

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 369 760**

51 Int. Cl.:
A61K 38/00 (2006.01)
C07K 14/47 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **02756467 .3**
96 Fecha de presentación: **26.06.2002**
97 Número de publicación de la solicitud: **1411967**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **28.04.2004**

54 Título: **PÉPTIDO BLOQUEANTE PARA LA SECRECIÓN DE CÉLULAS INFLAMATORIAS.**

30 Prioridad:
26.06.2001 US 300933 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
05.12.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
05.12.2011

73 Titular/es:
NORTH CAROLINA STATE UNIVERSITY
1021 Main Campus Drive, CB 8210
Raleigh, NC 27695, US

72 Inventor/es:
MARTIN, Linda, D.;
ADLER, Kenneth, B. y
LI, Yuehua

74 Agente: **Curell Aguila, Marcelino**

ES 2 369 760 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

Péptido bloqueante para la secreción de células inflamatorias.

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a un péptido MANS para su utilización en el tratamiento de la artritis.

Antecedentes de la invención

10 La hipersecreción de mucosidad contribuye a la patogénesis de un gran número de enfermedades inflamatorias de las vías respiratorias en animales humanos y no humanos. El aumento de la secreción mucosa se observa en enfermedades crónicas tales como el asma, la EPOC y la bronquitis crónica; en enfermedades genéticas tales como la fibrosis quística; en trastornos alérgicos (atopia, inflamación alérgica); en las bronquiectasias; y en una serie de
15 enfermedades respiratorias infecciosas agudas tales como neumonía, rinitis, gripe o resfriado común. En consecuencia, resultan deseables nuevos métodos y compuestos terapéuticos que pueden disminuir o reducir la secreción de mucosidad.

20 En muchas de estas enfermedades respiratorias, la hipersecreción de mucosidad es acompañada por la presencia constante de células inflamatorias en las vías respiratorias. Estas células contribuyen en gran medida a la patología de estas enfermedades a través del daño que provocan en los tejidos los mediadores de la inflamación liberados por dichas células. Un ejemplo de esta destrucción a través de dicha inflamación crónica tiene lugar en los pacientes afectados de fibrosis quística, en la que los mediadores liberados por los neutrófilos (es decir, la mieloperoxidasa) provocan la descamación del tejido epitelial de las vías respiratorias.

25 La secreción insuficiente de mucosidad también tiene efectos nocivos. La mucosidad de las vías respiratorias actúa como barrera física contra las partículas biológicamente activas inhaladas y puede ayudar a prevenir la colonización bacteriana de las vías respiratorias, así como desactivar los productos citotóxicos liberados por los leucocitos. King y otros, *Respir. Physiol.* 62:47-59 (1985); Vishwanath y Ramphal, *Infect. Immun.* 45:197 (1984); Cross y otros, *Lancet* 1:1328 (1984). En el ojo, la mucosidad mantiene la película lagrimal y es importante para la salud y el bienestar oculares. La secreción de mucosidad en el tubo gastrointestinal también tiene una función citoprotectora. La función de la mucosidad como barrera química, biológica y mecánica implica que no es deseable una secreción anormalmente baja de la misma por parte de las membranas mucosas.

35 Las vías respiratorias de los mamíferos se encuentran recubiertas por una fina capa de mucosa producida y secretada por las células epiteliales de las vías respiratorias (caliciformes) y las glándulas submucosas. En enfermedades como el asma, la bronquitis crónica y la fibrosis quística, la hipersecreción de mucosidad es una característica común. El exceso de mucosidad puede contribuir a la obstrucción, la susceptibilidad a la infección e incluso a la destrucción de las paredes de las vías respiratorias y los tejidos contiguos. Los principales componentes de la mucosidad son las glucoproteínas de tipo mucina sintetizadas por células secretoras y almacenadas dentro de gránulos unidos a la membrana citoplasmática. Las mucinas son una familia de glucoproteínas secretadas por las células epiteliales, incluidas las presentes en las vías respiratorias, el tubo gastrointestinal y el aparato reproductivo femenino. Son las responsables de las propiedades viscoelásticas de la mucosidad y se conocen por lo menos ocho genes de mucinas. Thornton y otros, *J Biol. Chem.* 272, 9561-9566 (1997). La alteración mucociliar provocada por la hipersecreción de mucinas y/o la hiperplasia de las células mucosas produce una obstrucción de las vías respiratorias por mucosas que favorece la infección crónica, la obstrucción de las vías respiratorias y, en algunos casos, la muerte. Muchas enfermedades respiratorias, tales como la bronquitis crónica, la enfermedad pulmonar obstructiva crónica, las bronquiectasias, el asma, la fibrosis quística y las infecciones bacterianas, se caracterizan por la sobreproducción de mucinas. E. Prescott y otros, *Eur. Respir. J.*, 8: 1333-1338 (1995); K. C. Kim y otros, *Eur. Respir. J.*, 10: 1438 (1997); D. Steiger y otros, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 12:307-314 (1995). Tras una estimulación adecuada, los gránulos de mucina se liberan a través de un proceso de exocitosis en el que los gránulos se trasladan a la periferia de la célula, donde sus membranas se fusionan con la membrana plasmática, lo que permite la secreción luminal de sus contenidos.

55 A pesar de la importancia fisiopatológica evidente de este proceso, los mecanismos de señalización intracelular que relacionan la estimulación en la superficie celular con la liberación de gránulos de mucina no han sido dilucidados hasta recientemente. Véase Li y otros, *Journal of Biological Chemistry*, 276: 40982-40990 (2001). Es conocido que una amplia variedad de agentes y mediadores de la inflamación/humorales provocan la secreción de mucinas. Entre los mismos se encuentran agonistas colinérgicos, mediadores lipídicos, oxidantes, citocinas, neuropéptidos, ATP y UTP, productos bacterianos, elastasa de neutrófilos y contaminantes inhalados. Véase Adler y otros, *Res. Immunol.* 149, 245-248 (1998). Curiosamente, es conocido que muchos de estos secretagogos de mucina también activan diversas proteína-quinasas, y algunos estudios que han examinado la regulación del exceso de secreción de mucinas por parte de la células epiteliales de las vías respiratorias de diversas especies han puesto de manifiesto la participación de la proteína-quinasa C (PKC) o la proteína-quinasa dependiente de GMPc (PKG) en el proceso de secreción. Véase, por ejemplo, Ko y otros, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 16, 194-198 (1997); Abdullah y otros, *Am. J. Physiol.* 273, L201-L210 (1997); Abdullah y otros, *Biochem. J.* 316, 943-951 (1996); Larivee y otros, *Am. J. Respir.*

Cell Mol. Biol. 11, 199-205 (1994); y Fischer y otros, Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 20, 413-422 (1999). Recientemente se ha demostrado que en las interacciones coordinadas o "interferencias" entre estas dos proteína-cinasas en la regulación de la secreción de mucinas participan las proteínas MARCKS. Véase Li y otros, Journal of Biological Chemistry, 276: 40982-40990 (2001). Sin embargo, todavía no se han dilucidado completamente los acontecimientos de señalización en el avance de la acción coordinada de estas proteína-cinasas que conducen finalmente a la liberación exocitósica de gránulos de mucina. Curiosamente, los experimentos similares que han examinado la liberación de mediadores de la inflamación de los neutrófilos sugieren una vía similar de "interferencia" entre cinasas que regula la secreción de estas células inflamatorias; este hecho sugiere la universalidad potencial de los mecanismos de secreción que involucran a diversas cinasas, particularmente PKC y PKG.

Anteriormente, se habían dado a conocer procedimientos para cultivar células de epitelio bronquial humano normal (NHBE) en un sistema de interfase aire/líquido en el que las células se diferencian en una población heterogénea que contiene células secretoras (caliciformes), ciliadas y basales que imitan su aspecto y función *in vivo*. Krunkosky y otros, Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 22, 685-692 (2000). Estos cultivos celulares pueden proporcionar un sistema modelo *in vitro* para estudiar mecanismos de regulación de la secreción de mucinas por parte del epitelio de las vías respiratorias humanas. Sin embargo, en este ámbito existe la necesidad de comprender los mecanismos que regulan la secreción de mucinas por parte de las células del epitelio respiratorio humano y de desarrollar métodos de regulación de dicha secreción de mucinas a fin de mejorar el tratamiento antiinflamatorio.

Los esfuerzos posteriores para dilucidar los mecanismos responsables de la secreción de mediadores de la inflamación por parte de las células inflamatorias también pueden conducir a la capacidad de inhibir los dos tipos de secreción (mucosidad y mediadores de la inflamación) a través de la actuación sobre una molécula intracelular diana o un acontecimiento común a ambos tipos de vías de secreción.

Características de la invención

La invención se refiere a una nueva utilización del polipéptido miristilado de 24 aminoácidos conocido también como péptido MANS.

Particularmente, la presente invención se refiere a un péptido MANS con la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 1, o un fragmento activo del mismo, para su utilización en el tratamiento de la artritis. Asimismo, se da a conocer un péptido MANS o un fragmento activo del mismo para su utilización en el tratamiento de la artritis caracterizado porque dicha artritis es artrosis o artritis reumatoide. Tal como se utiliza en la presente memoria, un "fragmento activo" de una proteína MARCKS es aquel que altera (inhibe o potencia) la liberación mediada por la proteína MARCKS.

Generalmente, en la presente invención la administración se selecciona de entre el grupo que constituido por administración tópica, parenteral, rectal, pulmonar, inhalación y administración nasal u oral, incluyendo la administración pulmonar generalmente un aerosol, un inhalador de polvo seco, un inhalador con dosificación o un nebulizador.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "reducción" se refiere generalmente a una disminución de los efectos de la inflamación. Preferentemente, los mediadores de la inflamación se inhiben o bloquean mediante los métodos descritos. Además, la inflamación y la secreción de mucosidad se pueden reducir simultáneamente. El término "simultáneamente" significa que la inflamación y la secreción de mucosidad se reducen al mismo tiempo.

El término "inhibición" se refiere a una reducción de la cantidad de secreción de mucosidad.

Breve descripción de los dibujos

Las figuras 1A a 1D son gráficos de barras que ilustran que la hipersecreción de mucinas por parte de las células NHBE se maximiza mediante la activación de PKC y PKG.

Las figuras 2A a 2B ponen de manifiesto que la proteína MARCKS es un componente clave de la vía secretora de mucinas.

Las figuras 3A a 3C representan un gel que pone de manifiesto que un oligonucleótido antisentido dirigido contra la MARCKS hace disminuir la expresión de MARCKS y atenúa la hipersecreción de mucinas.

Las figuras 4A a 4B ponen de manifiesto que la fosforilación dependiente de la PKC libera la MARCKS de la membrana plasmática hacia el citoplasma.

Las figuras 5A a 5C ponen de manifiesto que la PKG induce la desfosforilación de la MARCKS mediante la activación de la PP2A.

La figura 6 representa gráficos de barras que muestran que la PP2A es un componente esencial de la vía secretora de mucinas.

5 La figura 7 es un gel que pone de manifiesto que la proteína MARCKS se asocia con la actina y la miosina en el citoplasma.

La figura 8 representa un mecanismo de señalización que controla la secreción de mucinas por parte de las células epiteliales de las vías respiratorias.

10 La figura 9 es un gráfico de barras que representa la capacidad del péptido MANS para bloquear la secreción de la mieloperoxidasa de neutrófilos caninos aislados.

15 La figura 10 es un gráfico de barras que representa la capacidad del péptido MANS para bloquear la secreción de la mieloperoxidasa de neutrófilos humanos aislados.

La figura 11 es un gráfico de barras que representa que el PMA estimula un pequeño aumento de la secreción de MPO de neutrófilos humanos estimulados por LPS, que se potencia de un modo dependiente de la concentración por coestimulación con 8-Br-GMPc.

20 La figura 12 es un gráfico de barras que representa que la estimulación con 8-Br-GMPc tiene poco efecto sobre la secreción de MPO en neutrófilos humanos estimulados por LPS hasta que tiene lugar una coestimulación con PMA de un modo dependiente de la concentración.

25 La figura 13 es un gráfico de barras que representa que el PMA estimula un pequeño aumento de la secreción de MPO de neutrófilos caninos estimulados por LPS, que se potencia de un modo dependiente de la concentración por coestimulación con 8-13-GMPc.

30 La figura 14 es un gráfico de barras que representa que la estimulación con 8-Br-GMPc tiene poco efecto sobre la secreción de MPO en neutrófilos caninos estimulados por LPS hasta que tiene lugar una coestimulación con PMA de un modo dependiente de la concentración.

La figura 15 es un gráfico de barras que pone de manifiesto que se requiere coestimulación con PMA + 8-Br-GMPc para la secreción máxima de MPO de neutrófilos caninos estimulados con LPS.

35 **Descripción detallada de las formas de realización preferidas**

A continuación se describe la presente invención con mayor detalle haciendo referencia a las figuras adjuntas, en las que se ilustran las formas de realización preferidas de la presente invención. Sin embargo, la presente invención se puede realizar de diferentes formas y no debe entenderse como limitada a las formas de realización expuestas en la presente memoria. Dichas formas de realización se exponen para que la presente descripción resulte exhaustiva y completa y transmita plenamente el alcance de la invención a los expertos en la materia.

45 A menos que se especifique lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente memoria tienen el mismo significado que el comúnmente entendido por un experto en la materia a la que pertenece la presente invención.

La presente invención incluye dentro de su alcance la utilización de una composición farmacéutica. Dicha composición farmacéutica comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto conocido y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Tal como se utiliza en la presente memoria, una cantidad "terapéuticamente eficaz" es la cantidad de un compuesto que resulta suficiente para aliviar los síntomas mostrados por un individuo. La cantidad terapéuticamente eficaz varía según la edad y condición física del paciente, la gravedad del trastorno que se pretende tratar, la duración del tratamiento, la naturaleza de cualquier otro tratamiento simultáneo, el vehículo farmacéuticamente aceptable utilizado y factores similares que entran dentro de los conocimientos y experiencia de los expertos en la materia. Los vehículos farmacéuticamente aceptables son preferentemente formas de dosificación sólidas tales como comprimidos o cápsulas. También se pueden utilizar preparaciones líquidas para administración oral y se pueden preparar en forma de jarabes o suspensiones, por ejemplo soluciones que contienen un principio activo, azúcar y una mezcla de etanol, agua, glicerol y propilenglicol. Si se desea, dichas preparaciones líquidas pueden incluir una o más sustancias de entre las siguientes: colorantes, aromatizantes y sacarina. Además, también se pueden utilizar agentes espesantes tales como carboximetilcelulosa, así como otros vehículos aceptables cuya selección es bien conocida en la técnica.

65 Tal como se ha mencionado anteriormente, la presente invención se refiere a métodos para la regulación de los procesos de secreción celular, especialmente aquellos que liberan mediadores de la inflamación de las células inflamatorias. Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "regulación" se refiere a bloqueo, inhibición, disminución, reducción, aumento, potenciación o estimulación. Una serie de procesos de secreción celular implican la liberación del contenido de vesículas unidas a la membrana. Se ha puesto de manifiesto que el contenido de

algunas de estas vesículas, como el contenido de las células inflamatorias, es responsable de una serie de enfermedades en numerosos tejidos de mamíferos. Algunos de los efectos de estas secreciones parecen incluir daños en el tejido previamente sano durante la inflamación. La presente invención da a conocer unos medios de bloqueo de la secreción de cualquier vesícula unida a la membrana, incluidas las que se encuentran en las células inflamatorias, actuando con un péptido sintético sobre una molécula específica que tiene un papel importante en la vía secretora intracelular. Este enfoque puede tener importancia terapéutica para el tratamiento de una amplia variedad de trastornos de hipersecreción e inflamatorios en humanos y animales.

Una ventaja de la presente invención consiste en que puede combinar una terapia que incluye el bloqueo directo de la secreción de mucosidad con una única terapia antiinflamatoria. Una ventaja de la presente invención con respecto a los tratamientos antiinflamatorios actuales que provocan una depresión general del sistema inmunológico es que se pretende que el péptido bloquee la secreción únicamente de componentes unidos a la membrana secretados por las células inflamatorias. Por lo tanto, muchos aspectos del sistema inmunológico pueden continuar funcionando sin la liberación de una serie de agentes dañinos.

Los compuestos según la presente invención pueden regular, es decir bloquear, la liberación de mediadores de la inflamación de las células. Esta inhibición de la producción inflamatoria es un medio atractivo para la prevención y el tratamiento de una serie de trastornos, por ejemplo, enfermedades y estados patológicos que cursan con inflamación. Entre los mismos se encuentran las enfermedades inflamatorias crónicas, que comprenden de manera no limitativa, artrosis, esclerosis múltiple, síndrome de Guillain-Barré, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, psoriasis, enfermedad injerto contra huésped, lupus eritematoso sistémico y diabetes mellitus insulino dependiente. Está previsto que los compuestos descritos en la presente memoria también se pueden utilizar para tratar otros trastornos asociados a la actividad de niveles elevados de enzimas proinflamatorias, tales como las respuestas a diversos agentes infecciosos y una serie de enfermedades autoinmunitarias tales como la artritis reumatoide, el síndrome de choque tóxico, la diabetes y enfermedades intestinales inflamatorias.

Tal como se describe en la presente memoria, el péptido también se puede utilizar para combatir la inflamación junto con terapias que combinan la actividad antiinflamatoria del péptido con su capacidad para bloquear la secreción de mucosidad. Entre las enfermedades que se pueden tratar mediante la capacidad del péptido para bloquear la inflamación y la secreción de mucosidad se encuentran, aunque sin limitarse a las mismas, enfermedades intestinales inflamatorias, trastornos digestivos (es decir, vesícula biliar inflamada, enfermedad de Ménétrier) y enfermedades inflamatorias de las vías respiratorias. El péptido también se puede utilizar para bloquear la liberación del exceso de insulina de las células de los islotes pancreáticos.

Se han relacionado otros mediadores proinflamatorios con una serie de enfermedades relacionadas con la afluencia de neutrófilos a los sitios de inflamación o lesión. Los anticuerpos bloqueantes se han demostrado como terapias útiles contra el daño tisular asociado a los neutrófilos en la inflamación aguda (Harade y otros, 1996, Molecule Medicine Today 2, 482). Otras células que pueden liberar mediadores de la inflamación son los basófilos, los eosinófilos, los leucocitos, los monocitos y los linfocitos, y las terapias se pueden dirigir contra la secreción de dichas células.

Aunque la presente invención no pretende limitarse a ninguna teoría en particular, se cree que los mecanismos que regulan dicha secreción basal son diferentes de los que regulan la secreción estimulada. Por otra parte, los mecanismos de secreción basal pueden requerir menos proteína MARCKS que la secreción estimulada. Dado que las terapias dirigidas a bloquear la secreción mediada por MARCKS difícilmente eliminan todas las funciones de la misma, la secreción basal se puede mantener.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "secuencia de nucleótidos de MARCKS" se refiere a cualquier secuencia de nucleótidos derivada de un gen que codifica una proteína MARCKS, incluidos, por ejemplo, una secuencia de ADN o ARN, una secuencia de ADN del gen, cualquier secuencia de ARN transcrita, una secuencia de ARN de la transcripción de pre-ARNm o ARNm, y ADN o ARN enlazados a proteína.

La administración precisa del péptido bloqueante de la MARCKS también puede superar cualquier posible limitación de bloqueo de procesos importantes de secreción. La administración de dichos agentes a las vías respiratorias no debe revestir mayor dificultad mediante formulaciones inhalables. Dado que estos agentes pueden resultar útiles en el tratamiento de la enfermedad intestinal inflamatoria, se puede prever la administración de los agentes de bloqueo al recto/colon/intestino a través de enemas o supositorios. Las inyecciones o la administración transdérmica hacia las articulaciones inflamadas pueden aliviar a los pacientes aquejados de enfermedades artríticas o autoinmunitarias imitando la secreción de las células inflamatorias locales. La inyección en las zonas circundantes de las terminaciones nerviosas puede inhibir la secreción de algunos tipos de neurotransmisores, bloqueando la transmisión del dolor intenso o los espasmos musculares incontrolables. La administración del péptido para el tratamiento de enfermedades inflamatorias de la piel no debe revestir mayor dificultad utilizando diversas formulaciones tópicas conocidas en la técnica.

La presente descripción demuestra que el sustrato miristilado de la cinasa C rica en alanina (MARCKS), un sustrato de PKC de amplia distribución, puede ser una molécula reguladora clave que actúa como mediador en la liberación

de gránulos de mucina por parte de las células de epitelio bronquial humano normal (NHBE). La secreción de mucinas a partir de estas células se puede maximizar mediante la activación de PKC y PKG. Se cree que la MARCKS actúa como punto de convergencia para coordinar las acciones de estas dos proteína-quinasas a fin de controlar la liberación de gránulos de mucina. El mecanismo parece implicar la fosforilación de MARCKS dependiente de PKD, que libera MARCKS desde la membrana plasmática hacia el citoplasma, en el que a su vez es fosforilada por una proteína-fosfatasa 2A (PP2A) que es activada por la PKG. Esta desfosforilación puede permitir que la MARCKS recupere su capacidad de unión a la membrana, lo que permite su unión a las membranas de los gránulos citoplasmáticos de mucina. Además, la MARCKS interactúa con la actina y la miosina del citoplasma y, en consecuencia, puede ser capaz de fijar los gránulos en el aparato contráctil celular, con lo que ejerce de mediador en el movimiento posterior de los gránulos y la exocitosis. Curiosamente, la secreción de MPO mediadora inflamatoria de los neutrófilos también se puede maximizar mediante la activación de PKC y PKG (tal como se ilustra en las figuras 11-15). Además, se cree que la MARCKS actúa como punto de convergencia para coordinar las acciones de estas dos proteína-quinasas, que controlan la secreción de los compartimentos unidos a la membrana en las células inflamatorias (es decir, la secreción de MPO de los neutrófilos),

Las líneas de células transformadas del epitelio de las vías respiratorias tienden a contener vías de señalización alteradas, y las líneas celulares o las células no diferenciadas pueden no responder a estímulos exógenos de un modo parecido a las células diferenciadas *in vivo*. Las células NHBE utilizadas en el presente estudio se cultivaron en la interfase aire/líquido, dando lugar a cultivos de células primarias completamente diferenciadas que mantuvieron una estructura bien documentada y funcionaban de modo parecido a los estudios *in vivo*. Véase Krunkosky y otros, *supra*; Adler y otros, *Am. Respir. Cell Mol. Biol.* 2, 145-154 (1990); Kaartinen y otros, *In vitro Cell, Dev. Biol. Anim.* 29A, 481-492 (1993); Gray y otros, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 14, 104-112 (1996). Esta metodología aire/líquido para cultivar células epiteliales de las vías respiratorias se desarrolló hace varios años a fin de ofrecer un sistema *in vitro* modelo para estudiar los mecanismos involucrados en diversos procesos celulares que tiene lugar en el epitelio de las vías respiratorias. Los cultivos celulares contienen células secretoras, así como células ciliadas y basales. Los resultados obtenidos a partir de este sistema de cultivo son significativos en cuanto a la respuesta de las células *in vivo*, dado que se mantienen los contactos célula-célula heterogéneos y la estructura polarizada del epitelio, lo que probablemente afecta al comportamiento celular *in situ*. Aunque es probable que la MARCKS esté presente también en las células no secretoras, la asociación causal clara y rápida entre las modificaciones de la MARCKS y los resultados de secreción sugieren que la secreción de mucinas es el efecto directo de los acontecimientos moleculares relacionados con la MARCKS que tienen lugar dentro de las células secretoras.

Se ha demostrado que la activación simultánea de PKC y PKG fue capaz de aumentar la secreción de mucinas de las células NHBE diferenciadas, y que la activación de cualquier cinasa individual puede no ser suficiente para producir una respuesta secretora intensa. De modo parecido, la secreción del mediador de la inflamación MPO de neutrófilos caninos o humanos aumentó mediante la activación simultánea de PKC y PKG, mientras que la activación de cualquier cinasa individual era insuficiente para inducir una respuesta secretora máxima. Se documentó una mayor respuesta secretora a PMA sólo en las células NHBE (figura 1, columna 4) y en los neutrófilos (figura 11), aunque la magnitud de la respuesta fue mucho menor que la observada por otros en una línea celular de tipo caliciforme de rata. Véase Abdullah y otros, *supra*. Además, aunque anteriormente se había documentado que un análogo de GMPc podía inducir una secreción significativa de mucinas en células epiteliales traqueales de cobaya (Fischer y otros, *supra*), cabe precisar que dicha respuesta no alcanzó niveles significativos hasta después de 8 h de exposición. Es poco probable que una respuesta secretora con un período de latencia tan prolongado sea un efecto directo, y probablemente implica la síntesis de proteínas *de novo* en lugar de la liberación de gránulos citoplasmáticos preformados y almacenados. Sin embargo, el aparente efecto sinérgico que implica una activación cooperativa de PKC y PKG puede sugerir la mediación de un mecanismo de señalización complejo y riguroso en la secreción de mucinas y/o mediadores de la inflamación. Se precisa que la vía dada a conocer a continuación se utilizó para estudiar la liberación de mediadores de la inflamación de los neutrófilos y que es probablemente la misma utilizada para estudiar las secreciones de las células caliciformes.

Tal como se ha mencionado anteriormente, la presente invención se puede utilizar en una formulación farmacéutica. En algunas formas de realización, el producto farmacéutico está presente en una composición farmacéutica sólida que puede ser adecuada para su administración oral. Se puede formar una composición sólida de materia según la presente invención y se puede mezclar y/o diluirse con un excipiente. Dicha composición sólida de materia también se puede encapsular dentro de un vehículo, que se puede presentar, por ejemplo, en forma de cápsula, sobre, comprimido, papel u otro recipiente. Cuando el excipiente actúa como diluyente, puede ser un material sólido, semisólido o líquido el que actúa como vehículo, portador o medio para la composición de materia.

Los expertos en la materia pueden considerar diversos excipientes adecuados, que se pueden encontrar en el National Formulary, 19: 2.404-2.406 (2000), cuyo contenido comprendido entre las páginas 2.404 a 2.406 se incorpora a la presente memoria en su totalidad. Entre los ejemplos de excipientes adecuados se encuentran, aunque sin limitarse a los mismos, almidones, goma arábiga, silicato de calcio, celulosa microcristalina, metacrilatos, shellac, polivinilpirrolidona, celulosa, agua, jarabe y metilcelulosa. Las formulaciones de productos farmacéuticos pueden incluir adicionalmente agentes lubricantes, tales como, por ejemplo, talco, estearato de magnesio y aceite mineral; agentes humectantes; emulsionantes y agentes de suspensión; conservantes, tales como hidroxibenzoato

de metilo y de propilo; edulcorantes o aromatizantes. También se pueden utilizar polioles, tampones y sustancias de relleno inertes. Entre los ejemplos de polioles se encuentran, aunque sin limitarse a los mismos, manitol, sorbitol, xilitol, sacarosa, maltosa, glucosa, lactosa, dextrosa y similares. Entre los tampones adecuados se encuentran, aunque sin limitarse a los mismos, tampón de fosfato, citrato, tartrato, succinato y similares. Otras sustancias de relleno inertes que se pueden utilizar incluyen las conocidas en la técnica y que resultan útiles en la preparación de diversas formas de dosificación. Si se desea, las formulaciones sólidas pueden incluir otros componentes, tales como agentes de carga y/o agentes de granulación, y similares. Los productos farmacéuticos según la presente invención se pueden formular de manera que proporcionen una liberación rápida, sostenida o retardada del principio activo tras la administración al paciente aplicando procedimientos bien conocidos en la técnica.

Para formar comprimidos para su administración oral, la composición de materia según la presente invención se puede preparar mediante un proceso de compresión directa. En dicho proceso, los principios activos del fármaco se pueden mezclar con un vehículo sólido pulverulento, como por ejemplo lactosa, sacarosa, sorbitol, manitol, almidón, amilopectina, derivados de celulosa o gelatina, y mezclas de los mismos, así como con un agente antifricción, como por ejemplo estearato de magnesio, estearato de calcio y ceras de polietilenglicol. A continuación, la mezcla se puede comprimir formando comprimidos mediante una máquina con los punzones y las matrices adecuados a fin de obtener el tamaño de comprimido deseado. Los parámetros de funcionamiento de la máquina pueden ser seleccionados por el experto. Alternativamente, los comprimidos para administración oral se pueden formar mediante un procedimiento de granulación húmeda. Los principios activos del fármaco se pueden mezclar con excipientes y/o diluyentes. Las sustancias sólidas se pueden moler o tamizar hasta el tamaño de partícula deseado. Se puede añadir al fármaco un agente aglutinante. Dicho aglutinante se puede suspender y homogeneizar en un disolvente adecuado. El principio activo y los agentes auxiliares también se pueden mezclar con la solución de agente aglutinante. La mezcla seca resultante se humedece homogéneamente con la solución. Habitualmente, esta humidificación hace que las partículas se agreguen ligeramente, y la masa resultante se comprime a través de un tamiz de acero inoxidable del tamaño deseado. A continuación, la mezcla se seca en unidades de secado controlado durante el periodo de tiempo necesario para alcanzar el tamaño de partícula y la consistencia deseados. Los gránulos de la mezcla seca se tamizan a fin de eliminar todo el polvo. A esta mezcla se le pueden añadir agentes de desintegración, antifricción y/o antiadherentes. Finalmente, la mezcla se comprime formando comprimidos mediante una máquina con los punzones y matrices adecuados a fin de obtener el tamaño de comprimido deseado. Los parámetros de funcionamiento de la máquina pueden ser seleccionados por el experto.

Si se desean comprimidos recubiertos, el núcleo preparado anteriormente se puede recubrir con una solución concentrada de azúcar o polímeros de celulosa, que pueden contener goma arábiga, gelatina, talco, dióxido de titanio, o con un barniz disuelto en un disolvente orgánico volátil o una mezcla de disolventes. A este recubrimiento se le pueden añadir diversos colorantes a fin de distinguir los comprimidos que contienen diferentes principios activos o que presentan una cantidad diferente de dicho principio activo. En una forma de realización particular, el principio activo puede estar presente en un núcleo rodeado por una o más capas, incluidas capas de recubrimiento entérico.

Se pueden preparar cápsulas de gelatina blanda que contienen una mezcla del principio activo y aceite vegetal. Las cápsulas de gelatina dura pueden contener gránulos del principio activo junto con un vehículo sólido pulverulento, como por ejemplo lactosa, sacarosa, sorbitol, manitol, almidón de patata, almidón de maíz, amilopectina, derivados de la celulosa y/o gelatina.

Las preparaciones líquidas para administración oral se pueden preparar en forma de jarabes o suspensiones, por ejemplo soluciones que contienen un principio activo, azúcar y una mezcla de etanol, agua, glicerol y propilenglicol. Si se desea, dichas preparaciones líquidas pueden comprender una o más sustancias de entre las siguientes: colorantes, aromatizantes y sacarina. También se pueden utilizar agentes espesantes, como la carboximetilcelulosa.

Si los fármacos anteriores se pretenden administrar por vía parenteral, la formulación puede comprender soluciones inyectables acuosas estériles, soluciones inyectables no acuosas, o ambas, que comprenden la composición de materia según la presente invención. Cuando se preparan soluciones inyectables acuosas, la composición de materia puede estar presente en forma de sal farmacéuticamente aceptable soluble en agua. Las preparaciones parenterales pueden contener antioxidantes, tampones, agentes bacteriostáticos y solutos que hacen que la formulación sea isotónica con la sangre del sujeto receptor. Las suspensiones estériles acuosas y no acuosas pueden contener agentes de suspensión y espesantes. Las formulaciones se pueden presentar en envases de dosis unitaria o dosis múltiples, por ejemplo, ampollas selladas y viales. Se pueden preparar soluciones y suspensiones inyectables en el momento de la administración a partir de polvos estériles, gránulos y comprimidos del tipo descrito anteriormente.

La composición de materia también se puede formular de tal modo que la misma sea adecuada para su administración tópica (por ejemplo, como crema para la piel). Estas formulaciones pueden contener diversos excipientes conocidos por los expertos en la materia. Entre los excipientes adecuados se encuentran, aunque sin limitarse a los mismos, ceras de ésteres cetílicos, alcohol cetílico, cera blanca, monoestearato de glicerilo, propilenglicol, monoestearato, estearato de metilo, alcohol bencílico, lauril sulfato de sodio, glicerina, aceite mineral, agua, carbómeros, alcohol etílico, adhesivos de acrilato, adhesivos de poliisobutileno y adhesivos de silicona.

Habiendo descrito la presente invención, a continuación se ilustra la misma haciendo referencia a algunos ejemplos proporcionados únicamente a título ilustrativo y no limitativo de la presente invención.

5

Ejemplos

La hipersecreción de mucinas en células NHBE conlleva la activación de PKC y PKG

10 Para determinar el posible papel de la PKC y/o la PKG en el proceso de secreción de mucinas, se expusieron células NHBE a los siguientes dos activadores específicos de proteína-cinasas: el éster de forbol 12-miristato-13-acetato de forbol (PMA) para la activación de PKC, y el análogo de GMPc 8-Br-GMPc no hidrolizable para la activación de PKG. Los estudios preliminares para examinar la secreción de mucinas en respuesta a la estimulación con PMA en varias concentraciones durante diferentes períodos de tiempo (hasta 1 μM durante 2 h) pusieron de
15 manifiesto que la activación únicamente de la PKC no inducía una secreción de mucinas significativa por parte de las células NHBE, a pesar de que se observó repetidamente una respuesta secretora moderada para concentraciones de PMA mayores de 100 nM ($0,05 < p < 0,1$). Además, las células no respondieron a los análogos de GMPc en concentraciones de hasta 500 μM durante hasta 2 h de exposición. Sin embargo, una combinación de PMA + 8-Br-GMPc, que provoca la doble activación de la PKC y la PKG, dio lugar a un rápido aumento de la secreción, que se duplicó al cabo de aproximadamente 15 min de exposición (figura 1A). Esta respuesta secretora
20 inducida por PMA + 8-Br-GMPc era dependiente de la concentración, con una estimulación máxima a 100 nM de PMA + 1 μM de 8-Br-GMPc (figuras 1B y 1C). En las figuras 1A, 1B y 1C, las células NHBE se expusieron al reactivo o reactivos indicados o únicamente al medio (CTL) durante 15 min. En la figura 1D, las células NHBE se preincubaron con el inhibidor indicado durante 15 min y a continuación se estimularon con UTP 100 μM durante 2 h. Las mucinas secretadas en respuesta al tratamiento se recogieron y se analizaron mediante ELISA. Los datos se indican como media \pm E.E. ($n = 6$ en cada punto). El * indica una diferencia significativa con respecto al medio de control ($p < 0,05$); # indica diferencia con respecto al medio de control ($0,05 < p < 0,1$); y \square indica una diferencia significativa con respecto a la estimulación con UTP ($p < 0,05$).

30 El UTP es un secretagogo de mucina bien definido y fisiopatológicamente significativo. Lethem y otros, Am. J. Respir. Cell Mot Biol. 9, 315-322 (1993). La presente invención también pone de manifiesto que el UTP, en diferentes concentraciones, preferentemente comprendidas entre 40 y 140 μM , puede inducir un aumento significativo de la secreción de mucinas por parte de las células NHBE tras una exposición de 2 h. Para determinar si la PKC y la PKG estaban implicadas en la regulación de la secreción de mucinas como respuesta a un estímulo fisiopatológico, se analizaron los efectos de los inhibidores de PKC/PKG sobre la secreción de mucinas inducida por UTP. Se preincubaron células NHBE con diversos inhibidores durante 15 min y a continuación se expusieron a UTP (100 μM) más el inhibidor durante 2 h. La mucina secretada se midió por ELISA. Los resultados indicaron que la secreción de mucina provocada por UTP puede requerir las actividades tanto de la PKC como de la PKG, dado que la respuesta secretora se vio atenuada independientemente por el inhibidor de la PKC calfofostina C (500 nM), el inhibidor de la PKG R_p-8-Br-PET-GMPc (10 μM) o el inhibidor de la guanidil-ciclasa soluble (GC-S) LY83583 (50 μM), pero probablemente no por el inhibidor de la proteína-cinasa A (PKA) KT5720 (500 nM) (figura 1D). Aparentemente, la secreción de mucinas en las células NHBE puede estar regulada por un mecanismo de señalización que involucra tanto a la PKC como a la PKG.

45 Para estudiar la participación de la PKG en el proceso de secreción, en estos estudios se utilizó S-Br-GMPc. Aunque el principal efecto fisiológico del 8-Br-GMPc consiste en activar la PKG, también se ha documentado que actúa como un agonista de los canales iónicos dependientes de GMPc en algunas células y, en concentraciones elevadas, activa la PKA. Para evitar la posibilidad de que los canales iónicos dependientes de GMPc y/o la PKA jueguen un papel en la secreción de mucinas por parte de las células NHBE, se utilizó como agonista R_p-8-Br-GMPc, un análogo único de GMPc que puede activar los canales iónicos dependientes de GMPc parecidos a 8-Br-OMPc y a la vez inhibir la actividad de la PKG, para distinguir los efectos de la PKG y los canales iónicos dependientes de GMPc sobre la liberación de mucinas. Tal como se ilustra en las figuras, particularmente en la figura 1A (columna 11), el R_p-8-Br-GMPc no hizo aumentar la secreción de mucinas cuando se añadió a las células con PMA. De forma similar, el inhibidor específico de la PKA, KT5720 (500 nM), no afectó a la secreción de mucinas inducida por PMA + 8-Br-GMPc o UTP (figura 1D, columna 4). Además, dado que la hipersecreción de mucinas inducida por UTP puede verse atenuada por el inhibidor LY83583 de la guanidil-ciclasa soluble (GC-S), es probable que la activación de la PKG tenga lugar a través de la vía de señalización del óxido nítrico (NO) \rightarrow GC-S \rightarrow GMPc \rightarrow PKG, tal como se ha descrito anteriormente en las células epiteliales traqueales diferenciadas de cobaya *in vitro*.

60 Considerando la participación de la PKC y la PKG en el proceso de secreción de mucinas, la presente invención analiza sustratos intracelulares potenciales de estas enzimas que podrían desempeñar un papel en la señalización de acontecimientos posteriores a la activación de las cinasas. Numerosos sustratos intracelulares pueden sufrir fosforilación por parte de PKC o PKG, y la fosforilación por parte de la PKC de uno de estos sustratos, la proteína MARCKS, parecía particularmente interesante. Se ha observado que la fosforilación de la MARCKS se relaciona con una serie de procesos celulares que implican la señalización de PKC y la contracción del citoesqueleto, tales como el movimiento celular, la mitogénesis y la liberación de transmisores neuronales. Dado que el proceso dinámico de
65

secreción requiere la activación de la cinasa y la translocación de gránulos intracelulares a la periferia de la célula, la MARCKS parecía un buen candidato para una molécula mediadora que conecta la activación de PKC/PKG y la exocitosis de gránulos de mucina.

5 La MARCKS es una molécula clave que relaciona la activación de PKC/PKG y la secreción de mucinas en las células NHBE

10 Para examinar el mecanismo de señalización posterior a la activación de la proteína-cinasa, se estudió la proteína MARCKS, un sustrato celular específico de la PKC que puede desempeñar un papel en la relación entre la activación de la cinasa y la liberación de gránulos. En primer lugar, se confirmó la presencia de MARCKS en las células NHBE por ensayo de inmunoprecipitación con marcaje de ácido [³H]-mirístico. Tal como se ilustra en la figura 2A, la MARCKS se expresaba en las células NHBE y la mayoría de dicha proteína se encontraba asociada a la membrana en condiciones de no estimulación. En la figura 2A, las células se marcaron con ácido [³H]-mirístico durante una noche y a continuación se aislaron las fracciones de membrana (carril 1) y de citosol (carril 2) por centrifugación diferencial. El papel de la MARCKS como componente regulador clave de la vía secretora de mucinas se puede demostrar de tres maneras diferentes.

20 Tal como se ha indicado anteriormente, la participación directa de la MARCKS en la secreción de mucinas por parte de las células NHBE se puede demostrar a través de tres líneas de demostración independientes. En primer lugar, la secreción de mucinas como respuesta a la estimulación por PMA + 8-Br-GMPc o UTP resultó inhibida de un modo dependiente de la concentración por el péptido MANS, que tenía una secuencia de aminoácidos idéntica a la región N-terminal de la MARCKS, mientras que el péptido de control correspondiente (RNS), que contenía la misma composición de aminoácidos pero dispuesta en un orden aleatorio, no afectó a la secreción. Es conocido que el dominio N-terminal miristilado de la MARCKS actúa como mediador en la asociación MARCKS-membrana. Tal como se indica en la figura 8, la MARCKS puede funcionar como un linker molecular mediante la interacción con las membranas de los gránulos en su dominio N-terminal y uniéndose a los filamentos de actina en su sitio PSD, fijando de este modo los gránulos al citoesqueleto contráctil para el movimiento y la exocitosis. La figura 8 muestra un posible mecanismo por el que un secretagogo de mucina interactúa con las células epiteliales (caliciformes) de las vías respiratorias y activa dos proteína-cinasas diferentes, la PKC y la PKG. La PKC activada fosforila la MARCKS, provocando su translocación desde la membrana plasmática al citoplasma, mientras que la PKG, que se activa a través de la vía del óxido nítrico (NO) GC-S GMPc PKG, activa una PP2A citoplasmática que desfosforila la MARCKS. Esta desfosforilación estabiliza la unión de la MARCKS a las membranas de los gránulos. Además, la MARCKS también interactúa con la actina y la miosina, enlazando así los gránulos al mecanismo celular contráctil para el movimiento y la liberación exocitósica posteriores. La unión de la MARCKS a los gránulos después de haberse liberado al citoplasma también puede estar guiada por proteínas específicas dirigidas u otras formas de interacción proteína-proteína en las que participa el dominio N-terminal de la MARCKS. En cualquier caso, el péptido MANS, o un fragmento activo del mismo que comprende como mínimo 6 aminoácidos, actúa inhibiendo competitivamente el direccionamiento de la MARCKS hacia las membranas de los gránulos de mucina, con lo que se bloquea la secreción.

40 Un segundo ensayo puso de manifiesto el efecto inhibitorio de un oligonucleótido antisentido específico a la MARCKS sobre la secreción de mucinas. Tal como se muestra en las figuras 3A-3C, el oligonucleótido antisentido hizo disminuir el ARNm de la MARCKS y los niveles de dicha proteína en las células NHBE, y atenuó significativamente la secreción de mucinas inducida por la activación de PKC/PKG. La inhibición no fue tan importante como la observada con el péptido MANS, lo que puede deberse a los elevados niveles de proteína MARCKS endógena en las células NHBE y a la vida media relativamente prolongada del ARNm de la MARCKS ($t_{1/2} = 4-6$ h). En las figuras 3A-3C, las células NHBE se trataron con el oligonucleótido antisentido o de control durante 3 días y a continuación se estimularon con PMA (100 nM) + 8-Br-GMPc (1 μ M) durante 15 min. La secreción de mucinas se analizó por ELISA. Se aislaron el ARN y las proteínas totales de las células tratadas. El ARNm de MARCKS se determinó mediante hibridación de tipo Northern y la proteína mediante Transferencia Western. En la figura 3A con PMA (100 nM) + 8-Br-GMPc (1 μ M) se muestra una Transferencia Northern que puso de manifiesto una disminución del -15% del ARNm de MARCKS en comparación con los controles mostrados en el gráfico adjunto; la figura 3B es una Transferencia Western que puso de manifiesto una disminución del -30% en proteína MARCKS en el gráfico adjunto; y la figura 3C muestra que la hipersecreción de mucinas se vio atenuada significativamente por el oligonucleótido antisentido, mientras que el oligonucleótido de control no tuvo ningún efecto. Los datos se indican como media \pm E.E. (n = 6 en cada punto), donde * indica una diferencia significativa con respecto al medio de control (p < 0,05); y donde \dagger indica una diferencia significativa con respecto a la estimulación con PMA + 8-Br-GMPc (p < 0,05.). Además, cabe puntualizar que el término CTO se refiere al oligonucleótido de control, mientras que el término ASO se refiere al oligonucleótido antisentido.

60 Se ha demostrado que los oligonucleótidos antisentido que son complementarios a ARN específicos pueden inhibir la expresión de genes celulares como proteínas. Véase Erickson e Izant, Gene Regulation: Biology Of Antisense RNA And DNA, Vol. 1, Raven Press, Nueva York, 1992. Por ejemplo, se ha documentado la inhibición selectiva de un gen p21 que difiere de un gen normal en un único nucleótido. Chang y otros, Biochemistry 1991,30: 8283-8286. Se han propuesto muchas hipótesis para explicar los mecanismos a través de los cuales los oligonucleótidos antisentido inhiben la expresión de genes. Sin embargo, el mecanismo específico involucrado puede depender del

tipo de célula estudiada, del ARN diana, del sitio diana específico sobre el ARN y de la naturaleza química del oligonucleótido. Chiang y otros, *J Biol. Chem.* 1991, 266:18162-18171; Stein y Cohen, *Cancer Res.* 1988, 48:2659-2668.

5 Un tercer experimento puso de manifiesto que la transfección de células HBE1 con una MARCKS mutante con eliminación de PSD dio lugar a una inhibición significativa de la secreción de mucinas inducida por la activación de PKC/PKG. Se cree que la eliminación de PSD anula la capacidad de la MARCKS de unirse a la actina. Tal como se indica en la figura 8, podría ser que, al competir con la MARCKS nativa para unirse a la membrana de los gránulos, la MARCKS troncada por eliminación de PSD inhiba la liberación de gránulos, ya que es incapaz de interactuar con los filamentos de actina. La transfección de estas células con el ADNc de MARCKS de tipo salvaje no potenció la secreción de mucinas. El ensayo de Transferencia Western puso de manifiesto que el nivel de expresión de la MARCKS endógena en las células HBE1 era bastante elevado, comparable con el de las células NHBE, y la transfección de ADNc de MARCKS de tipo salvaje no dio lugar a ningún incremento notable en el nivel total de proteína MARCKS en estas células. Este hecho puede explicar por qué la transfección con MARCKS de tipo salvaje no hizo aumentar la secreción y también por qué la transfección con MARCKS con el PSD eliminado inhibió sólo parcialmente la secreción de mucinas.

Estudios de bloqueo mediante péptidos-- Se preincubaron células NHBE con el péptido MANS o el péptido RNS (1-100 μ M) durante 15 min, a continuación se añadió PMA (100 nM) + 8-Br-GMPc (1 μ M) o UTP (100 μ M) y las células se incubaron durante otros 15 min o 2 h, respectivamente. La secreción de mucinas se midió por ELISA. Tal como se muestra en la figura 2B, la incubación de las células NHBE con el péptido MANS dio lugar a una supresión dependiente de la concentración de la secreción de mucinas en respuesta a la activación de PKC/PKG o la estimulación de UTP, mientras que el péptido de control (RNS) no afectó a la secreción en estas mismas concentraciones. En la figura 2B, el péptido MANS bloquea la hipersecreción de mucinas inducida por PMA + 8-Br-GMPc o UTP de un modo dependiente de la concentración. Las células NHBE se preincubaron con el péptido indicado durante 15 min y a continuación se expusieron a PMA (100 μ M) + 8-Br-GMPc (1 μ M) durante 15 minutos o UTP (100 μ M) durante 2 h. La secreción de mucinas se midió por ELISA. Los datos se indican como media \pm E.E. (n = 6 en cada punto), donde * indica una diferencia significativa con respecto al medio de control (p < 0,05); † indica una diferencia significativa con respecto a la estimulación con PMA + 8-Br-GMPc (p < 0,05); y ‡ se refiere a una diferencia significativa con respecto a la estimulación con UTP (p < 0,05). Probablemente, los efectos del péptido MANS no estaban relacionados con la citotoxicidad o la inhibición general de la actividad metabólica celular, ya que ni el péptido MANS ni el péptido RNS alteraron la liberación de lactato-deshidrogenasa o la absorción de [³H]-desoxiglucosa por parte de las células.

Estudios de oligonucleótidos antisentido-- Para demostrar aún más que la MARCKS es un componente clave de señalización de la vía secretora de mucinas, se estudió el efecto de un oligonucleótido antisentido dirigido contra la MARCKS sobre la secreción de mucinas. Tal como se ilustra en la figura 3, este oligonucleótido antisentido hizo disminuir los niveles de ARNm y de proteínas de la MARCKS en las células NHBE y atenuó significativamente la secreción de mucinas inducida por PMA + 8-Br-GMPc, mientras que el oligonucleótido de control no tuvo ningún efecto.

La MARCKS actúa como una molécula de señalización convergente que ejerce de intermediario de la interferencia de las vías de PKC y PKG

En conjunto, los resultados anteriores pusieron de manifiesto que la MARCKS participaba íntegramente en el proceso de secreción de mucinas. A continuación, se estudió cómo actúa la MARCKS como molécula reguladora clave sobre la que convergen PKC y PKG para regular la secreción de mucinas. Tal como se ilustra en la figura 5, la MARCKS se fosforiló mediante PKC y en consecuencia se translocó desde la membrana hasta el citoplasma. La PKG parecía inducir la desfosforilación de la MARCKS (figura 5A, carril 4, y figura 5B). Esta desfosforilación se invirtió mediante el inhibidor de la PKG Rp-8-Br-PET-GMPc (figura 5A, carril 5), lo que indica que la desfosforilación fue específicamente dependiente de PKG. En la figura 5, las células NHBE se marcaron con [³²P]-ortofosfato y se expusieron a los reactivos indicados. La fosforilación de la MARCKS como respuesta a los tratamientos se evaluó mediante un ensayo de inmunoprecipitación. En la figura 5A, 8-Br-GMPc invirtió la fosforilación de la MARCKS inducida por PMA, y este efecto de 8-Br-GMPc se pudo bloquear por Rp-8-Br-PET-GMPc (inhibidor de PKG) o ácido ocadaico (inhibidor de PP1/2A). Para la figura 5B, la fosforilación de la MARCKS inducida por PMA se invirtió mediante una exposición posterior de las células 8-Br-GMPc. Carril 1, únicamente medio durante 8 minutos; carril 2, PMA 100 nM durante 3 minutos; carril 3, PMA 100 nM durante 3 minutos y a continuación con 8-Br-OMPC durante 5 minutos; carril 4, PMA 100 nM durante 8 minutos; carril 5, únicamente medio durante 3 min y a continuación PMA 100 nM + 8-Br-GMPc 1 μ M durante 5 min. En la figura 5C, la desfosforilación de la MARCKS inducida por 8-Br-GMPc resultó atenuada por fostriecina de un modo dependiente de la concentración.

Se cree que la PKG actúa desfosforilando la MARCKS a través de la activación de una proteína-fosfatasa. Tal como se ilustra en la figura 5A (carril 6), el ácido ocadaico a razón de 500 nM, una concentración que podría inhibir la PP1 y la PP2A, bloqueó la desfosforilación de la MARCKS inducida por PKG, lo que sugiere que la PKG provoca la desfosforilación mediante la activación de PP1 y/o PP2A. Los estudios adicionales con fostriecina y la evaluación por ensayo directo de las actividades de la fosfatasa indicaron que la PKG activa únicamente la PP2A y es responsable

de la eliminación de los grupos fosfato de la MARCKS (figura 5C). Es probable que el ácido ocadaico o la fostriecina, en concentraciones que inhibían la desfosforilación de la MARCKS inducida por PKG, atenuaran la secreción de mucinas inducida por PMA + 8-Br-GMPc o UTP, tal como se muestra en la figura 6. La figura 6 contribuye a demostrar que la PP2A es un componente esencial de la vía secretora de las mucinas. Se preincubaron células NHBE con la concentración indicada de fostriecina, ácido ocadaico (500 nM) o medio solo durante 15 min y a continuación se estimularon con PMA (100 nM) + 8-Br-GMPc (1 μ M) durante 15 min o con UTP (100 μ M) durante 2 h. La mucina secretada se midió por ELISA. Los datos se indican como media \pm E.E. (n = 6 en cada punto), donde * indica una diferencia significativa con respecto al medio de control (p < 0,05); † indica una diferencia significativa con respecto a la estimulación con PMA + 8-Br-GMPc (p < 0,05); y ‡ se refiere a una diferencia significativa con respecto a la estimulación con UTP (p < 0,05). Por lo tanto, la desfosforilación de la MARCKS por parte de una PP2A activada por PKG parece ser un componente esencial de la vía de señalización que conduce a la exocitosis de gránulos de mucina.

Para desvelar los acontecimientos moleculares a través de los cuales la MARCKS enlaza la activación de cinasas con la secreción de mucinas, se investigó a fondo la fosforilación de la MARCKS en respuesta a la activación de PKC/PKG. Tal como se ilustra en la figura 4A, probablemente el PMA (100 nM) indujo un aumento significativo (3-4 veces) en la fosforilación de la MARCKS en las células NHBE, y dicha fosforilación se vio atenuada por el inhibidor de PKC callostina C (500 nM). Una vez fosforilada, la MARCKS se translocó desde la membrana plasmática al citoplasma (figura 4B). Más específicamente, la figura 4A pone de manifiesto que la activación de la PKC provoca la fosforilación de la MARCKS en las células NHBE. Las células se marcaron con [³²P]-ortofosfato durante 2 h y a continuación se expusieron a los reactivos de estimulación y/o inhibición. La fosforilación de la MARCKS en respuesta a los tratamientos se evaluó mediante inmunoprecipitación, tal como se describe. Carril 1, medio de control; carril 2, el vehículo, Me₂SO 0,1%; carril 3, 4 α -PMA 100 nM; carril 4, PMA 100 nM; carril 5, PMA 100 nM + callostina C 500 nM; carril 6, callostina C 500 nM; La figura 4B pone de manifiesto que la MARCKS fosforilada se transloca desde la membrana plasmática al citoplasma. Se expusieron células marcadas con ³²P a PMA (100 nM) o a medio solo durante 5 min y a continuación se aislaron las fracciones de membrana y citosol. La activación de la PKG por 8-Br-GMPc (1 μ M), otro acontecimiento de activación de cinasas necesario para provocar la secreción de mucinas, no dio lugar a la fosforilación de la MARCKS, sino que, de hecho, se observó el efecto opuesto: la fosforilación de la MARCKS inducida por el PMA se vio invertida por 8-Br-GMPc (figura 5A). Este efecto de 8-Br-GMPc no se debió a la eliminación de la actividad de la PKC, dado que la fosforilación inducida por PMA se pudo invertir mediante la adición posterior de 8-Br-GMPc a las células (figura 5B). Por lo tanto, es probable que la activación de la PKG dé lugar a la desfosforilación de la MARCKS.

La investigación posterior puso de manifiesto que la desfosforilación de la MARCKS inducida por PKG resultó bloqueada por la presencia de ácido ocadaico 500 nM, un inhibidor de la proteína-fosfatasa (tipo 1 y/o 2A (PP1/2A)) (figura 5A, carril 6). Por lo tanto, se puso de manifiesto que la desfosforilación estaba mediada por PP1 y/o PP2A. Para definir el subtipo de proteína-fosfatasa involucrada, se utilizó un inhibidor de PP2A novedoso y más específico, la fostriecina (IC₅₀ = 3,2 nM), en estudios adicionales de fosforilación. Tal como se ilustra en la figura 5C, la fostriecina inhibió la desfosforilación de la MARCKS inducida por PKG de un modo dependiente de la concentración (1-500 nM), lo que sugiere que la PKG induce la desfosforilación mediante la activación de PP2A. Para confirmar la activación adicional de la PP2A por parte de la PKG en las células NHBE, se determinaron las actividades de PP1 y PP2A citosólicas tras la exposición de las células a 8-Br-GMPc. La actividad de la PP2A aumentó aproximadamente 3 veces (de 0,1 a 0,3 nmol/min/mg de proteínas, p < 0,01) para concentraciones de 8-Br-GMPc de sólo 0,1 μ M, mientras que la actividad de PP1 permaneció constante. Estos datos indican que la PP2A puede ser activada por la PKG y es responsable de la desfosforilación de la MARCKS. En consecuencia, la actividad de la PP2A parece fundamental para que tenga lugar la secreción de mucinas; cuando la desfosforilación de la MARCKS inducida por PKG se bloqueó mediante ácido ocadaico o fostriecina, mejoró la respuesta secretora a la activación de PKC/PKG o la estimulación de UTP (figura 6).

La MARCKS se asocia con la actina y la miosina en el citoplasma

La figura 7 representa un ensayo de inmunoprecipitación con radiomarcación que pone de manifiesto que la MARCKS puede asociarse con otras dos proteínas (~200 y ~40 kDa) en el citoplasma. En la figura 7, se marcaron células NHBE con [³H]-leucina y [³H]-prolina durante una noche y las fracciones de membrana y citosol se prepararon tal como se describe en "Experimental Procedures". Las fracciones aisladas se preclarificaron con el anticuerpo de control no inmune (6F6). A continuación, el citosol se dividió en dos fracciones iguales y se utilizó para llevar a cabo la inmunoprecipitación en presencia de 10 g de citocalasina D (Biomol, Plymouth Meeting, Pensilvania) con el anticuerpo anti-MARCKS 2F12 (carril 2) y el anticuerpo de control no inmune 6F6 (carril 3), respectivamente. La proteína MARCKS presente en la fracción de membrana también se evaluó por inmunoprecipitación con el anticuerpo 2F12 (carril 1). El complejo de proteína precipitado se separó mediante electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS 8% y se visualizó por autorradiografía mejorada. La MARCKS parecía asociarse con dos proteínas citoplasmáticas con masas moleculares de ~200 y ~40 kDa, respectivamente. Estas dos proteínas asociadas a MARCKS se extrajeron del gel y se analizaron por desorción/ionización láser asistida por matriz/espectrometría de masas de tiempo de vuelo/secuenciación interna (Protein/DNA Technology Center of Rockefeller University, Nueva York). Los datos de masa y secuencia de péptidos obtenidos se utilizaron para buscar en bases de datos de proteínas mediante los programas de Internet ProFound y MS-Fit. Los resultados indican que

se trata de miosina (cadena pesada, no muscular de tipo A) y actina, respectivamente. El análisis por desorción/ionización láser asistida por matriz/espectrometría de masas de tiempo de vuelo/secuenciación interna indica que estas dos proteínas asociadas a MARCKS eran miosina (cadena pesada, no muscular de tipo A) y actina, respectivamente.

Estos estudios sugieren un nuevo paradigma para el mecanismo de señalización que controla la secreción exocitótica de los gránulos de mucina de las vías respiratorias, además de proporcionar lo que se cree que es la primera prueba directa que demuestra una función biológica específica de la MARCKS en un proceso fisiológico. La MARCKS actúa como una molécula mediadora clave que regula la liberación de gránulos de mucina en las células epiteliales respiratorias humanas. Se cree que el desencadenamiento de la secreción de mucinas en las vías respiratorias requiere la doble activación y la acción sinérgica de la PKC y la PKG. La PKC activada fosforila la MARCKS, lo que resulta en la translocación de la misma desde la cara interna de la membrana plasmática al citoplasma. A su vez, la activación de la PKG activa la PP2A, que desfosforila la MARCKS presente en el citoplasma. Dado que la capacidad de asociación a la membrana de la MARCKS depende de su estado de fosforilación, esta desfosforilación puede permitir que la MARCKS recupere su capacidad de unión a la membrana y le puede conferir capacidad para unirse a las membranas de los gránulos de mucina citoplasmáticos. Además, mediante la interacción con la actina y la miosina del citoplasma (figura 7), la MARCKS puede fijar los gránulos al aparato celular contráctil, actuando como mediador en el movimiento de los mismos hacia la periferia de la célula y la posterior liberación exocitótica. La amplia distribución de la MARCKS sugiere la posibilidad de que este mecanismo, o uno parecido, pueda regular la secreción de los gránulos unidos a la membrana en diversos tipos de células en condiciones normales o patológicas.

También está previsto un nuevo método para bloquear cualquier proceso de secreción celular, particularmente los que liberan mediadores de la inflamación desde las células inflamatorias, cuyas vías de estimulación implican la proteína MARCKS, sustrato de la proteína-quinasa C (PKC), y la liberación del contenido de las vesículas unidas a la membrana. Particularmente, se ha puesto de manifiesto que la liberación estimulada del mediador de la inflamación mieloperoxidasa de neutrófilos humanos (figura 9) o caninos (figura 10) se puede bloquear de un modo dependiente de la concentración mediante el péptido MANS. Particularmente, la figura 9 muestra neutrófilos aislados que fueron estimulados para segregar mieloperoxidasa (MPO) con PMA 100 nM y 8-Br-GMPc 101 μ M. El péptido MANS 100 μ M hizo disminuir la secreción de MPO a niveles de control (* = $p < 0,05$). El péptido MANS 10 μ M provoca una ligera disminución de la secreción de MPO. Un péptido de control (RNS) 10 o 100 μ M no tiene ningún efecto sobre la secreción de MPO. En la figura 10, se estimularon neutrófilos aislados para segregar mieloperoxidasa (MPO) con PMA 100 nM y 8-Br-GMPc 10 μ M. el péptido MANS 100 μ M hizo disminuir la secreción de MPO a niveles de control (* = $p < 0,05$). El péptido MANS 10 μ M provoca una ligera disminución de la secreción de MPO. Un péptido de control (RNS) 10 o 100 μ M no tiene ningún efecto sobre la secreción de MPO. De este modo, el péptido se puede utilizar terapéuticamente para bloquear la liberación de mediadores de la inflamación secretados mediante la infiltración de células inflamatorias en los tejidos. Muchos de estos mediadores liberados son responsables del extenso daño tisular observado en diversas enfermedades inflamatorias crónicas (por ejemplo, enfermedades respiratorias como el asma, la bronquitis crónica y la EPOC, enfermedades intestinales inflamatorias como la colitis ulcerosa y la enfermedad de Crohn, enfermedades autoinmunitarias, enfermedades de la piel como rosácea, eccema y acné grave, síndromes artríticos y de dolor como la artritis reumatoide y la fibromialgia). La presente invención puede resultar útil para tratar enfermedades como la artritis, la bronquitis crónica, la EPOC y la fibrosis quística. Del mismo modo, la presente invención resulta útil para el tratamiento de enfermedades humanas y animales, particularmente aquellas que afectan a equinos, caninos, felinos y otros animales domésticos.

Las figuras 11-15 muestran la secreción de MPO para los seres humanos y los caninos. En todos estos experimentos, los neutrófilos aislados fueron estimulados con LPS en una concentración de 1×10^{-6} M durante 10 minutos a 37°C antes de añadir los estímulos, tal como se indica en las figuras. El LPS prepara las células para que puedan responder a un secretagogo.

Métodos y materiales

Cultivo de células NHBE-- Se llevó a cabo la expansión, crioconservación y cultivo de células NHBE en la interfase aire/líquido tal como se ha descrito anteriormente. Véase Krunkosky y otros. En resumen, se diseminaron células NHBE (Clonetics, San Diego, California) en recipientes de cultivo de tejidos T75 con válvulas (500 células/cm²) y se cultivaron hasta que las células alcanzaron un 75-80% de confluencia. A continuación, las células se disociaron con tripsina/EDTA y se congelaron como paso 2. Se inició el cultivo en interfase aire/líquido inseminando las células del paso 2 (2×10^4 células/cm²) en placas de cultivo Transwell® (Costar, Cambridge, Massachusetts) finamente recubiertas con colágeno de cola de rata de tipo 1 (Collaborative Biomedical, Bedford, Massachusetts.) Las células se cultivaron sumergidas en medio en un aire con una humedad del 95% y un entorno del 5% de CO₂ durante 5-7 días hasta casi alcanzar la confluencia. En este momento, se creó la interfase aire/líquido eliminando el medio apical y alimentando las células en forma basal-lateral. Posteriormente, el medio se renovó diariamente. Las células se cultivaron durante 14 días adicionales para permitir la diferenciación completa.

Medición de la secreción de mucinas por ELISA-- Antes de la recogida de las muestras de mucina de "línea base" y "ensayo", la mucosidad acumulada en la superficie apical de las células se extrajo lavando con solución salina

tamponada con fosfato a pH, 7,2. Para recoger la secreción de línea base, las células se incubaron únicamente con medio y la mucina secretada en el medio apical se recogió y reservó. Las células se dejaron reposar durante 24 h y a continuación se expusieron a un medio que contenía los reactivos estimulantes y/o inhibidores seleccionados (o los controles adecuados), tras lo cual se recogió la mucina secretada y se reservó como muestra de ensayo. Los tiempos de incubación para la línea base y el ensayo fueron los mismos pero variaron en función del reactivo de ensayo utilizado. Se analizaron las secreciones de línea base y de ensayo por ELISA usando un método de captura de anticuerpos conocido en la técnica. Véase, por ejemplo, Harlow y otros, *Antibodies: A Laboratory Manual*, pp. 570-573, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, Nueva York (1988). El anticuerpo primario para este ensayo fue 17Q2 (Babco, Richmond, California), un anticuerpo monoclonal que reacciona específicamente con un epítipo de carbohidratos en las mucinas de las vías respiratorias humanas. La proporción de mucina de ensayo/línea base, parecida a un "índice de secreción", se utilizó para cuantificar la secreción de mucinas, permitiendo que cada plato de cultivo actuara como su propio control y, de este modo, minimizando la desviación provocada por la variabilidad entre los pocillos de cultivo. Wright y otros, *Am. J. Physiol.* 271, L854-L861 (1996). Los niveles de secreción de mucina se indicaron como porcentaje del control medio.

Ensayo de inmunoprecipitación con radiomarcación-- Al utilizar marcación con [³²P]-fosfato, las células se preincubaron durante 2 h en medio de Eagle modificado sin fosfato de Dulbecco que contenía un 0,2% de seroalbúmina bovina y a continuación se marcó con 0,1 mCi/ml de [³²P]-ortofosfato (9.000 Ci/mmol, PerkinElmer Life Sciences) durante 2 h. Para la marcación con ácido [³H]-mirístico o ³H-aminoácidos, las células se incubaron durante una noche en un medio que contenía 50 µCi/ml de ácido [³H]-mirístico (49 Ci/mmol, PerkinElmer Life Sciences) o 0,2 mCi/ml de [³H]-leucina (159 Ci/mmol, PerkinElmer Life Sciences), además de 0,4 mCi/ml de [³H]-prolina (100 Ci/mmol, PerkinElmer Life Sciences). Después de la marcación, las células se expusieron a reactivos estimulantes durante 5 min. Cuando se utilizó un inhibidor, las células se preincubaron con el inhibidor durante 15 min antes de la estimulación. Al final de los tratamientos, las células se lisaron en un tampón que contenía Tris-HCl 50 mM (pH 7,5), NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, 10% de glicerol, 1% de Nonidet P-40, fluoruro de fenilmetilsulfonilo 1 mM, benzamidina 1 mM, 10 µg/ml de pepstatina A y 101 µg/ml de leupeptina. La precipitación con ácido tricloroacético y el recuento de centelleo pueden determinar la eficiencia de radiomarcación en cada cultivo. La inmunoprecipitación de la proteína MARCKS se llevó a cabo según el método de Spizz y Blackshear utilizando lisados celulares que contenían idénticos recuentos/min. Spizz y otros, *J. Biol. Chem.* 271, 553562 (1996). Las proteínas precipitadas se separaron por electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS 8% y se visualizaron por autorradiografía mejorada. En este ensayo se utilizaron anticuerpos anti-MARCKS humanos (2m) y anticuerpos de control no inmunes (6F6).

Para evaluar los complejos proteínicos de MARCKS o asociados a MARCKS en las diferentes fracciones subcelulares, las células radiomarcadas y tratadas se introdujeron en un tampón de homogeneización (Tris-HCl 50 mM (pH 7,5), NaCl 10 mM, EDTA 1 mM, fluoruro de fenilmetilsulfonilo 1 mM, benzamidina 1 mM, pepstatina A 10 µg/ml, leupeptina 10 µg/ml) y a continuación se rompieron mediante cavitación con nitrógeno (800 libras/pulgada cuadrada durante 20 min a 4°C). Los lisados celulares se centrifugaron a 600 x g durante 10 min a 4°C a fin de eliminar los núcleos y las células sin romper. Los sobrenadantes posnucleares se separaron en fracciones de membrana y de citosol por ultracentrifugación a 400.000 x g durante 30 min a 4°C. El comprimido de membrana se disolvió en el tampón de lisis por sonicación. A continuación se llevó a cabo una inmunoprecipitación tal como se ha descrito anteriormente.

Péptidos relacionados con MARCKS - Los péptidos de secuencia miristilada N-terminal (MANS) y secuencia aleatoria N-terminal (RNS) se sintetizaron en Genemed Synthesis, Inc. (San Francisco, California), a continuación se purificaron mediante cromatografía líquida de alta presión (> 95% de pureza) y se confirmó su presencia por espectroscopia de masas, mostrando cada uno de ellos un único pico con una masa molecular apropiada. El péptido MANS consistía en una secuencia idéntica a los primeros 24 aminoácidos de la MARCKS, es decir, la región miristilada N-terminal que actúa de mediador en la inserción de la MARCKS en las membranas, MA-GAQFSKTAAKGEEAAERPGEAAVA (SEC ID nº 1 (donde MA = cadena de miristato N-terminal). El péptido de control correspondiente (RNS) contenía la misma composición de aminoácidos que el MANS, pero dispuestos en orden aleatorio, MA-GTAPAAEGAGAEVKRASAEAKQAF (SEC ID nº 2). La presencia del resto de miristato hidrófobo en estos péptidos sintéticos aumenta su permeabilidad a las membranas plasmáticas, permitiendo que los péptidos sean absorbidos fácilmente por las células. Para determinar los efectos de estos péptidos sobre la secreción de mucinas, las células se preincubaron con los péptidos durante 15 min antes de la adición de secretagogos y a continuación se midió la secreción de mucinas por ELISA.

Oligonucleótidos antisentido-- Se sintetizaron el oligonucleótido antisentido de MARCKS y su correspondiente oligonucleótido de control en Biognostik GmbH (Göttingen, Alemania). Las células NHBE se trataron con oligonucleótido antisentido o de control 5 µM apicalmente durante 3 días (en presencia de lipofectina 21 µg/ml durante las primeras 24 h). A continuación, las células se incubaron con secretagogos y se midió la secreción de mucinas por ELISA. Se aislaron el ARN y las proteínas totales de las células tratadas. El ARNm de MARCKS se analizó mediante hibridación de tipo Northern según los procedimientos convencionales utilizando ADNc humano de MARCKS como sonda. El nivel de proteína MARCKS se determinó mediante Transferencia Western utilizando IgG1 anti-MARCKS (clon 2F12) purificada como anticuerpo de detección primario.

- 5 Transfección transitoria-- El dominio del sitio de fosforilación (PSD) de MARCKS contiene los sitios de fosforilación dependiente de la PKC y el sitio de unión al filamento de actina. Para construir un ADN ambiental de MARCKS con el PSD eliminado, se generaron dos fragmentos que flanquean la secuencia del PSD (que codifica 25 aminoácidos) mediante reacción en cadena de la polimerasa y a continuación se ligaron a través del sitio XhoI enlazado a los extremos 5' de los cebadores oligonucleótidos diseñados para la reacción en cadena de la polimerasa. El ADN mutante resultante y el ADN de MARCKS de tipo salvaje se insertaron respectivamente en un vector de expresión de mamíferos pADNc4/TO (Invitrogen, Carlsbad, California). Las construcciones recombinantes aisladas se confirmaron por digestión con enzimas de restricción y secuenciación del ADN.
- 10 La HBE 1 es una línea celular del epitelio bronquial humano transformada por el virus del papiloma puede llevar a cabo secreción de mucinas cuando se cultiva en una interfase aire/líquido. La transfección de células HBE 1 se llevó a cabo utilizando el reactivo de transfección Effectene (Qiagen, Valencia, California) según las instrucciones del fabricante. En resumen, se disociaron las células HBE1 diferenciadas cultivadas en interfase aire/líquido con tripsina-EDTA y se volvieron a sembrar en placas de cultivo de 12 pocillos a razón de 1×10^5 células/cm². Después de incubarlas una noche, las células se transfectaron con el ADN de MARCKS de tipo salvaje, el ADN de MARCKS truncado por el PSD o el ADN del vector. Las células se cultivaron durante 48 h para permitir la expresión de genes, a continuación se expusieron a secretagogos y la secreción de mucinas se midió por ELISA. Todas las transfecciones se llevaron a cabo en presencia del plásmido pADNe4/TO/lacZ (Invitrogen) (relación de ADN 6:1, total 1 µg de ADN, relación de ADN con respecto a Effectene = 1:25) para controlar las variaciones en la eficiencia de transfección. Los resultados no mostraron diferencias significativas en las actividades de β-galactosidasa en lisados celulares aislados de las células transfectadas, lo que indica una eficiencia de transfección parecida entre las diferentes construcciones de ADN (datos no mostrados).
- 15
- 20
- 25 Ensayo de actividad de proteína-fosfatasa-- Se midieron las actividades de PP1 y PP2A utilizando un sistema de ensayo de proteína-fosfatasa (Life Technologies, Inc.) conocido en la técnica ligeramente modificado. Huang y otros, Adv. Exp. Med. Biol. 396, 209-215 (1996). En resumen, se trataron células NHBE con 8-Br-GMPc o medio solo durante 5 min. A continuación, las células se introdujeron en un tampón de lisis (Tris-HCl 50 mM (pH 7,4), 0,1% de β-mecaptoetanol, EDTA 0,1 mM, benzamidina 1 mM, pepstatina A 10 µg/ml, leupeptina 10 µg/ml) y se rompieron por sonicación durante 20 s a 4°C. Los lisados celulares se centrifugaron y los sobrenadantes se reservaron para el ensayo de actividad de la fosfatasa. El ensayo se llevó a cabo utilizando fosforilasa A marcada con ³²P como sustrato. El ³²Pi liberado se cuantificó por recuento de centelleo. La concentración de proteína de cada muestra se determinó mediante el ensayo de Bradford. La actividad de PP2A se expresó como la actividad total de fosfatasa de la muestra menos la actividad restante en presencia de ácido ocaidaico 1 nM. La actividad de PP1 se expresó como la diferencia entre las actividades restantes en presencia de ácido ocaidaico 1 nM y 1 µM, respectivamente. Las actividades de la proteína-fosfatasa se indicaron como nmoles de Pi liberado por min/mg de proteína total.
- 30
- 35
- 40 Ensayo de citotoxicidad-- Se examinó la citotoxicidad de todos los reactivos utilizados en el tratamiento de las células NHBE mediante la medición de la liberación total de lactato-deshidrogenasa de las células. El ensayo se llevó a cabo utilizando el kit Promega Cytotox 96 según las instrucciones del fabricante. Todos los experimentos se llevaron a cabo con los reactivos en concentraciones no citotóxicas.
- 45
- 50
- 55 Análisis estadístico-- Se analizó la significancia de los datos mediante un análisis de varianza simple aplicando las correcciones de Bonferroni. Las diferencias entre los tratamientos se consideraron significativas para $p < 0,05$.
- 60 Aislamiento de PMN de sangre canina-- Las etapas que se deben seguir para el aislamiento de PMN incluyen la toma de 10 ml de sangre con anticoagulante ACD. A continuación se esparcieron 5 ml sobre 3,5 ml de medio de aislamiento de PMN garantizando que dicho medio de aislamiento (IM) se encontraba a temperatura ambiente (RI). A continuación, la sangre se centrifugó a temperatura ambiente durante 30 min, 550 x g a 1.700 rpm. La banda inferior blanca se transfirió a un tubo de centrífuga cónico (CCFT) de 15 ml. A continuación, se añadió 2V HESS con un 10% de suero fetal bovino (PBS) y se centrifugó a temperatura ambiente durante 10 min, 400 x g a 1.400 rpm. A continuación, el comprimido se volvió a suspender en 5 ml de HESS con PBS. La suspensión celular se añadió a un CCFT de 50 ml que contenía 20 ml de NH₄Cl al 0,88% enfriado con hielo y se invirtió dos o tres veces. El producto resultante se centrifugó durante 10 min, 800 x g a 2.000 rpm, a continuación se aspiró y se volvió a suspender en 5 ml de HESS con FBS. La preparación se examinó mediante recuento y citospina y, para sangre completa, el número de células debe estar comprendido preferentemente entre 10^9 y 10^{11} células y, para los PMN, el número de células debe estar comprendido entre 2 y 4×10^7 células. Véase de forma general Wang y otros, J. Immunol., "Neutrophil-induced changes in the biomechanical properties of endothelial cells: roles of ICAM-1 and reactive oxygen species", 648794 (2000).
- 60
- 65 Ensayo enzimático colorimétrico de MPO-- Se analizó la actividad de MPO de las muestras en placas de microtitulación de fondo redondo de 96 pocillos utilizando un kit ELISA sándwich (R & D Systems, Minneapolis, Minnesota). En resumen, se mezclan 20 microlitros de muestra con 180 microlitros de mezcla de sustrato que contiene fosfato de potasio 33 mM, pH 6,0, un 0,56% de Triton X-100, peróxido de hidrógeno 0,11 mM y diclorhidrato de o-dianisidina 0,36 mM en un pocillo de microtitulación individual. Las concentraciones finales de la mezcla de ensayo son las siguientes: fosfato de potasio 30 mM, pH 6,0, 0,05% de Triton X-100, peróxido de hidrógeno 0,1 mM y diclorhidrato de o-dianisidina 0,32 mM. Después de mezclar, la mezcla de ensayo se incubó a temperatura

ambiente durante 5 minutos y la actividad de la enzima MPO se determinó por espectrofotometría a 550 nanómetros. Las muestras se analizaron por duplicado.

5 Los ejemplos anteriores son ilustrativos de la presente invención y no limitativos de la misma. La presente invención se define mediante las reivindicaciones siguientes, y en la misma resultan incluidos los equivalentes de dichas reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Péptido MANS que presenta la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 1, o fragmento activo del mismo, para su utilización en el tratamiento de la artritis.
2. Péptido MANS o fragmento activo del mismo según la reivindicación 1, en el que dicha artritis es la artrosis o la artritis reumatoide.
- 10 3. Utilización de un péptido MANS que presenta la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 1, o fragmento activo del mismo, para la preparación de un medicamento para tratar la artritis.
4. Utilización de un péptido MANS o fragmento activo del mismo según la reivindicación 3, en la que dicha artritis es la artrosis o la artritis reumatoide.
- 15 5. Fragmento activo según la reivindicación 1 ó reivindicación 2, o utilización de un fragmento activo según la reivindicación 3 ó 4, en el que dicho fragmento activo comprende por lo menos seis aminoácidos.
- 20 6. Péptido MANS o fragmento activo del mismo para su utilización en el tratamiento de la artritis según la reivindicación 1 ó 2, para su utilización en el tratamiento de un mamífero.
7. Péptido MANS o fragmento activo del mismo para su utilización en el tratamiento de la artritis según la reivindicación 6, en el que el mamífero se selecciona de entre el grupo constituido por: humanos; caninos; equinos; y felinos.
- 25 8. Péptido MANS o fragmento activo del mismo para su utilización en el tratamiento de la artritis según la reivindicación 1 ó 2, en el que dicho péptido MANS o fragmento activo del mismo es administrado mediante administración tópica, administración parenteral, administración rectal, administración nasal o administración oral.
- 30 9. Péptido MANS o fragmento activo del mismo para su utilización en el tratamiento de la artritis según la reivindicación 1 ó 2, en el que dicho péptido MANS o fragmento activo del mismo se prepara para su administración mediante administración tópica, administración parenteral, administración rectal, administración nasal o administración oral.
- 35 10. Péptido MANS o fragmento activo del mismo para su utilización en el tratamiento de la artritis según la reivindicación 1 ó 2, en el que dicho tratamiento comprende además la utilización de una segunda molécula seleccionada de entre el grupo constituido por un antibiótico; un compuesto antiviral; un compuesto antiparasitario; un compuesto antiinflamatorio; y un inmunodepresor.

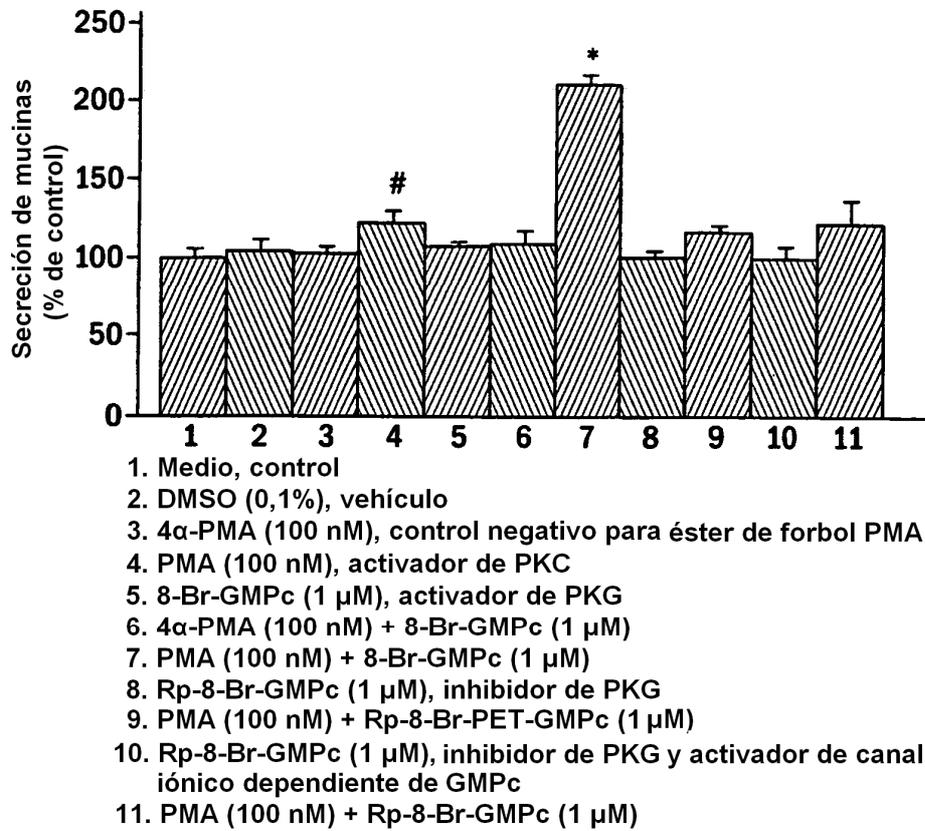


FIG. 1A

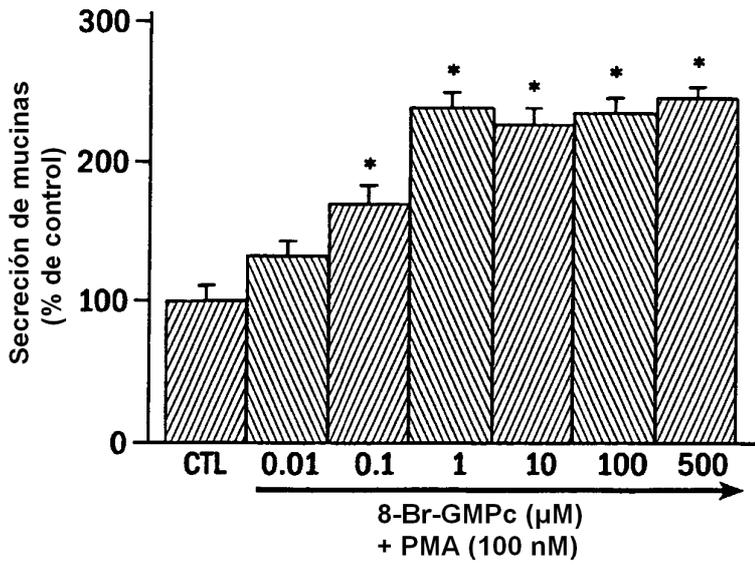


FIG. 1B

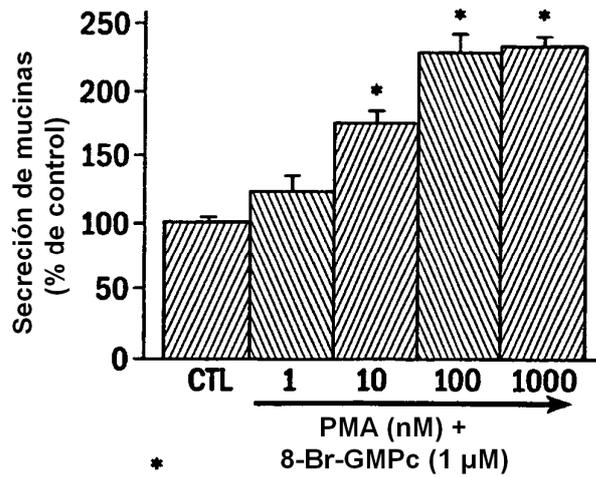


FIG. 1C

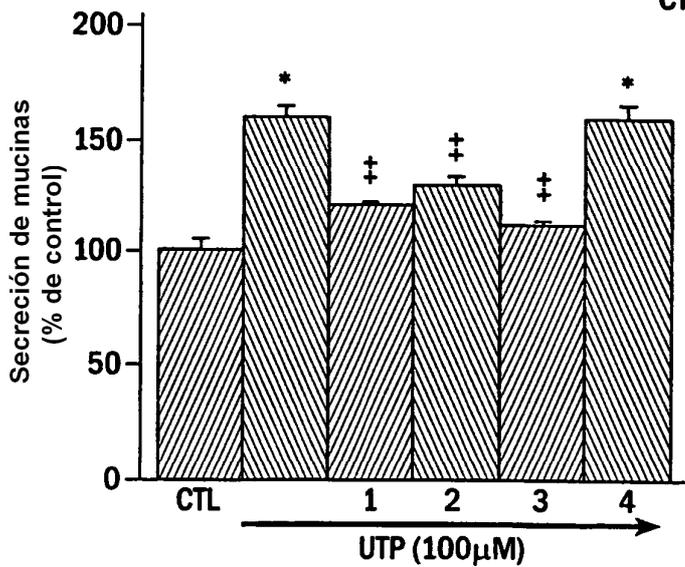


FIG. 1D

1. Calfofistina C (500 nM), inhibidor de PKC
2. Rp-8-Br-PET-GMPc (10 μM), inhibidor de PKG
3. LY83583 (50 μM), inhibidor de GC-S
4. KT5720 (500 nM), inhibidor de PKA

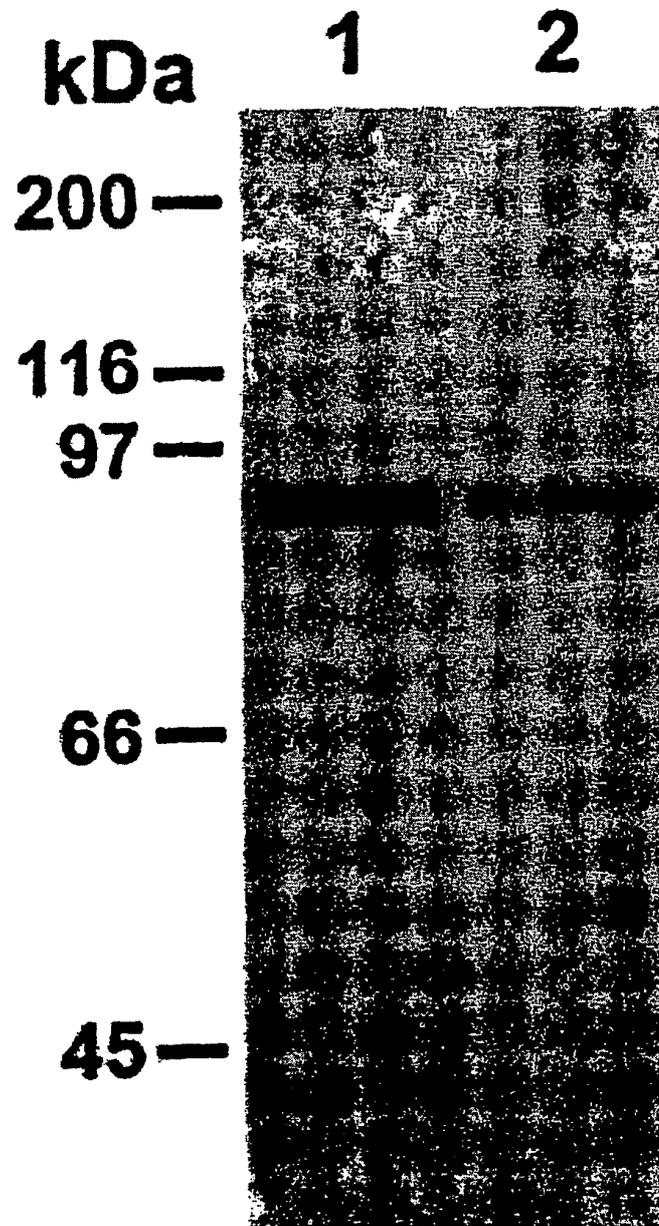


FIG. 2A

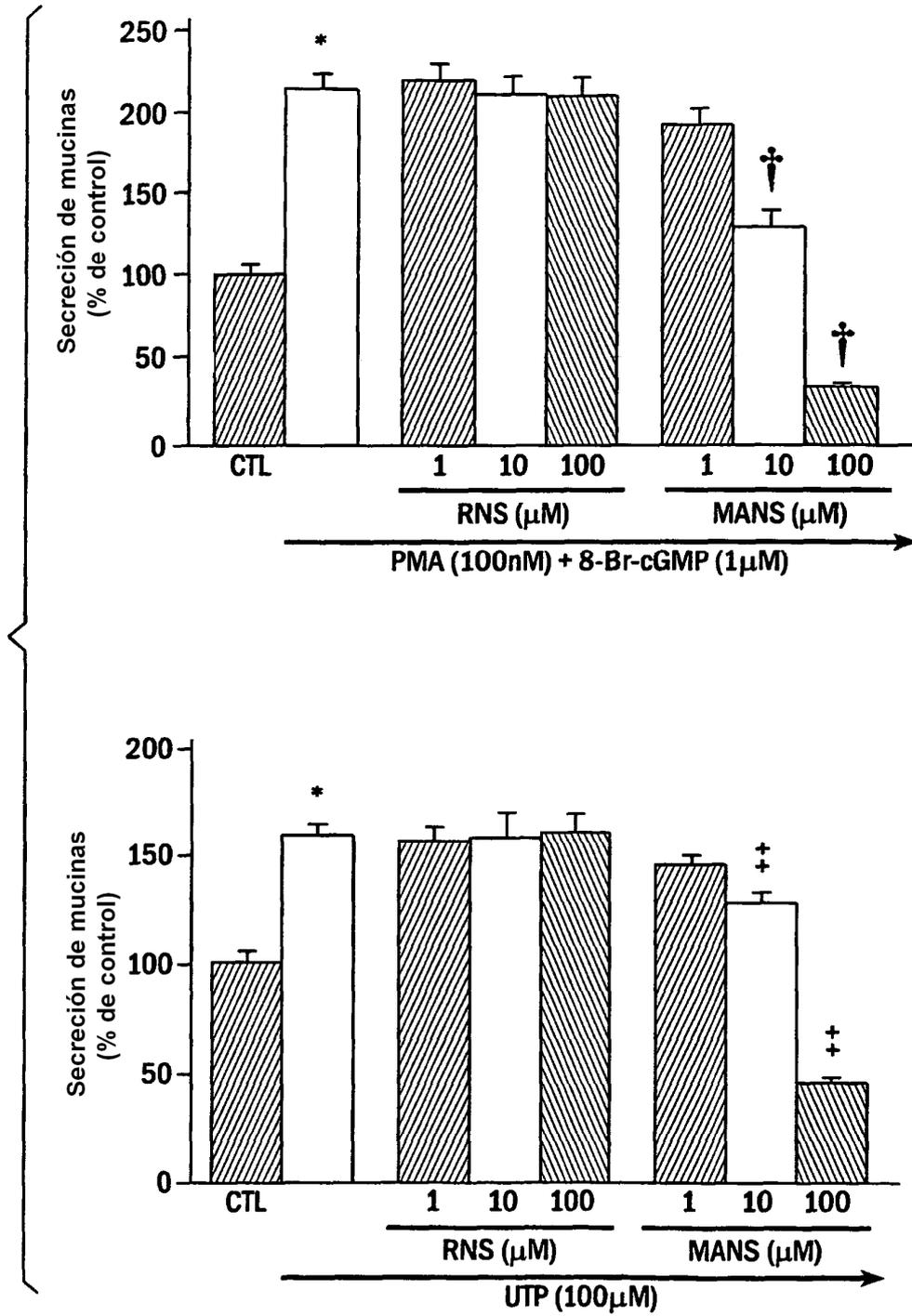


FIG. 2B

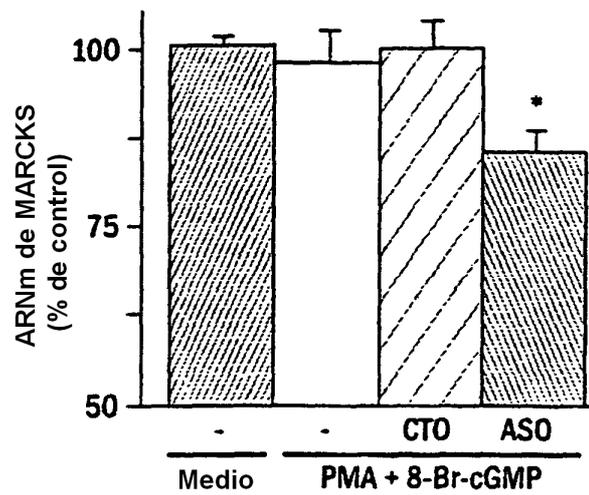
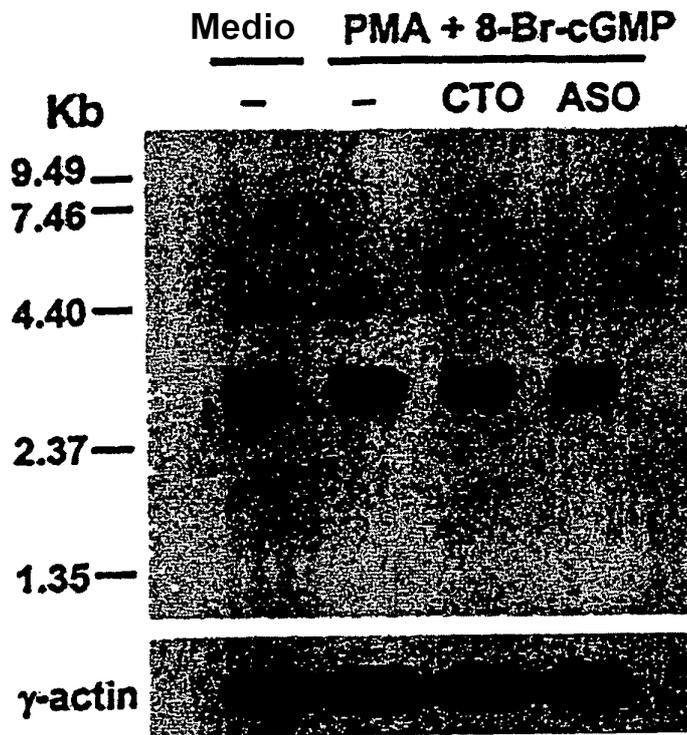


Fig. 3A

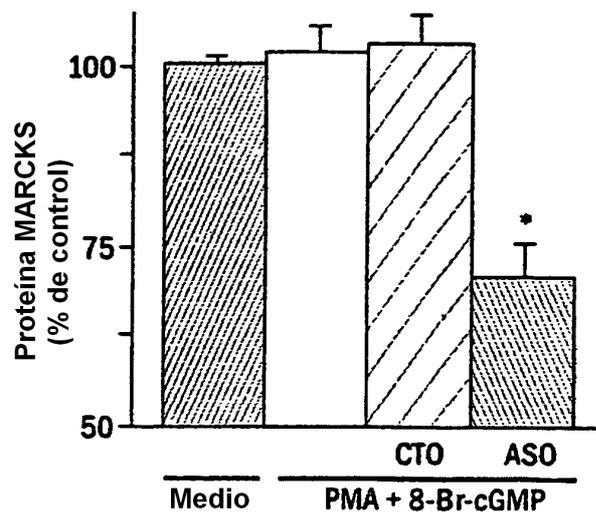
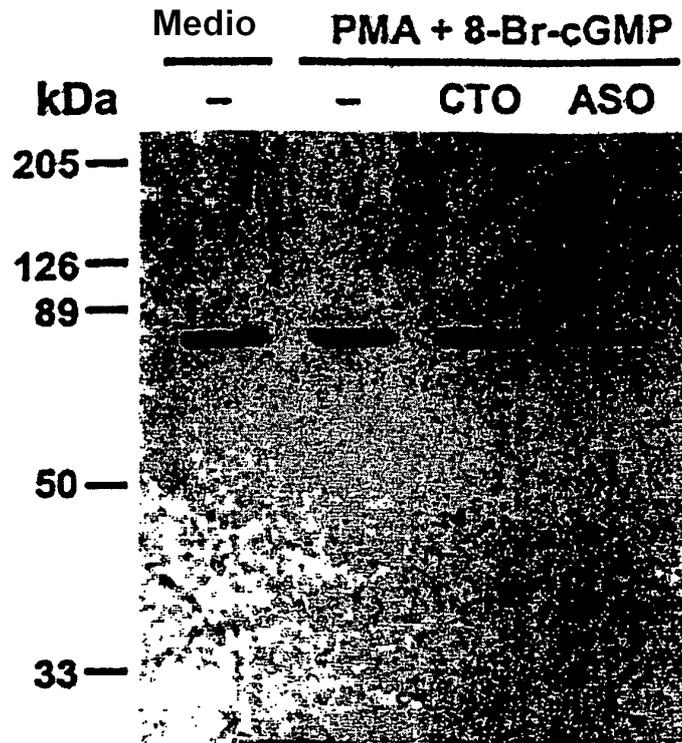


Fig. 3B

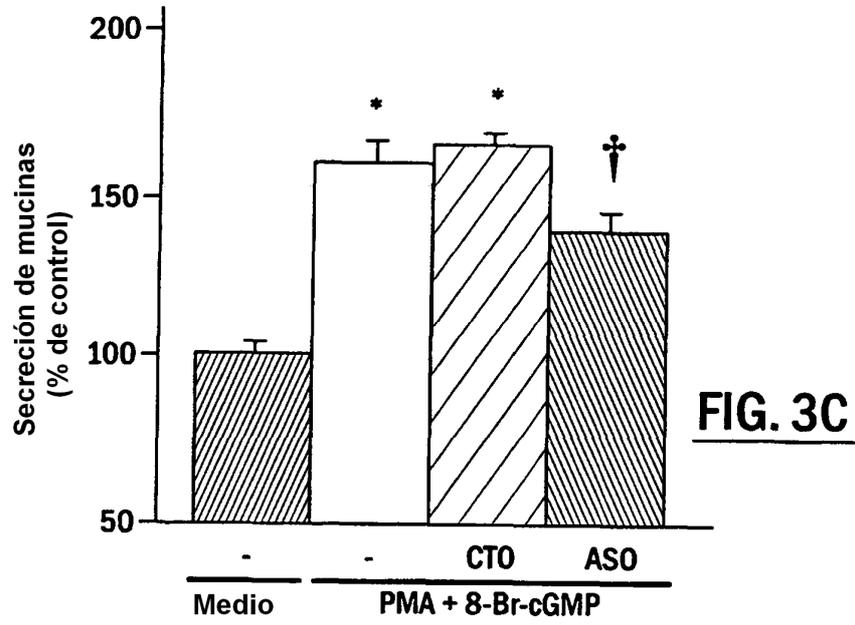


FIG. 4A

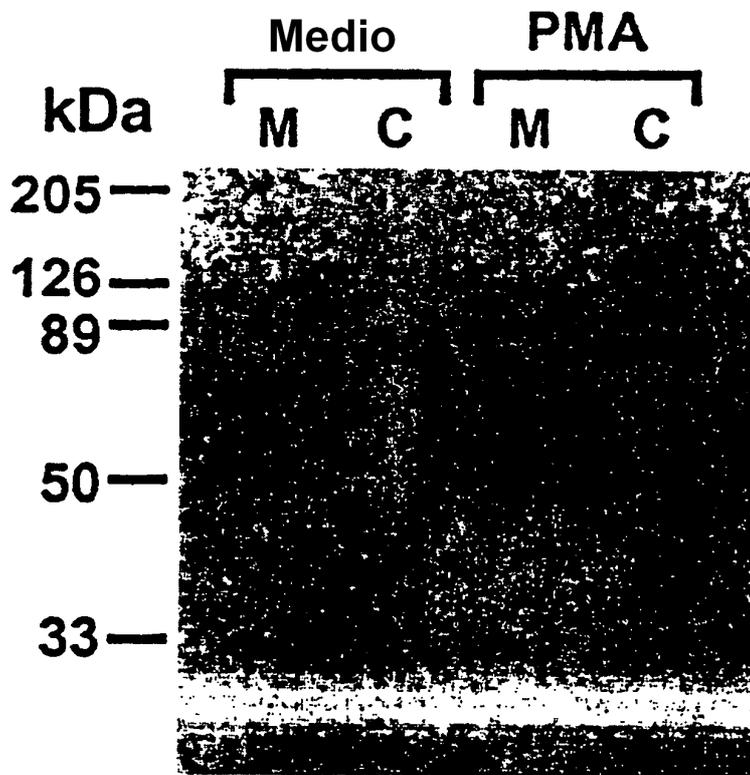
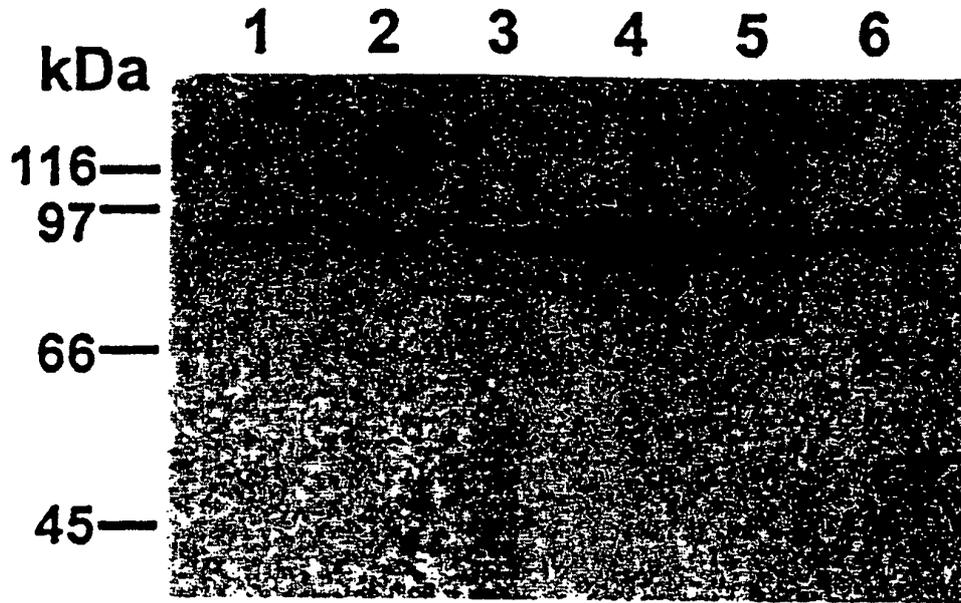


FIG. 4B

FIG. 5A

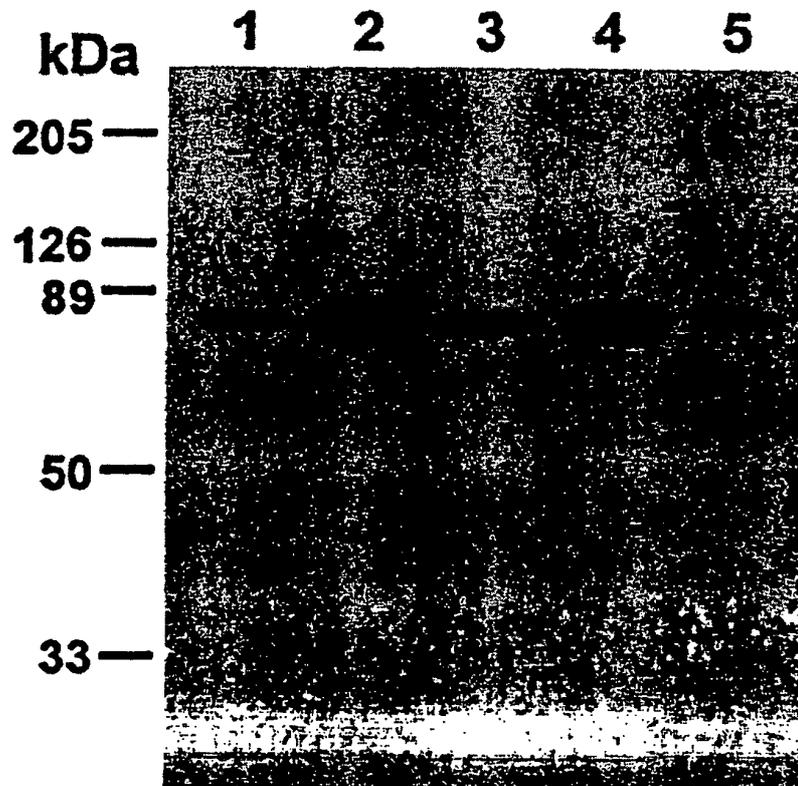
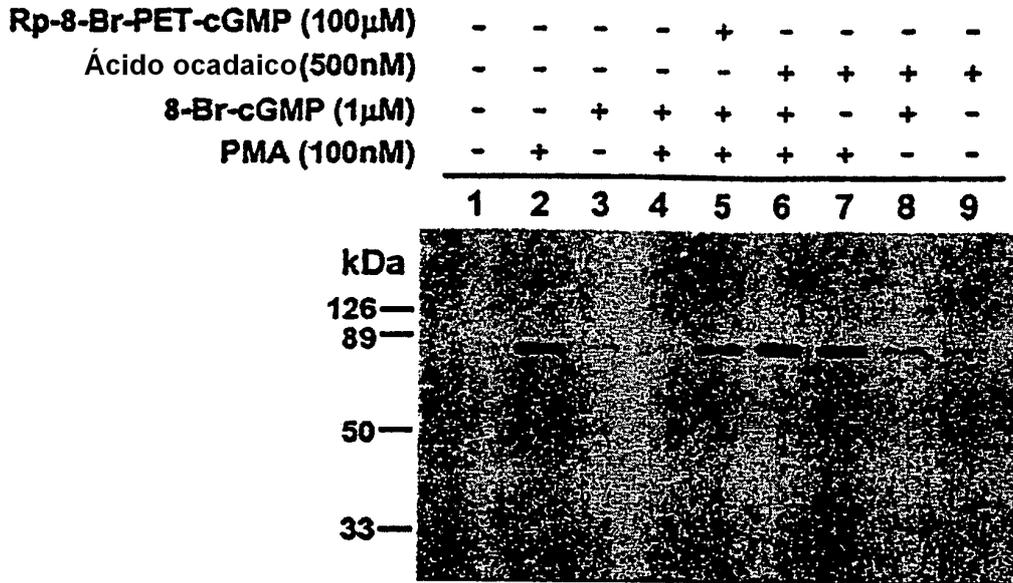


FIG. 5B

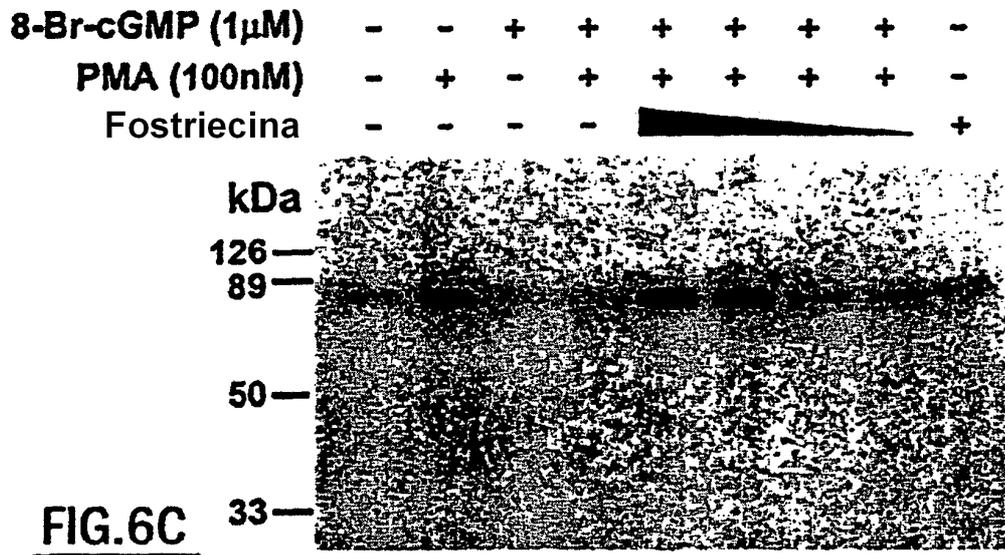


FIG. 5C

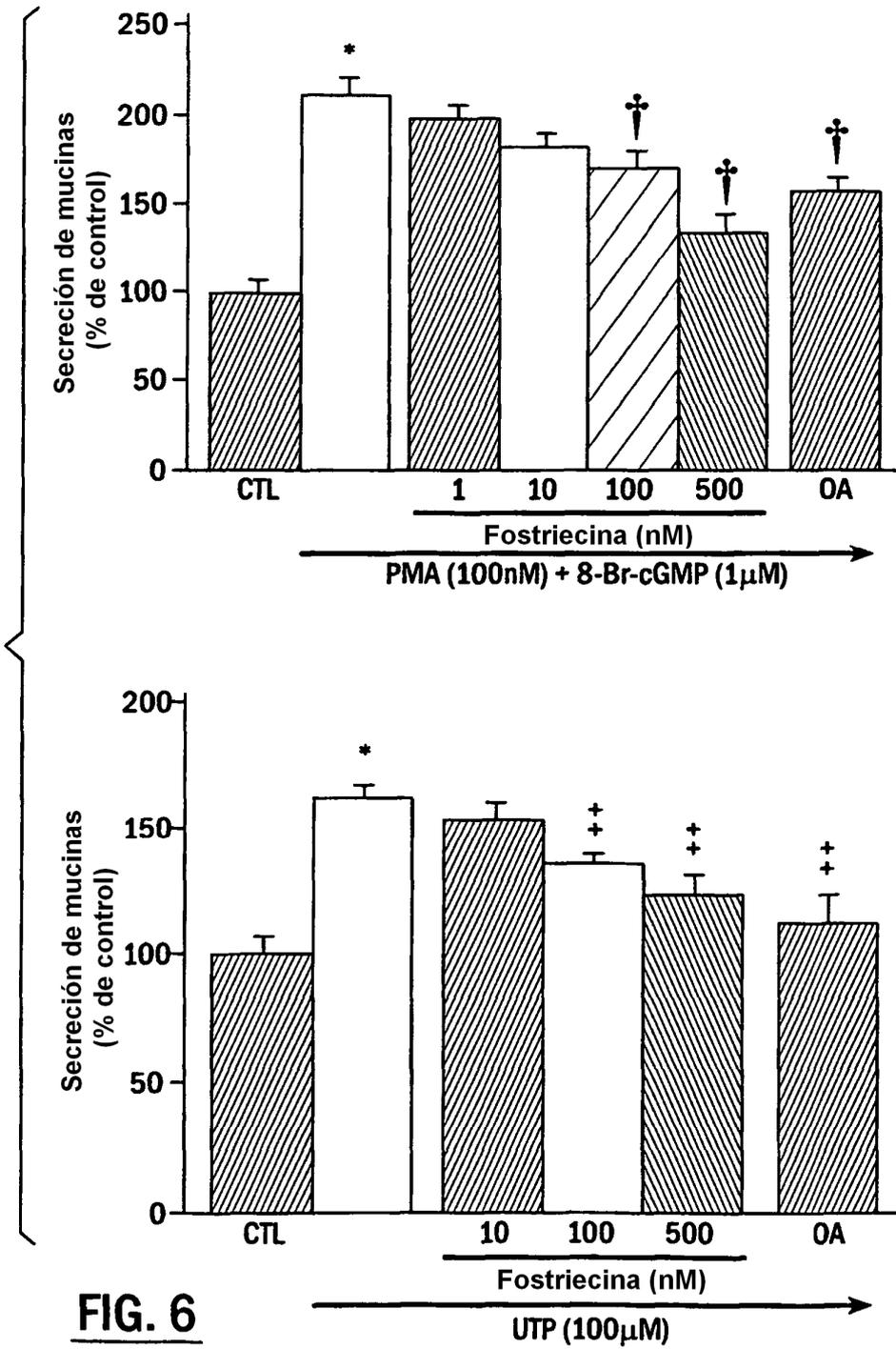


FIG. 6

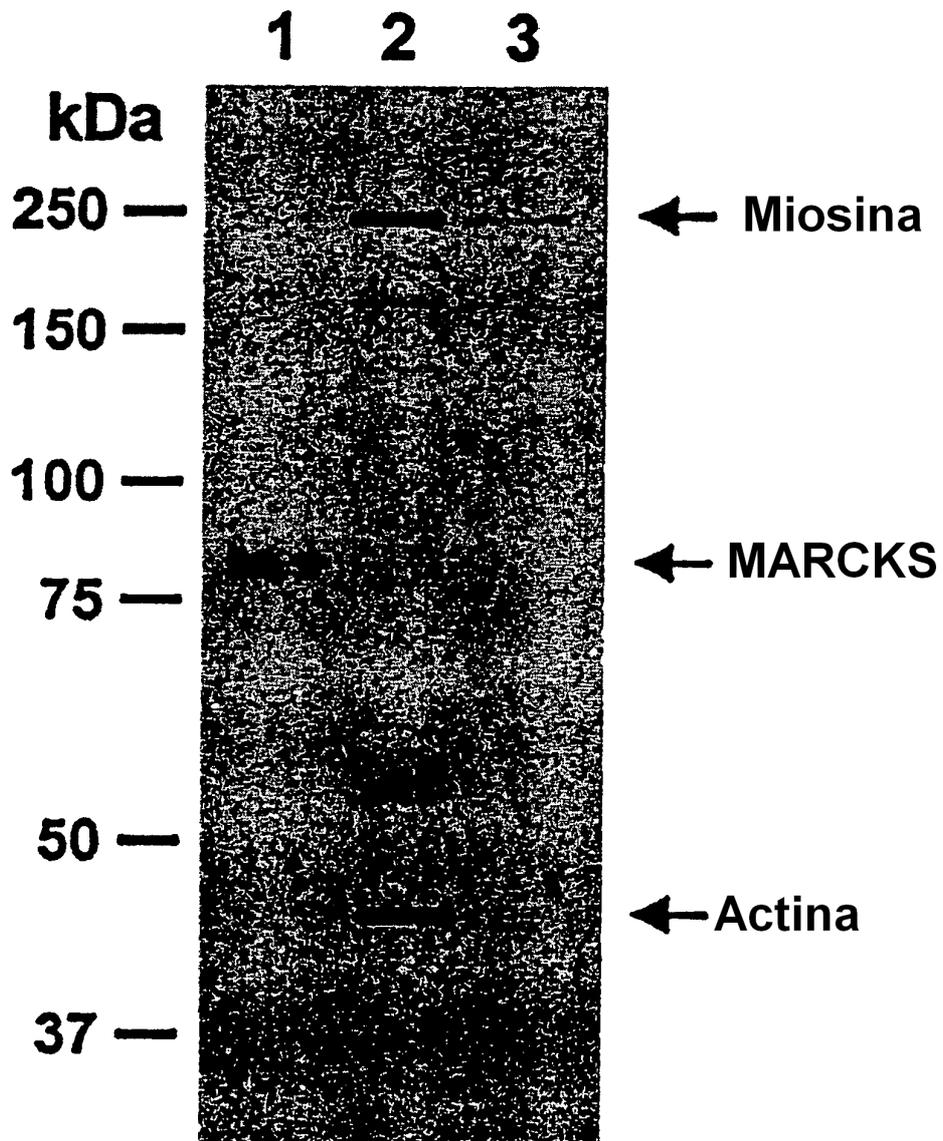


FIG. 7

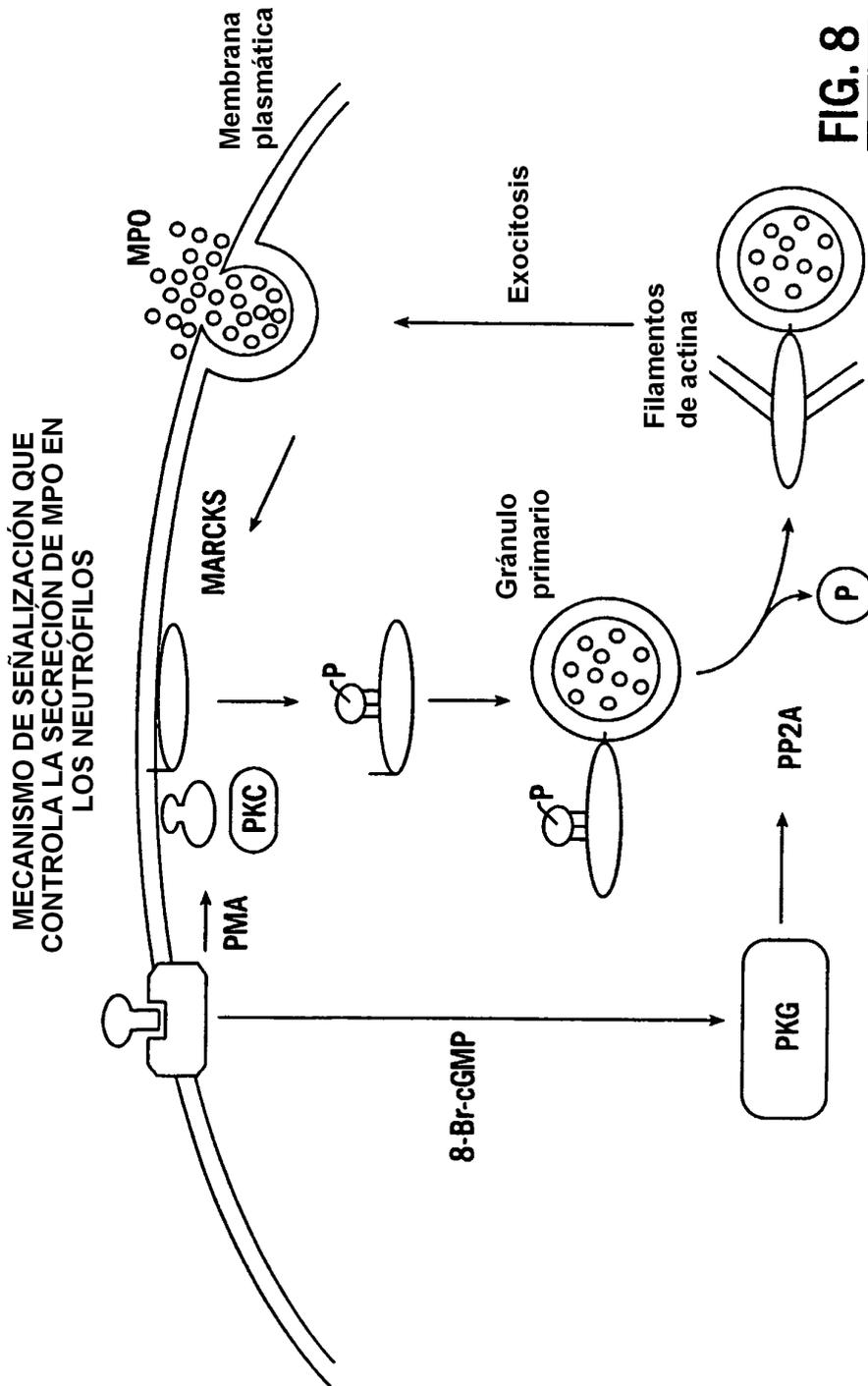


FIG. 8

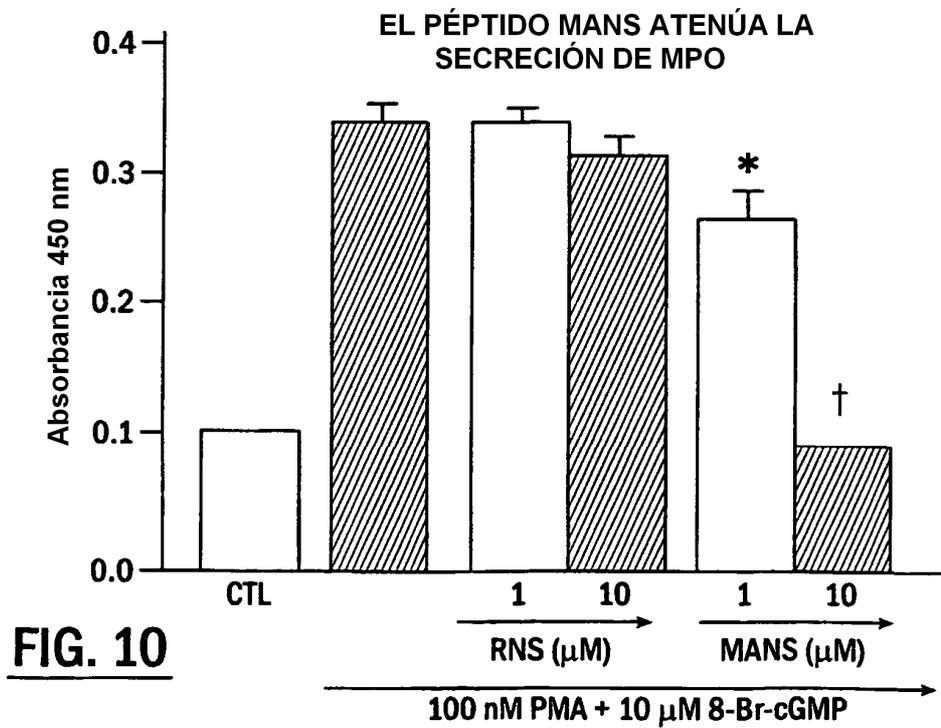
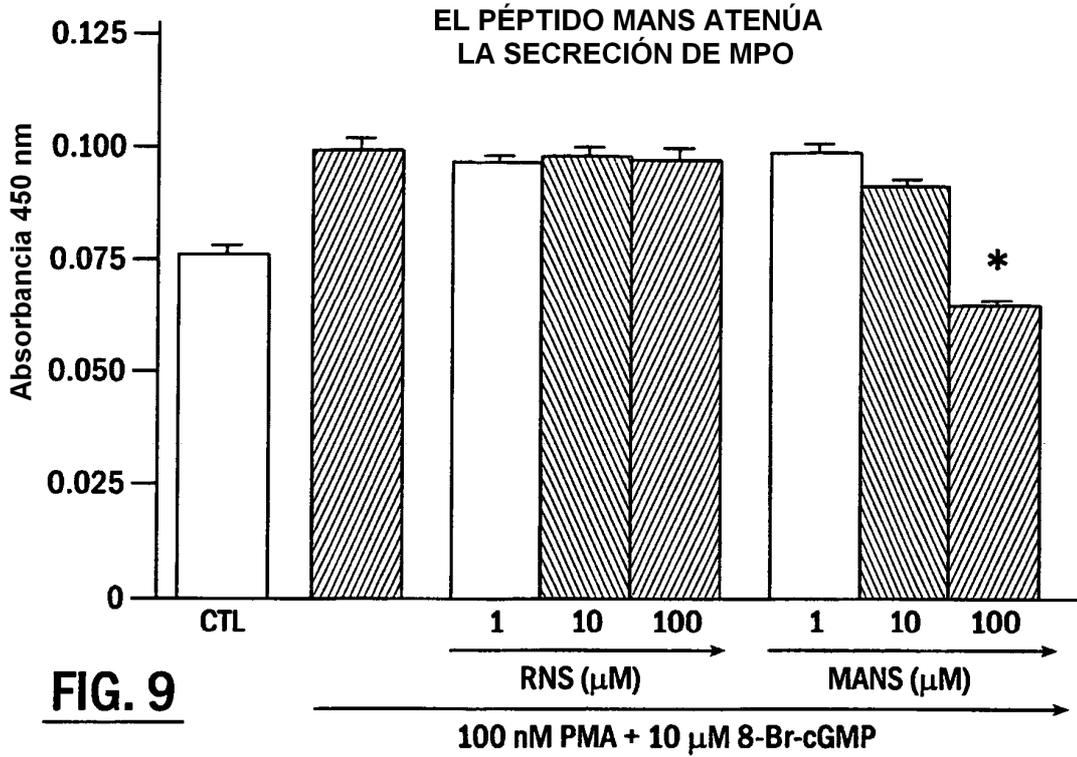


Fig. 11

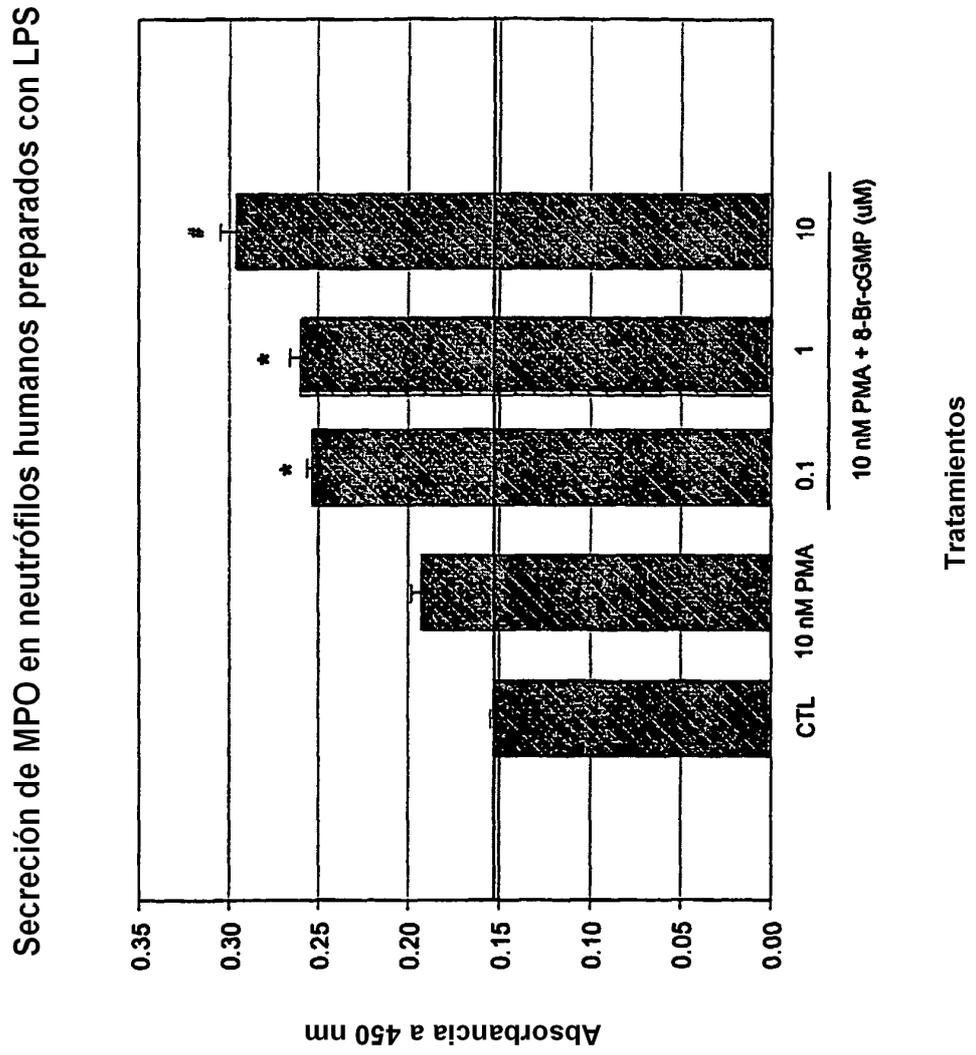


Fig. 12

Secreción de MPO en neutrófilos humanos preparados con LPS

