune responses and suppression of experimental autoimmune myasthenia gravis by surgical denervation of the spleen. *Clin Exp Immunol.* 2006; 144: 290-298.
9. Liu Y, Mustafa M, Li H-L, Nuortio L, Mustafa A y Bakhiet M.. Modulation of early immune responses and suppression of *Trypanosoma brucei brucei* infections by surgical denervation of the spleen. *Neuroimmunomodulation.* 2000; 8:31-38
10. Liu Y., Li Z., Svaren-Quiding C., Cui J., Ozenci V., y Bakhiet M. 2004. Splenic denervation suppresses mRNA gene expression and protein production of IL-1 β and IL-6 by peritoneal macrophages in both *Trypanosoma brucei brucei*-infected and non-infected rats. *Neuroimmunomodulation.* 2004; 11: 113-118.
11. Olsson T., Bakhiet M., Edlund C., Höjeberg B., Van der Meide P.H., y Kristensson, K. 1991. Bidirectional activating signals between *Trypanosoma brucei* and CD8+ T cells: a trypanosome-released factor triggers interferon- γ production that stimulates parasite growth. *Eur. J. Immunol.* 1991; 21: 2447-2454.
12. Olsson T., Bakhiet M., Höjeberg B., Ljungdahl Å., Edlund C., Andersson G., Ekre H-P, Fung W-P, Leung, Mak T., Wigzell H., Fiszler U., y Kristensson K. 1993. CD8 is critically involved in lymphocyte activation by a *Trypanosoma brucei brucei* released molecule. *Cell* 1993; 72: 715-727.
13. Vaidya T., Bakhiet M., Olsson T., Kristensson K., y Donilson J. The gene for a T-lymphocyte triggering factor from African trypanosomes. *J. Exp. Med.* 1997; 186: 433-438.
14. Askonas BA. Interference in general immune function by parasite infections; African trypanosomiasis as a model system. *Parasitology* 1984; 88: 595-638.
15. Wei G, Tabel H. Regulatory T cells prevent control of experimental african trypanosomiasis. *J Immunol.* 2008; 180: 2514-2521.

16. Mustafa, M.I., Diener, P., Höjeberg, B., Van der Meide, P., y Olsson, T. T cell immunity and interferon- γ secretion during experimental allergic encephalomyelitis in Lewis rats. *J. Neuroimmunol.* 1991; 31:165-177.
- 5 17. Van der Meide, P.H., Dubbeld, M., Vijverberg, K., Kos, T., y Schellekens, H. The purification and characterization of rat gamma interferon by use of two monoclonal antibodies. *J. Gen. Virol.* 1986; 67:1059-1071.
18. Holmdahl, R., Moran, T., y Andersson, M.A. Rapid and efficient immunization protocol for production of monoclonal antibodies reactive with autoantigens. *J. Immunol. Métodos* 1985; 83: 379-384.
- 10 19. Liang P., y Pardee A.B. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction, *Science* 1992; 257: 967-971.
20. Sanders, V.M., y Munson, A.E. Norepine and the antibody response. *Pharmacolog. Rev.* 1985; 37:229-248.
- 15 21. Lore K, Sonnerborg A, Spetz AL, Andersson U, Andersson J. Immunocytochemical detection of cytokines and chemokines in Langerhans cells and in vitro derived dendritic cells. *J Immunol Methods* 1998; 214: 97-111.
22. Towbin, H., Staehlin, T. y Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets. *Proc. Natl. Acad.Sci.* 1979; 76: 4350.
- 20 23. Mix, E., Olsson, T., Correale, J., Kostulas, V., y Link, H. CD4+, CD8+, and CD4- CD8- T cells in CSF and blood of patients with multiple sclerosis and tension headache. *Scand. J. Immunol.* 1990; 31, 493-501.
24. MacNeil, B.J., Jansen, A.H., Greenberg, A.H., y Nance, D. M.. Activation and selectivity of splenic sympathetic nerve electrical activity response to bacterial endotoxin. *Am. J. Physiol.* 1996; 270: 264-270.
- 25 25. Bakhiet M., Olsson, T., Mhlanga, J., Büscher, P., Lycke, N., Van der Meide, P., y Kristensson K. Human and rodent IFN- γ as a growth factor for *Trypanosoma brucei brucei*. *Eur. J. Immunol.* 1996; 26: 1359-1364.
- 30 26. Petry K., Voisin, P., Baltz, T., y Labouesse, J. Epitopes common to trypanosomes (*T. cruzi*, *T. dionisli* and *T.vespertilionis* (Schizotrypanum): astrocytes and neurons. *J. Neuroimmunol.* 1987; 16: 237-252.
27. MacNeil I.A., Suda, T., Moore, K.W., Mosmann, T.R., y Zlotnik, A. IL-10, a novel growth cofactor for mature and immature T cells. *J. Immunol.* 1990; 145: 4167-4173.
- 35 28. Jauberteau, M.O., Ben Younes-Chennoufi, A., Amevige, M., Bouteille, B., Dumas, M., Breton, J.C., y Baumann, N. Galactocerebrosides are antigens for immunoglobulins in sera of an experimental model of trypanosomiasis in sheep. *J. Neurol. Sci.* 1991; 101: 82-86.
- 40 29. Duvaux-Miret O., Stefano, G.B., Smith, E.M., Dissous, C., y Capron, A. Immunosuppression in the definitive and intermediate hosts of the human parasite *Schistosoma mansoni* by release of immunoreactive neuropeptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos* 1992; 89: 778-781.
- 45 30. Borst, P. Molecular genetics of antigenic variation. *Immunol Today* 1991; 12: 29-33.
31. Minoprio P.M., Eisen, H., Forni, L., D'Imperio Lima, M.R., Jaskowicz, M., y Coutinho, A. Polyclonal lymphocyte responses to murine *Trypanosoma cruzi* infection. I. Quantitation of both T- and B-cell responses. *Scand J Immunol.* 1986; 24: 661-668.
- 50 32. Hunt JE, Friend DS, Gurish MF, Feyfant E, Sali A, Huang C, Ghildyal N, Stechschulte S, Austen KF, Stevens RL. Mouse mast cell protease 9, a novel member of the chromosome 14 family of serine proteases that is selectively expressed in uterine mast cells. *JBC* 1997; 272: 29158-29166.
- 55 33. Végvári A, Szabó Z, Szántó S, Nesterovitch AB, Mikecz K, Glant TT, Adarichev VA. Two major interacting chromosome loci control disease susceptibility in murine model of spondyloarthritis. *J Immunol.* 2005; 175: 2475-2483.

ES 2 606 950 T3

Listado de secuencias

<110> Universidad Bakhiet del Golfo Árabe, Abdelmoiz

5 <120> Mediador del Sistema Inmunológico

<130> 1154-0002

<150> GB0703887.0

10 <151> 2007-02-28

<160> 3

<170> PatentIn versión 3,3

15

<210> 1

<211> 2093

<212> ADN

<213> Rattus sp.

20

<400> 1

	cccagttagt gcctgagtac gagagactca tcagggctga gaaaggagaa tggcagggga	60
	aacagtgcta caaggatgtc ctttgtgtcc tgaccatgca gaaggagaca gaagcccag	120
25	gattggtggt tcccagaggc agagcccact cctggagggtg actcacactc agtgttgta	180
	tttgatcctt agctgtctgt atgtctgggtg ccctgtgacc cagtctcttt atggtgctcc	240
	ggagcagcat tcctttctgt cccccctgt tcttctccac gcttcccaac gaccaggta	300
30	acacccactt gccatctccc tgtaaacct accttcccag ttagtgctg agtacacaga	360
	agtgacatct ctccaggta tcagaattct tgtcaatccc tctgagtcag caaactgcct	420
	gggttagaag tctgggactt ctctgggact cagaacccaa tgcccagaat ctgagccaca	480
35	tcaaggctgg ttgttctccc tctctctatc ttgagagttt ggcttgtgca tgacaggcct	540
	gcctgcccac ttagttagcc ttccttctt tcttctaac ttcctgatgg ccttcgaagc	600
	ccctagactt accatatcac taccaaaaga aaaaagaaa agaaaaagct gtaagtggga	660
40	agtgaccac ttttgacccc tggtagatgc atcccaggta gatgccttgg tcccttgtct	720
	tattggaact gattctagct catccatgag ctgaaggagag tcagtccttt gacccaagct	780
	tgggactgtg gtgtcctggc tacattatct cccttctcac ccctcctcta gaggtcctt	840
45	cagggggcgg gctccccact gccagaggat aaagcatccc cgactccgga gccagccagc	900
	catgccacag cactgtatct attggcggct cctcttcaact caggcccacg acaggagttc	960
	agacccccgc gagaaaagcc acccgctatt gatccttagt caggctctcg gagcctggca	1020
50	gacattcatc aaggagccac agcatggggc tacagctcgc cctttctttc tcttctctt	1080
	cttctacccc ccaagtcatt ccccccccc ggggggggggt ccgagggagg cgggtgaggg	1140
	ggcttgccga ggtagctcca agcactgcgg ggtgggggtg ggtgggggtg ggttgctgt	1200
55	gggccccggg cttttgagca agtctttgga agttagagat gtggaacttg gagcgagtca	1260
	gggaaagccc ttctaacgaa gatagtgtgt ggagtgccg catttctgta gactccaata	1320
	ctaaaaagag gctgctaacc aagaggcct tgagggattt gattccagag aagagagcct	1380
60	agaaattagc aagtgaaggg ggccagttt gactgatgaa tgggtgcttg aaaacaattt	1440

65

ES 2 606 950 T3

gttttcttaa gtatgtaaat atgctagtga agagtattta ctttttgggt taccttgaa 1500
aacctgtat ctggaatatt atttccatcc tcagggtccc actcaggagc ttctgaagtg 1560
5 ggtcccagg agaactaaga ggtaggagga cgaggaggca aaacaacggg aagctgtcct 1620
tataattttt aaaggattac caccaccaag tccctgcccc taagggtgaa actttgctca 1680
gttccagcct gaatgttcac tcaacctgca ggaatgatct tttttaatat atgtatttca 1740
10 aaatatatgt atattttatt tatatatgta tatatcatgt atgaatatgt ttgcttgctt 1800
atatgtccgt gttccacttg tgtgtttggt gccctcggaa tagaagaggg tgttgaattt 1860
ccctaaacct ggagtttcag atgattgtga gctgccacat ggggtgccaag gagagaattt 1920
15 tggccctttg caagagcaag aaaccttttt taacctactga gccatttttc ctgccccagg 1980
actttttttg taaagttagt tctttttgct actgtgtggg taagcccttg gccactgaac 2040
aggccctatg aatcagaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaa 2093

20 <210> 2
<211> 378
<212> ADN
<213> Rattus sp.

25 <400> 2
atggcagggg aaacagtgc acaaggatgt ctttgtgtc ctgaccatgc agaaggagac 60
agaagcccca ggattggtgg ttcccagagg cagagccac tcctggaggt gactcacact 120
30 cagtgtgtc attgatcct tagctgtctg tatgtctggt gcctgtgac ccagtctctt 180
tatggtgtc cggagcagca ttctttctg tcccccttg ttcttctcca cgcttccaa 240
cgaccaggta cacaccact tgccatctcc ctgttaacct taccttccca gttagtgcct 300
35 gagtacacag aagtgacatc tctccaggtc atcagaatc ttgtcaatcc ctctgagtca 360
gcaaactgcc tgggttag 378

<210> 3
<211> 125
<212> PRT
<213> Rattus sp.

<400> 3
45 Met Ala Gly Glu Thr Val Leu Gln Gly Cys Pro Leu Cys Pro Asp His
1 5 10 15
Ala Glu Gly Asp Arg Ser Pro Arg Ile Gly Gly Ser Gln Arg Gln Ser
50 20 25 30
Pro Leu Leu Glu Val Thr His Thr Gln Cys Cys His Leu Ile Leu Ser
35 40 45
55 Cys Leu Tyr Val Trp Cys Pro Val Thr Gln Ser Leu Tyr Gly Ala Pro
50 55 60
Glu Gln His Ser Phe Leu Ser Pro Leu Val Leu Leu His Ala Ser Gln

60

65

Reivindicaciones

- 5 1. Una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia nucleotídica que presenta al menos 70 % de homología con la secuencia representada por la secuencia nucleotídica de sec. con núm. de ident.: 1.
2. Una molécula de ácido nucleico aislada que consiste en la secuencia de ácidos nucleicos de acuerdo con la sec. con núm. de ident.:2.
- 10 3. Una molécula de ácido nucleico aislada de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2, en donde dicho ácido nucleico es ADN o ARN, y/u opcionalmente en donde dicho ADN es una molécula de ADNc.
4. Una molécula de ácido nucleico aislada de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en donde dicha molécula de ácido nucleico aislada es una molécula de ácido nucleico de mamíferos.
- 15 5. Una molécula de ácido nucleico u oligonucleótido aislada que es antisentido a una molécula de ácido nucleico como la reivindicada en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
- 20 6. Una molécula de ácido nucleico u oligonucleótido aislada que es antisentido a la región codificante de una molécula de ácido nucleico como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.
- 25 7. Una molécula polipeptídica aislada codificada por
(i) una molécula de ácido nucleico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4; o
(ii) un ácido nucleico que hibrida bajo condiciones de alto rigor al ácido nucleico aislado de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.
- 30 8. Una molécula polipeptídica aislada que tiene al menos 70 % de homología con la secuencia de aminoacídica de sec. con núm. de ident. 3.
9. Una molécula de ácido nucleico aislada que codifica el polipéptido de la reivindicación 8.
- 35 10. Un vector de expresión recombinante adecuado para la transformación de una célula huésped que comprende un ácido nucleico como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 y 9;
y/u opcionalmente en donde el vector de expresión recombinante es un plásmido;
y/u opcionalmente en donde el vector de expresión recombinante es un vector de expresión en procariontes o eucariotas; y/u opcionalmente en donde la molécula de ácido nucleico se une operativamente a una secuencia reguladora o de control de la expresión;
- 40 11. Un vector de expresión recombinante de acuerdo con la reivindicación 10, en donde el ácido nucleico se une operativamente a la secuencia reguladora o de control de la expresión para permitir la expresión de una molécula de ARN que es antisentido al ácido nucleico aislado de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, y 9.
- 45 12. Una célula huésped transformada que comprende el vector de expresión recombinante de la reivindicación 10; y/u opcionalmente en donde la célula huésped es una célula huésped eucariota o procarionte.
- 50 13. Un método para preparar un polipéptido ISRAA aislado que se induce por un estímulo nervioso e inicia las respuestas inmunológicas, el método que comprende cultivar una célula huésped transformada que incluye un vector de expresión recombinante como se reivindica en la reivindicación 10 en un medio adecuado hasta que se produce el polipéptido ISRAA y se aísla el polipéptido resultante de dicho medio.
- 55 14. Un anticuerpo monoclonal o policlonal o fragmento de unión a antígeno específico de estos para un epítipo de un polipéptido como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 7 o 8.
- 60 15. Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo monoclonal o policlonal como se reivindica en la reivindicación 14 en un portador farmacéuticamente aceptable.
16. Un mamífero transgénico no humano que contiene células transfectadas con una molécula de ácido nucleico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 y 9.
- 65 17. El mamífero transgénico no humano de la reivindicación 16 en donde dicho mamífero es un ratón o una rata.
18. El mamífero transgénico no humano de cualquiera de las reivindicaciones 16 o 17, que comprende una mutación que resulta de la inserción de una secuencia de gen marcador seleccionable u otra secuencia heteróloga en el genoma del gen *israa* endógeno mediante recombinación homóloga;
19. El mamífero transgénico no humano de la reivindicación 18 en donde dicha molécula de ácido nucleico se expresa en la orientación sentido y dicho mamífero expresa un ISRAA funcional

- 5
20. El mamífero transgénico no humano de la reivindicación 18 en donde dicha molécula de ácido nucleico se expresa en la orientación antisentido de manera que la expresión o la actividad endógena de ISRAA se inhibe al menos en las células de dicho mamífero que expresa dicho ácido nucleico.
- 10
21. Un método para estimular la respuesta inmunológica innata *in vitro* en células inmunosuprimidas que comprende (i) poner en contacto las células con el polipéptido purificado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 7 u 8; o (ii) transfectar las células con una molécula de ácido nucleico aislada de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 y 9.
- 15
22. Un método para inhibir la respuesta inmunológica innata *in vitro* en células que comprende poner en contacto las células con un anticuerpo policlonal o monoclonal que se une a un polipéptido de acuerdo con la reivindicación 7 u 8.
- 20
23. Un método para inhibir la respuesta inmunológica innata *in vitro* en células con enfermedad inflamatoria que comprende inhibir la actividad o la expresión de un polipéptido de acuerdo con la reivindicación 7 u 8 mediante: (i) el uso de un anticuerpo policlonal o monoclonal específico para dicho polipéptido; o(ii) en donde la expresión del polipéptido se inhibe mediante la introducción en la célula de una molécula de ácido nucleico aislada u oligonucleótido de acuerdo con la reivindicación 5 o la reivindicación 6; y opcionalmente en donde la molécula de ácido nucleico aislada u oligonucleótido es ARN, por ejemplo, ARN bicatenario; y opcionalmente en donde la molécula de ácido nucleico aislada se define, además, como un oligonucleótido o molécula de ácido nucleico que es (i) complementaria a la cadena sentido de una secuencia genética que codifica dicho polipéptido o (ii) a una región reguladora de un gen que codifica el polipéptido o (iii) a una región de iniciación de la transcripción de un gen que codifica el polipéptido o (iv) a una región sin traducir 5' o 3' de un gen que codifica el polipéptido ISRAA o (v) a un codón de iniciación de la traducción de un gen que codifica dicho polipéptido; y opcionalmente en donde la molécula de ácido nucleico u oligonucleótido se incluye en un vector de expresión recombinante que permite la expresión de dicho ácido nucleico u oligonucleótido en la célula; y opcionalmente en donde la molécula de ácido nucleico u oligonucleótido se introduce en las células mediante el uso de al menos un vehículo de suministro o técnica seleccionada de la lista que comprende vectores virales, microinyección, electroporación, coprecipitación, liposomas y suministro en aerosol.
- 25
- 30
- 35
24. Un estuche terapéutico para inhibir la respuesta inmunológica innata en células, dicho estuche que comprende un anticuerpo policlonal o monoclonal que se une a una proteína codificada por el ácido nucleico de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 y 9; o al polipéptido de la reivindicación 7 u 8 para la incubación con una muestra de células y medios para añadir el anticuerpo a dichas células.
- 40
25. Un estuche terapéutico que comprende una molécula de ácido nucleico aislada u oligonucleótido capaz de hibridar con una secuencia genética que codifica el polipéptido ISRAA de acuerdo con la sec. con núm. de ident.:3, y medios para añadir la molécula a las células.
- 45
26. Un estuche terapéutico para estimular la respuesta inmunológica innata en células inmunosuprimidas que comprende (i) una proteína ISRAA purificada o un polipéptido de acuerdo con la reivindicación 7 u 8 y medios para añadir la proteína a las células; o (ii) un ácido nucleico aislado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 y 9 y medios para añadir el ácido nucleico aislado a las células.
- 50
27. Un método para identificar compuestos que inhiben o estimulan la actividad o expresión del polipéptido de acuerdo con la reivindicación 7 u 8 y dicho método comprende poner en contacto *in vitro* una célula que expresa dicho polipéptido con un compuesto o agente candidato y establecer si en respuesta a un desafío inmunológico el compuesto o agente inhibe o potencia la respuesta inmunológica cuando se compara con una célula que no se ha puesto en contacto con dicho compuesto.
- 55
28. El polipéptido de acuerdo con la reivindicación 7 u 8 para el uso en un método para tratar los trastornos del sistema inmunológico o la inmunosupresión.
- 60
29. El fragmento de unión a anticuerpos o antígenos de acuerdo con la reivindicación 14, o la molécula de ácido nucleico u oligonucleótido aislada de acuerdo con la reivindicación 5 o 6 para el uso en un método para tratar individuos con un sistema inmunológico sobreestimulado.

Fig. 1

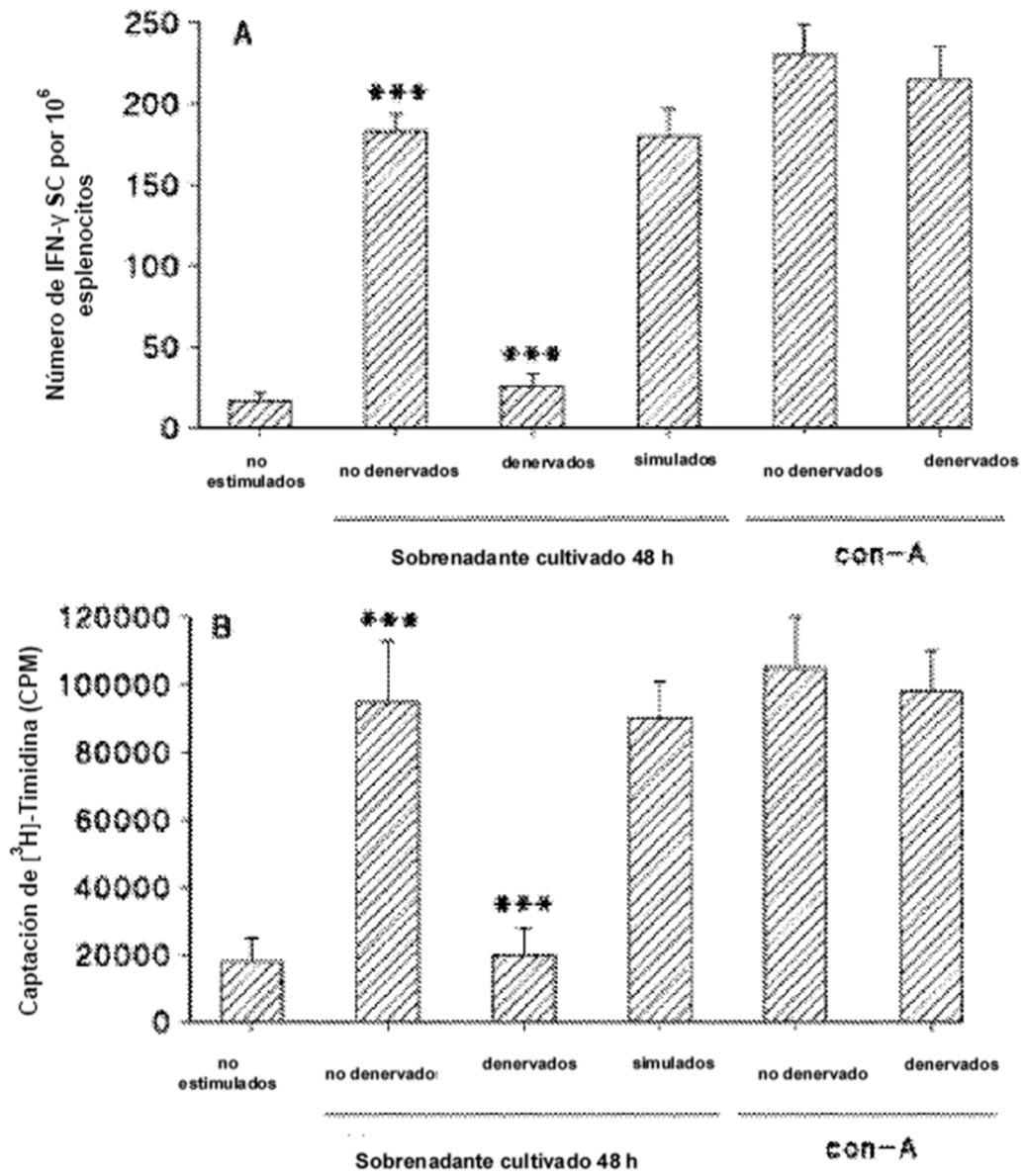
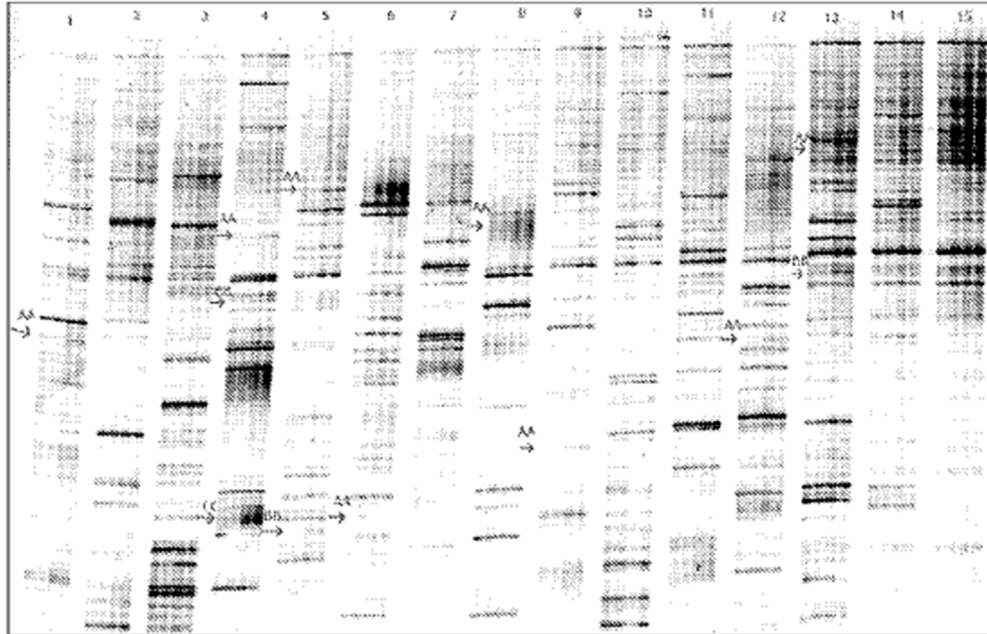


Fig. 2

A.



B. Secuencia original aislada por FDD (banda 4CC)

AAGCTTCTCAACGACCAGGTACACACCCACTTGCCATCTCCCTGTTAACCTACCTTCCC
 AGTTAGTGCCTGAGTACACAGAAGTGACATCTCTCCAGGTCATCAGAATTCTTGTCATC
 CCTCTGAGTCAGCAAAGTGCCTGGGTAGAAAGTCTGGGACTTCTCTGGGACTCAGAACC
 AATGCCCAGAATCTGAGCCACATCAAGGCTGGTTGTTCTCCCTCTCCTCATCTTGAGAGT
 TTGGCTTGTGCATGACAGGCCTGCCTGCCCACTTAGTTAGCCTTCCTTCCTTTCTTCTTA
 ACTTCCTGATGGCCTTCGAAGCCCCTAGACTTACCATATCACTACCAAAAAAAAAAAGCT

T

Fig. 3

A. Secuencia en toda su extensión

5'

CCCAGTTAGTGCCTGAGTACGAGAGACTCATCAGGGCTGAGAAAAGGAGAATG
GCAGGGGAAACAGTGCTACAAGGATGTCTTTGTGTCCTGACCATGCAGAAG
GAGACAGAAGCCCCAGGATTGGTGGTTCCCAGAGGCAGAGCCCCTCCTGGA
GGTGACTCACACTCAGTGTTGTCATTTGATCCTTAGCTGTCTGTATGTCTGGT
GCCCTGTGACCCAGTCTCTTTATGGTGCTCCGGAGCAGCATTCTTTCTGTCC
CCCCTTGTTCTTCTCCACGCTTCCCAACGACCAGGTACACACCCCCTTGCCAT
CTCCCTGTAAACCCTACCTTCCCAGTTAGTGCCTGAGTACACAGAAGTGACAT
CTCTCCAGGTCATCAGAATTCTTGTC AATCCCTCTGAGTCAGCAA AACTGCCTG
GGTTAGAAGTCTGGGACTTCTCTGGGACTCAGAACCCAATGCCAGAACTG
AGCCACATCAAGGCTGGTTGTTCTCCCTCTCCTCATCTTGAGAGTTTGGCTG
TGCATGACAGGCCTGCCTGCCCACTTAGTTAGCCTTCCTTCCTTTCTTCCTAAC
TTCCTGATGGCCTTCGAAGCCCCTAGACTTACCATATCACTACCAA AAGAAA
AAAGAAAAAGAAAAAGCTGTAAGTGGGAAGTGACCCACTTTTGACCCCTGGT
ACATGCATCCCAGGTAGATGCCTTGGTCCCTTGTCTTATTGGAACTGATTCTA
GCTCATCCATGAGCTGAAGGAAGTCAGTCCTTTGACCCAAGCTTGGGACTGT
GGTGCCTGGCTACATTATCTCCCTTCTCACCCCTCCTCTAGAGGGTCCTTCA
GGGGGCGGGCTCCCCACTGCCAGAGGATAAAGCATCCCCGACTCCGGAGCCA
GCCAGCCATGCCACAGCACTGTATTTATTGGCGGCTCCTTCTCACTCAGGCCC
ACGACAGGAGTTCAGACCCCCGAGAAAAAGCCACCCGCTATTGATCCTTAG
TCAGGTCTCCGGAGCCTGGCAGACATTCATCAAGGAGCCACAGCATGGGGCT
ACAGCTCGCCCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTACCCCCAAGTCATTCCCC

CCCCCGGGGGGGGGTCCGAGGGAGGCCGGGTGAGGGGGCTTGCCGAGGTCAC
TCCAAGCACTGCGGGGTGGGGTGGGGTGGGGTGGGGTGGGGTGGCTGTGGGCCCCG
GGCTTTTGAGCAAGTCTTTGGAAGTTAGAGATGTGGAAC TTGGAGCGAGTCA
GGGAAAGCCCTTCTAACGAAGATAGTGTGTGGAGTGCCGGCATTCTGTAGA
CTCCAATACTAAAAAGAGGCTGCTAACCAAGAGGGCCTTGAGGGATTTGATT
CCAGAGAAGAGAGCCTAGAAATTAGCAAGTGAAAGGGGCCAGTTTGGACTG
ATGAATGGGTGCTTGAAAACAATTTGTTTTCTTAAGTATGTAAATATGCTAGT
GAAGAGTATTTACTTTTTGGGTACCTTGAAAAACCCTGTATCTTGAATATTA
TTCCATCCTCAGGGTCCC ACTCAGGAGCTTCTGAAGTGGGTCCCAGGAGA
ACTAAGAGGTAGGAGGACGAGGAGGCAAAACAACGGGAAGCTGTCTTTATA
ATTTTTAAAGGATTACCACCACCAAGTCCCTGCCCTAAGGTGTAAACTTTGC
TCAGTTCCAGCCTGAATGTTCACTCAACCTGCAGGAATGATCTTTTTTAATAT
ATGTATTTCAAAATATATGTATATTTTATTTATATATGTATATATCATGTATGA
ATATGTTTGCTTGCTTATATGTCCGTGTTCCACTTGTGTGTTTGGTGCCCTCGG
AATAGAAGAGGGTGTGAATTTCCCTAAACCTGGAGTTTCAGATGATTGTGA
GCTGCCACATGGGTGCCAAGGAGAGAATTTGGCCCTTTGCAAGAGCAAGAA
ACCTTTTTTAACCACTGAGCCATTTTCTGCCCCAGGACTTTTTTTGTAAAGT
TAGTTCTTTTGCTACTGTGTGGGTAAGCCCTTGGCCACTGAACAGGCCCTAT
GAATCAGAAA

Fig. 3 (continuación)

B. Marco de Lectura Abierto etiquetado con His (ORF1)

```

50 atggcaggggaaacagtgctacaaggatgtcctttgtgtcctgac
   M A G E T V L Q G C P L C P D
95 catgcagaaggagacagaagccccaggattggtggttcccagagg
   H A E G D R S P R I G G S Q R
140 cagagcccactcctggaggtgactcacactcagtggttgcatttg
   Q S P L L E V T H T Q C C H L
185 atccttagctgtctgtatgtctggtgccctgtgaccagctcttt
   I L S C L Y V W C P V T Q S L
230 tatggtgctccggagcagcattcctttctgtcccccttgttctt
   Y G A P E Q H S F L S P L V L
275 ctccacgcttcccaacgaccaggtacacaccccacttgccatctcc
   L H A S Q R P G T H P L A I S
320 ctgttaaccctaccttcccagttagtgccctgagtacacagaagtg
   L L T L P S Q L V P E Y T E V
365 acatctctccaggtcatcagaattcttgtcaatcccctctgagtca
   T S L Q V I R I L V N P S E S
410 gcaaaactgcctgggttag 427
   A N C L G *

```

C. Marco de Lectura Abierto (ORF1): 125 aminoácidos

```

M A G E T V L Q G C P L C P D
H A E G D R S P R I G G S Q R
Q S P L L E V T H T Q C C H L
I L S C L Y V W C P V T Q S L
Y G A P E Q H S F L S P L V L
L H A S Q R P G T H P L A I S
L L T L P S Q L V P E Y T E V
T S L Q V I R I L V N P S E S
A N C L G *

```

Fig. 3 (continuación)

Fig. 4

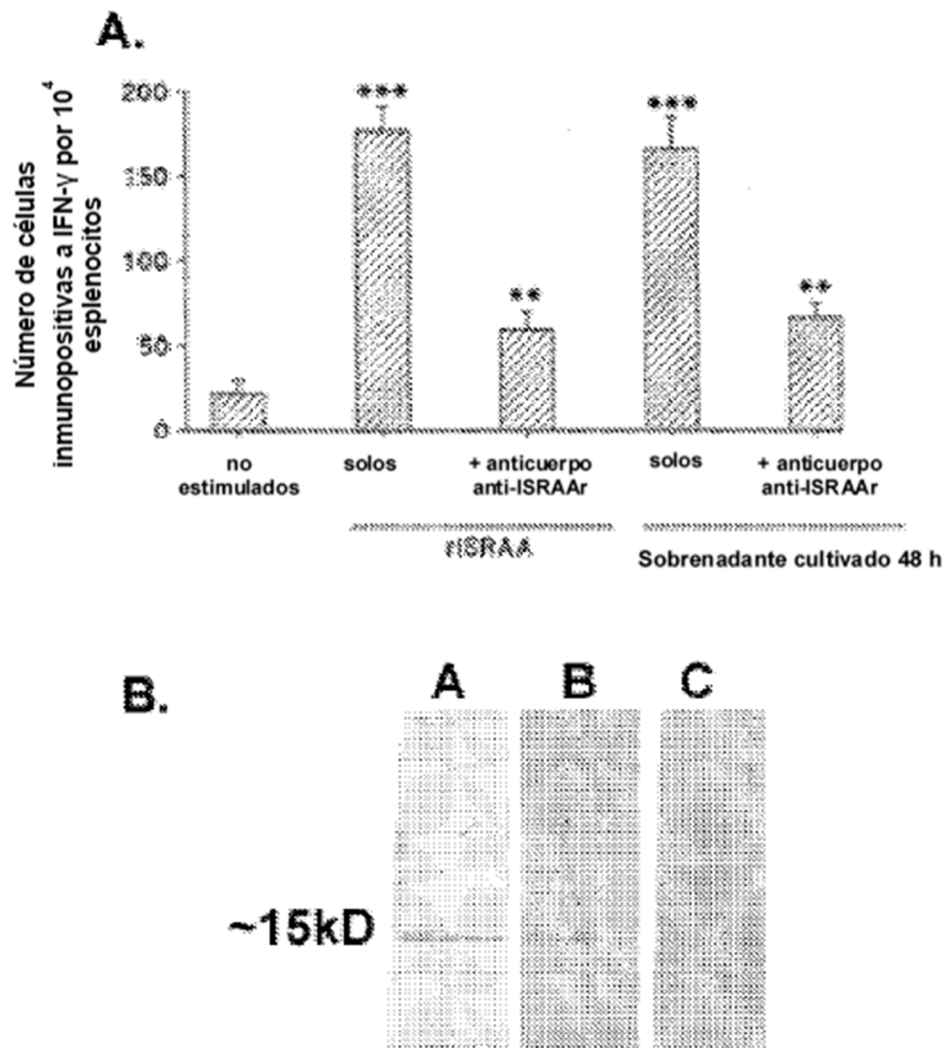


Fig. 5

