

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 391 225**

51 Int. Cl.:  
**C07K 14/47** (2006.01)  
**C12N 15/12** (2006.01)  
**A61K 38/17** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04024019 .4**  
96 Fecha de presentación: **24.02.2000**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1538162**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **08.06.2005**

54 Título: **Compuestos para alterar la secreción mucosa**

30 Prioridad:  
**24.02.1999 US 256154**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**22.11.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**22.11.2012**

73 Titular/es:  
**NORTH CAROLINA STATE UNIVERSITY (100.0%)**  
**1 HOLLADAY HALL, BOX 7003**  
**RALEIGH, NC 27695-7003, US**

72 Inventor/es:  
**LI, YUEHUA;**  
**MARTIN, KINDA D. y**  
**ADLER, KENNETH B.**

74 Agente/Representante:  
**GARCÍA EGEA, Isidro José**

ES 2 391 225 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

Compuestos para alterar la secreción mucosa.

### 5 CAMPO DE LA INVENCIÓN

La presente invención se relaciona con procedimientos y composiciones que sean útiles para la regulación de la secreción mucosa, y que puedan ser utilizadas en el tratamiento de afecciones médicas donde sea deseable incrementar o reducir la secreción mucosa.

10

### ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

El moco es un líquido biológico capaz de formar geles. Es una mezcla de componentes, incluyendo agua y productos secretores de una variedad de células. El moco expectorado de las vías respiratorias humanas contiene aproximadamente 95 % de agua y 5 % de sólidos; los contenidos sólidos incluyen 2-3 % de proteínas y glicoproteínas, 1 % de lípidos y 1 % de minerales. Ver Boat et al., "Biochemistry of Mucus", en *Airway Secretion*, Takashima y Shimura (editores), Marcel Dekker, 1994. Las mucinas, llamadas también glicoproteínas mucosas o glicoproteínas epiteliales, son glicoconjugados caracterizados por numerosas cadenas laterales de oligosacáridos enlazadas a un núcleo péptido por enlaces N y O.

20

En las vías respiratorias, las mucinas son liberadas sobre la superficie de las mismas desde células de copa en el epitelio de superficie, y desde células mucosas de glándulas submucosas. La cantidad total de líquido de superficie (moco) en las vías respiratorias es el resultado del índice de secreción mucosa en conjunción con el índice de eliminación mucosa (por reabsorción epitelial, evaporación, transporte ciliar y transporte de tos). Bajo condiciones "normales", los índices de secreción y eliminación mucosa están equilibrados de tal forma que solamente una capa superficial delgada de líquido cubre el árbol traqueo – bronquial. La hipersecreción mucosa (si no va acompañada de un incremento correlativo en la eliminación mucosa) tiene como resultado la acumulación de mucosa en las vías respiratorias, que puede tener como resultado la obstrucción de flujo de aire y una retención incrementada de materiales en partículas y microbios inhalados. Las estrategias actuales para reducir el moco del conducto en las vías respiratorias incluyen la inhibición de la hipersecreción mucosa usando acción farmacológica indirecta, modificación de las características físicas del moco para incrementar la actividad ciliar, y reforzamiento de la eliminación por tos del moco.

25

30

La hipersecreción mucosa contribuye a la patogénesis de un gran número de enfermedades inflamatorias de las vías respiratorias tanto en animales humanos como no humanos. La secreción mucosa incrementada se da en estados de enfermedad crónica, tales como asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica y bronquitis crónica; en enfermedades genéticas, tal como la fibrosis quística; en enfermedades alérgicas (atopía, inflamación alérgica); en bronquiectasia; y en una diversidad de enfermedades respiratorias infecciosas, agudas, tales como neumonía, rinitis, gripe o el resfriado común. Consecuentemente, son deseables nuevos procedimientos y compuestos terapéuticos aptos para disminuir o aliviar la secreción mucosa.

35

40

La infrasecreción mucosa tiene también efectos dañinos. El moco de las vías respiratorias actúa como una barrera física contra partículas inhaladas biológicamente activas, y puede ayudar a impedir la colonización bacteriana de las vías respiratorias y desactivar los productos citotóxicos liberados por los leucocitos. King et al., *Respir. Physiol.* 62:47-59 (1985); Vishwanath y Ramphal, *Infect. Immun.* 45:197 (1984); Cross et al., *Lancet* 1:1328 (1984). En el ojo, la mucosa conserva la película lacrimal, y es importante para la salud y bienestar ocular. La secreción mucosa en el tracto gastrointestinal tiene también una función citoprotectora. El papel de la mucosidad como una barrera química, biológica y mecánica significa que no es deseable una secreción mucosa anormalmente baja por membranas mucosas.

50

En vista de lo anterior, son deseables procedimientos y composiciones mejorados para alterar (esto es, incrementar o disminuir) la secreción mucosa de las células epiteliales y de las membranas mucosas.

### ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

55

La presente invención proporciona un péptido consistente en de 5 a menos de 50 amino ácidos contiguos de una secuencia terminal-N de número de identificación secuencial: 4, en el que dicho péptido inhibe la secreción mucosa relacionada con la proteína sustrato de la quinasa C rica en alanina miristoilada (conocida por sus siglas en inglés, MARCKS) y en el que dicho péptido reduce la secreción mucosa por una célula secretora de mucosa en comparación a los que ocurriría en ausencia de dicho péptido.

60

Una realización alternativa de la invención proporciona un péptido consistente en de 10 a 50 amino ácidos contiguos de una secuencia terminal N de número de identificación secuencial: 4, en el que dicho péptido inhibe la secreción mucosa relacionada con la proteína MARCKS y en el que dicho péptido reduce la secreción mucosa por una célula secretora de mucosidad en comparación con lo que ocurriría en la ausencia de dicho péptido.

65

El péptido de la presente invención bloquea la secreción de mediadores inflamatorios de células y disminuye la inflamación.

5 En una realización de la invención, el péptido de la invención es miristoilado. En una realización alternativa de la invención, el péptido tiene una secuencia de amino ácido que comprende el número de identificación secuencial:1.

10 En otra realización, la invención proporciona un péptido miristoilado de la región terminal N de la proteína MARCKS en el que el péptido consiste en una secuencia de amino ácido que es idéntica a una secuencia contigua de 10 a 50 amino ácidos de una secuencia terminal N de número de identificación secuencial: 4 y en el que dicho péptido reduce la secreción mucosa por una célula de secreción mucosa en comparación con lo que ocurriría en ausencia de dicho péptido.

15 En una realización alternativa, la invención proporciona un péptido miristoilado consistente en la secuencia: ácido mirístico – GAQFSKTAAKGEAAAERPGEAAVA (número de identificación secuencial:1) o fragmentos miristoilados de la misma consistentes de, al menos, 10 amino ácidos. El péptido inhibe la secreción mucosa relacionada con la proteína MARCKS y reduce la secreción mucosa por una célula de secreción mucosa en comparación a lo que ocurriría en ausencia de dicho péptido.

20 Otra realización de la invención proporciona un péptido miristoilado consistente en la secuencia: ácido mirístico – GAQFSKTAAKGEAAAERPGEAAVA (número de identificación secuencial:1) o fragmentos miristoilados de la misma consistentes de, al menos, 5 amino ácidos. El péptido inhibe la secreción mucosa relacionada con la proteína MARCKS y reduce la secreción mucosa por una célula de secreción mucosa en comparación a lo que ocurriría en ausencia de dicho péptido.

25 La invención también proporciona un péptido de la invención para uso como medicamento y una composición farmacéutica que comprende el péptido de la invención conjuntamente con un portador farmacéuticamente aceptable. En una realización, la invención proporciona para el uso de un péptido de la invención para la producción de un medicamento para el tratamiento terapéutico o profiláctico de la secreción o inflamación mucosa. La invención también proporciona el uso de un péptido para la producción de un medicamento para el tratamiento terapéutico o profiláctico de secreción e inflamación mucosa. La invención también proporciona el uso de un péptido de la invención para la producción de un medicamento para el tratamiento terapéutico o profiláctico de enfermedades de las vías respiratorias. Se proporciona también un péptido de la invención para su uso en el tratamiento de secreción o inflamación mucosa. De forma alternativa, se proporciona un péptido de la invención para su uso en el tratamiento de secreción e inflamación mucosa. Se proporciona también un péptido de la invención para uso en el tratamiento de enfermedad de las vías respiratorias.

### **BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS**

40 La figura 1A es un gráfico de secreción de mucina estimulada por células epiteliales bronquiales humanas *in vitro* en respuesta a diversas cantidades del péptido MANS (número de identificación secuencial: 1). Columna 1 = medios/control (sin péptido, sin estimulación); columna 2 = 100 nM PMA y 1  $\mu$ M 8-Br-cGMP (secreción estimulada); columna 3 = 1 m  $\mu$ M péptido MANS, 100 nM PMA y 1  $\mu$ M 8-Br-cGMP; columna 4 = 10 m  $\mu$ M péptido MANS, 100 nM PMA y 1  $\mu$ M 8-Br-cGMP y columna 5 = 1 m  $\mu$ M péptido MANS, 100 nM PMA y 1  $\mu$ M 8-Br-cGMP. Los asteriscos solitarios (\*) indican que la respuesta medida fue estadísticamente diferente que el control de medios (columna 1) y los asteriscos dobles (\*\*) indican que la respuesta fue estadísticamente diferente que la de las células estimuladas que no fueron expuestas al péptido MANS (columna 2).

50 La Figura 1B muestra de forma gráfica la inhibición de secreción mucina basal por las células epiteliales bronquiales humanas expuestas al péptido MANS (número de identificación secuencial: 1) o un péptido de control negativo consistente de los mismos amino ácidos que el péptido MANS, pero en orden aleatorio (péptido RNS; secuencia terminal N aleatoria). Columna 1 = control de medios; columna 2= una hora de incubación con 100  $\mu$ M de RNS; columna 3 = una hora de incubación con péptido MANS. El asterisco solitario (\*) indica que la respuesta en la columna 3 fue estadísticamente diferente que el control de medios (columna 1).

55 La Figura 2 es un gráfico de los efectos de cantidades diversas del péptido MANS (número de identificación secuencial: 1) en secreción de mucina inducida por UTP por células epiteliales bronquiales humanas *in vitro*. La Columna 1 es la relación medios/control; columna 2 = 0.1 mM UTP; columna 2 = 0.1 mM UTP y 1  $\mu$ M péptido MANS; columna 3 = 0.1 mM UTP y 1  $\mu$ M péptido MANS; columna 4 = 0.1 mM UTP y 10  $\mu$ M péptido MANS; y ; columna 5 = 0.1 mM UTP y 100  $\mu$ M péptido MANS. Los asteriscos solitarios (\*) indican que la respuesta medida fue estadísticamente diferente que el control de medios (columna 1) y los asteriscos dobles (\*\*) indican que la respuesta fue estadísticamente diferente que la de las células estimuladas por UTP que no fueron expuestas al péptido MANS (columna 2).

65 La Figura 3A es un gráfico de los efectos del péptido MANS (número de identificación secuencial: 1) y del péptido MA-PSD (número de identificación secuencial: 2) en secreción de mucina estimulada por células epiteliales

bronquiales humanas *in vitro*. La Columna 1 es la relación medios/control; columna 2 = 100 nM PMA; columna 3 = 100 nM PMA y 1  $\mu$ M 8-Br-cGMP; columna 4 = 100 nM PMA, 1  $\mu$ M 8-Br-cGMP y 1  $\mu$ M del péptido MA-PSD; columna 5 = 100 nM PMA, 1  $\mu$ M 8-Br-cGMP y 10  $\mu$ M del péptido MA-PSD; columna 6 = 100 nM PMA, 1  $\mu$ M 8-Br-cGMP y 100  $\mu$ M del péptido MA-PSD; columna 7 = 100 nM PMA, 1  $\mu$ M 8-Br-cGMP y 1  $\mu$ M del péptido MANS; columna 8 = 100 nM PMA, 1  $\mu$ M 8-Br-cGMP y 10  $\mu$ M del péptido MANS; y columna 9 = 100 nM PMA, 1  $\mu$ M 8-Br-cGMP y 100  $\mu$ M del péptido MANS. Los asteriscos solitarios (\*) indican que la respuesta medida fue estadísticamente diferente que el control de medios (columna 1) y los asteriscos dobles (\*\*) indican que la respuesta fue estadísticamente diferente que la de las células estimuladas que no fueron expuestas al péptido MANS (columna 3).

La Figura 3B muestra de forma gráfica el efecto de una hora de incubación con el péptido MA-PSD (número de identificación secuencial: 2) en secreción de mucina basal por células epiteliales bronquiales humanas *in vitro*. La Columna 1 es la relación medios/control; columna 2 = 100  $\mu$ M MA-PSD; columna 3 = 10  $\mu$ M MA-PSD; columna 4 = 1  $\mu$ M MA-PSD. El asterisco solitario (\*) indica que la respuesta en la columna 3 fue estadísticamente diferente que el control de medios (columna 1).

La Figura 4 es una ilustración de una vía de señalización propuesta de secreción de mucina mediada por MARCKS por células epiteliales humanas. En esta figura, PKC = proteína quinasa C; PKG = proteína quinasa dependiente de cGMP; GC-S= ciclasa de guanililo soluble; PP2A = proteína de fosfatasa 2A; NO = óxido nítrico; GTP= trifosfato de guanosina; y cGMP= monofosfato de guanosina cíclica. En esta vía propuesta, los secretagogos de mucina (mostrados en la figura como enlazándose a un receptor) interactúan con las células (de copa) epiteliales de las vías respiratorias y activan dos quinasas de proteína separadas: PKC y PKG. La PKC activada fosforila la MARCKS, provocando su translocación desde la membrana de plasma al citoplasma, donde se convierte en el objeto de la membrana de gránulo de mucina con la asistencia de proteínas asociadas con MARCKS. La PKG, activada por vía del óxido nítrico vía (NO)-cGMP-PKG, que, a su vez, activa una fosfatasa 2 A de proteína citoplásmica (PP2A), que defosforila la MARCKS para reticular filamentos de actina. Esto ata el gránulo al citoesqueleto para movimiento y exocitosis.

La Figura 5 es un gráfico de los efectos de un oligonucleótido de antisentido MARCKS sobre secreción de mucina estimulada por células epiteliales bronquiales humanas *in vitro*. La Columna 1 es la relación medios/control; columna 2 = células estimuladas con 100 nM PMA y 1  $\mu$ M 8-Br-cGMP; columna 3 = 5  $\mu$ M de oligonucleótido de control, 100 nM PMA y 1  $\mu$ M 8-Br-cGMP; columna 4 = 5  $\mu$ M de oligonucleótido de antisentido, 100 nM PMA y 1  $\mu$ M 8-Br-cGMP. Los asteriscos solitarios (\*) indican que la respuesta medida fue estadísticamente diferente que el control de medios (columna 1) y los asteriscos dobles (\*\*) indican que la respuesta fue estadísticamente diferente que la de las células estimuladas que no fueron expuestas a ningún oligonucleótido (columna 2).

Las Figuras 6 A, 6 B y 6 C, conjuntamente, ilustran que el TNF- $\alpha$  regula la expresión de MARCKS y aumenta la hipersecreción de mucina. Las células NHBE fueron incubadas con 10 ng/ml de recombinante humano TNF- $\alpha$  o solo medio durante 4 horas, entonces estimuladas con PMA (100 nM) + 8-Br-cGMP (1 $\mu$ M) durante 15 minutos, o UTP (0.1 mM) durante 2 horas. Se recogió mucina secretada y se midió por ELISA. El RNA total y la proteína fueron aislados de las células tratadas. El mRNA MARCKS fue evaluado por northern Blot, y la proteína MARCKS por la técnica de inmunoblot.

La Figura 6 A es un Northern Blot y gráfico que indica un incremento en mRNA MARCKS en células incubadas con TNF- $\alpha$  (carril 2 de blot, columna 2 de gráfico) en comparación con las células incubadas sólo en el medio (carril 1 de blot, columna 1 de gráfico).

La Figura 6 B es un inmunoblot y gráfico mostrando un incremento de tres a cuatro pliegues en la proteína MARCKS en células incubadas con TNF- $\alpha$  (carril 2 de blot, columna 2 de gráfico) en comparación con las células incubadas sólo en el medio (carril 1 de blot, columna 1 de gráfico).

La Figura 6 C es un gráfico que muestra que, en las células incubadas con TNF- $\alpha$ , la hipersecreción de mucina fue significativamente aumentada en respuesta a la subsiguiente estimulación por PMA + 8-Br-cGMP o UTP en comparación a la secreción de mucina de las células que son incubadas solo con el medio. Los datos se presentan como media  $\pm$  SEM (n=6 en cada punto). Los asteriscos solitarios (\*) indican una diferencia estadísticamente significativa de las muestras de control (solo en el medio) (p<0.05). La marca de cruz solitaria ( $\square$ ) indica una diferencia estadísticamente significativa con relación al estímulo (p<0.05).

La Figura 7 es un gráfico que muestra que el ácido okadaico, un inhibidor de la fosfatasa, bloquea la hipersecreción de mucina inducida por PMA + 8-Br-cGMP o UTP. Las células de NHBE fueron pre – incubadas con ácido okadaico (500 nM) durante 15 minutos a 37° C / 5 % CO<sub>2</sub>, entonces fueron estimuladas con PMA (100 nM) + 8-Br-cGMP (1 $\mu$ M) durante 15 minutos, o con UTP (0.1 mM) durante 2 horas. Se recogió mucina secretada en el medio apical y se ensayó por ELISA. La columna 1 muestra los resultados de la incubación, solo con el medio, durante 30 minutos. La columna 2 muestra los resultados de la pre – incubación, solo con el medio, durante 15 minutos, seguida de incubación con PMA + 8-Br-cGMP durante 15 minutos adicionales. La columna 3 muestra los resultados de la pre – incubación con ácido okadaico durante 15 minutos, seguida de co – incubación con PMA + 8-Br-cGMP durante 15 minutos adicionales. La columna 4 muestra los resultados de la incubación solo con el medio

durante 2 horas. La columna 6 muestra los resultados de la pre – incubación con ácido okadaico, seguida de incubación con UTP durante 2 horas adicionales. Los datos se presentan como media  $\pm$  SEM (n=6 a cada punto). Los asteriscos solitarios (\*) indican una diferencia estadísticamente significativa de las muestras de control (p<0.05). La marca de cruz solitaria ( $\square$ ) indica una diferencia estadísticamente significativa con relación al estímulo (p<0.05).

La Figura 8 es un gráfico que muestra que la hipersecreción de mucina inducida por UTP implica la activación de PKC y PKG. Las células NHBE fueron pre – incubadas con el inhibidor indicado (descrito *infra*) durante 15 minutos, seguidamente fueron estimuladas con UTP (0.1 mM) durante 2 horas. Se recogió mucina secretada en el medio apical y se ensayó por ELISA. La columna 1 muestra los resultados de la incubación, solo con el medio. La columna 2 muestra los resultados de la incubación con 0.1 mM UTP. La columna 3 indica los resultados de incubación con 0.1 mM UTP + 500 nM calfofistina C (un inhibidor de PKC). La Columna 4 indica los resultados de incubación con 0.1 mM UTP + 10  $\mu$ M Rp-8-Br-PET-cGMP (un inhibidor de PKG). La Columna 5 indica los resultados de incubación con 0.1 mM UTP + 50  $\mu$ M LY83583 (un indicador de ciclasa de guanililo soluble). La columna 6 indica los resultados de incubación con 0.1 mM UTP + 500 nM KT5720 (un inhibidor de PKA). Los datos se presentan como media  $\pm$  SEM (n=6 a cada punto). Los asteriscos solitarios (\*) indican una diferencia estadísticamente significativa de las muestras de control (p<0.05). La marca de cruz solitaria ( $\square$ ) indica una diferencia estadísticamente significativa con relación a la estimulación UTP (p<0.05).

### **DESCRIPCIÓN DETALLADA DE REALIZACIONES PREFERIDAS**

El moco es la secreción viscosa clara de las membranas mucosas, y comprende agua, mucina, lípidos, y diversas sales inorgánicas. La mucina es una glicoproteína rica en carbohidratos que es secretada por células epiteliales especializadas (conocidas como células de copa), las glándulas submaxiliares, y otras células glandulares mucosas. Las células de copa son células epiteliales especializadas para la secreción y que contienen una acumulación de gránulos secretorios mucosos.

El tejido mucoso (o mucosa) ocupa diversas estructuras anatómicas en el cuerpo mamífero y aviar, incluyendo los ojos, tracto respiratorio (alvéolos, bronquios, cavidad oral, laringe, cavidad nasal, faringe, tráquea), tracto gastrointestinal (esófago, estómago, intestinos delgado y grueso, recto), y tracto genitourinario (uretra, vesícula urinaria, útero y vagina).

Las alteraciones en la cantidad de secreciones mucosas pueden ser debidas a diversos factores subyacentes, incluyendo un cambio en la cantidad de glicoproteínas mucosas secretadas por células secretoras de moco, un cambio en el número total de células secretoras de moco, o combinaciones de los mismos. Se sabe que los mediadores liberados por la respuesta inflamatoria actúan como secretagogos de moco, incluyendo mediadores lípidos, metabolitos de oxígenos, y otros productos específicamente celulares. Larivee et al., en : *Airway Secretion*, Takishima y Shimura (Eds.), Marcel Dekker Inc., 1994, páginas 469-511.

Usado aquí, el término “hipersecreción” mucosa hace referencia a la producción mucosa sobre una cantidad normal o basal, o la producción mucosa en una cantidad que lleva a cambios o síntomas patológicos.

Usada aquí, la expresión “inhibición de la secreción mucosa” hace referencia a la suavización o reducción en la secreción mucosa; no supone la completa cesación de la secreción mucosa. Un tratamiento que inhibe la secreción mucosa resulta en una producción mucosa disminuida en comparación con la que tendría lugar, o sería esperada, en ausencia de dicho tratamiento.

Las cantidades de moco secretadas por una célula en un cultivo, o por un tejido *in vivo* pueden ser medidas o evaluadas usando procedimientos conocidos en el estado de la técnica.

Usados aquí, los términos “reforzamiento” o “estimulación” de la secreción mucosa, hacen referencia a un incremento en la secreción. Un tratamiento que refuerza la secreción mucosa tiene como resultado una producción mucosa incrementada en comparación con la que tendría lugar, o sería de esperar, en ausencia de dicho tratamiento.

Usada aquí, la expresión “secreción mucosa estimulada” hace referencia a la secreción mucosa que tiene lugar en respuesta a un secretagogo; esto contrasta con la “secreción mucosa basal” que tiene lugar bajo condiciones fisiológicas normales.

Usado aquí, un compuesto que inhibe la liberación mediada por proteína MARCKS de gránulos de mucina (o moco), incluye aquellos compuestos que actúan en una fase de la vía de señalización mediada por la proteína MARCKS que resulta en secreción mucosa, causando una reducción en la secreción mucosa.

Usado aquí, el término “endógeno”, hace referencia a compuestas que se dan de forma natural en una célula. La proteína MARCKS endógena hace así referencia a la proteína MARCKS que se encuentra en el interior de una célula, en oposición a la proteína MARCKS introducida en dicha célula (ya sea administrada directamente o por técnicas de ingeniería genética).

Usada aquí, la expresión “fragmento activo” de una proteína MARCKS es la que afecta (inhibe o refuerza) la liberación mucosa mediada por proteína MARCKS, que se da en respuesta a un secretagogo tal como UTP (trifosfato de uridina 5'). Un fragmento de péptido activo de MARCKS comprende una secuencia de amino ácido que es idéntica o sustancialmente idéntica a una secuencia contigua de amino ácidos encontrada en una proteína MARCKS que se dé de forma natural. Los fragmentos activos de proteína MARCKS son, generalmente, al menos de cinco, diez, quince, veinte o veinticinco amino ácidos de longitud, pero son más cortos que la proteína MARCKS completa. Los fragmentos activos de proteína MARCKS tienen, preferiblemente, menos de alrededor de cincuenta setenta y cinco, cien o doscientos amino ácidos.

Una cantidad “inhibitoria de moco” o “que inhibe el moco” de un compuesto es la cantidad que reduce o inhibe la secreción mucosa, en comparación a lo que ocurriría en ausencia del compuesto. Una cantidad “fortalecedora del moco” de un compuesto es la cantidad que fortalece o incrementa la secreción mucosa, en comparación a lo que ocurriría en ausencia del compuesto. Por ejemplo, como se describe aquí, se descubrió que los péptidos de NUMERO DE IDENTIFICACION SECUENCIAL:2 incrementaban la secreción mucosa en el epitelio de las vías respiratorias *in vivo* cuando se dispone de ellas en una determinada cantidad, y que inhibían la secreción mucosa al disponerse de ellas en cantidades mayores. La cantidad más efectiva de un péptido en concreto variará dependiendo del péptido, vía de administración, y dolencia que esté siendo tratada. Usado aquí, el término “compuesto” se entiende de forma amplia para la inclusión en el mismo de proteínas, fragmentos de péptidos, nucleótidos, oligonucleótidos, y otros químicos no proteínicos.

Usado aquí, un péptido inhibidor de secreción mucosa relacionada con MARCKS (o liberación de mucina) es un péptido que, cuando se proporciona a una célula secretora de moco, inhibe o reduce la secreción mucosa en comparación con lo que ocurriría en ausencia de dicho péptido.

Usado aquí, un péptido fortalecedor de secreción mucosa relacionada con MARCKS (o liberación de mucina) es un péptido que, cuando se proporciona a una célula secretora de moco, refuerza o incrementa la secreción mucosa en comparación con lo que ocurriría en ausencia de dicho péptido.

El término “oligonucleótido”, usado aquí, se refiere a ADN o ARN y puede incluir hebras de sentido y/o antisentido como apropiadas a los efectos deseados. Pueden ser incorporados oligonucleótidos útiles en la presente invención en vectores de expresión recombinante que incluyen un promotor y otras secuencias necesarias para la expresión de los productos de translación deseados (tales como un péptido). De forma alternativa, pueden ser distribuidos oligonucleótidos “delgados” a células objeto, como se conoce en el estado de la técnica (ver, por ejemplo, Felgner et al., Patente US 5.580.859).

Los términos “mucosa” o “membranas de mucosa”, utilizados aquí, hacen referencia a tejidos mucosos de un huésped, dondequiera que se ubiquen en el cuerpo, incluyendo, pero no limitados a, conductos respiratorios (nasal, oral, traqueal, bronquial), conductos genitales (vaginal, cervical, anal y fállico), conductos urinarios (uretra, vesícula), y los ojos.

La presente invención proporciona procedimientos y compuestos que son útiles para la inhibición de secreción mucosa de células epiteliales. Los presentes inventores han determinado que los procesos secretores de mucina en células epiteliales implican la proteína quinasa C (PKC), y la proteína sustrato MARCKS (sustrato de quinasa C rica en alanina miristolada). Groff et al., *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 266, no.22:14390-14398 (1991) divulga que los lugares de fosforilación en la proteína MARCKS consisten de cuatro serinas contenidas en el interior de una zona básica, conservada de 25 amino ácidos, conocida como dominio del lugar de fosforilación. Por el bloqueo o inhibición de la función y/o producción de proteína MARCKS en células epiteliales secretoras, se reduce la secreción de mucina sobre la que, de otra forma, ocurriría (esto es, que tendría lugar en la ausencia de dicho tratamiento). También se describen procedimientos y composiciones que son útiles para reforzar la secreción mucosa de células epiteliales. Al reforzar la función y/o producción de proteína MARCKS en células epiteliales secretoras, se incrementa la secreción de mucina sobre la que tendría lugar en otra situación (esto es, que sucedería en la ausencia de dicho bloqueo).

Los inventores actuales han mostrado que el uso de un fragmento de la proteína MARCKS reduce la secreción mucosa de las células epiteliales. Adicionalmente, el uso de fragmentos antisentido dirigidos contra la secuencia de ARNm MARCKS ha demostrado también que reduce la producción mucosa en células epiteliales.

A pesar de la identificación previa de numerosos secretagogos mucosos, no han sido previamente aclaradas las vías de señalización comunes y las moléculas intracelulares implicadas en la secreción de mucina. La presente invención aprovecha el descubrimiento inesperado de que la proteína del sustrato de quinasa C rica en alanina miristolada (conocida por sus siglas en inglés, MARCKS) está implicada en el proceso secretorio de las células, y, concretamente, en la secreción mucosa de células epiteliales (tales como célula de copa). La proteína MARCKS es un sustrato celular mayor para la proteína quinasa C (PKC), y los estudios de los presentes inventores indican que es una molécula central, convergente, que controla la liberación de gránulos de mucina. Aún no queriendo estar limitados por una única teoría de la presente invención, la secreción mucosa relacionada con MARCKS parece implicar la interacción de secretagogos de mucina con células epiteliales (de copa) de las vías

respiratorias y la activación de dos quinasas proteínicas independientes: PKC y PKG. El PKC activado fosforila la MARCKS, provocando su translocación desde la membrana de plasma al citoplasma, donde se convierte en objeto para la membrana de gránulos de mucina con la asistencia de proteínas asociadas a MARCKS. La PKG, activada a través de la vía (NO)-cGMP-PKG, a su vez, activa una fosfatasa 2 A de proteína citoplásmica (PP2A), que defosforila la MARCKS, estabilizando su adherencia a la membrana granular y permitiendo que MARCKS reticule filamentos de actina, atando, en consecuencia, el gránulo al citoesqueleto para movimiento y exocitosis. Esta vía de señalización propuesta es descrita, de forma general, en la Figura 4.

Los actuales inventores identificaron ARNm MARCKS y proteína en células epiteliales bronquiales humanas, y tanto el ARNm como los niveles de proteína se incrementaron con diferenciación celular secretoria *in vitro*. La MARCKS de estas células fue fosforilada por estero de forbol PMA (acetato 13 de miristato 12 de forbol), mientras que la subsiguiente adición de un activador de cGMP (8-bromo-cGMP), provocó la desfosforilación. La secreción de mucina provocada (esto es, estimulada) por el trifosfato de uridina secretagoga patofisiológicamente relevante (UTP) (o por una combinación de PMA y 8-bromo-cGMP) fue inhibida en una forma dependiente de la dosis por un fragmento de péptido miristoilado de la zona N-terminal de la proteína MARCKS (la ubicación propuesta de la adherencia de la proteína a las membranas de gránulos). Consecuentemente, este fragmento de péptido miristoilado de la zona N-terminal de la proteína MARCKS, además de otros fragmentos de péptidos activos, son útiles en procedimientos de inhibición de la secreción mucosa. Como se describe *infra*, se ha descubierto que la administración de ciertos fragmentos activos de la proteína MARCKS son capaces tanto de incrementar como de disminuir la secreción mucosa por células epiteliales secretoras de moco.

Estos inventores han descubierto que los oligonucleótidos antisentido dirigidos contra la proteína MARCKS bloquean o inhiben la secreción de mucina, como se describe *infra*. Consecuentemente, dichos oligonucleótidos antisentido encuentra su uso en procedimientos de inhibición de secreción mucosa.

Adicionalmente, ciertos inhibidores no proteínicos de componentes de la vía de señalización de la secreción mucosa ilustrados en la Figura 4 inhiben la secreción mucosa en células secretoras de moco, y son, así, útiles en la práctica de los procedimientos descritos aquí. Por ejemplo, los inhibidores de PKC tales como calfoestina C, inhibidores de GMP cíclico tal como Rp-8-br-PET-cGMP, inhibidores de PKG tales como Rp-8-br-PET-cGMP, inhibidores de ciclasa de guanililo soluble tales como LY83585 e inhibidores de fosfatasa tales como ácido okadaico, cada uno de ellos inhibe la secreción de mucina en células estimuladas por los secretatogogos relacionados *supra*. Consecuentemente, dichos inhibidores de componentes de la vía de señalización de secreción de mucina tienen uso en procedimientos de inhibición de secreción mucosa.

Otros compuestos que tienen uso son aquellos que incrementan la cantidad (esto es, la concentración) de proteína MARCKS en una célula secretora de moco. Se ha descubierto que tales componentes incrementan la secreción mucosa en estas células. Aunque no se conocen los mecanismos de cómo estos componentes incrementan el nivel o cantidad de proteína MARCKS en la célula, los posibles mecanismos incluyen (1) modulación transcripcional de la producción de ARNm MARCKS (por ejemplo, por enlace o alteración de factores de transcripción, u otros mecanismos de modulación de transcripción) por estos compuestos, directa o indirectamente, y (2) control translacional o modulación de la expresión de proteína MARCKS (por ejemplo, por enlace en la zona regulatoria previa del ARNm MARCKS, alterando así potencialmente la estructura secundaria que inhibe la cantidad de proteína MARCKS expresada) por estos componentes, bien directa o indirectamente. Tal y como se describen aquí, los compuestos que incrementan la cantidad de proteína MARCKS en células secretoras de moco pueden ser proteínas, péptidos o compuestos no proteínicos. En una realización, el compuesto es un lipopolisacárido (LPS) bacteriano. Preferiblemente, el compuesto es una proteína o péptido. En una realización especialmente preferida, el compuesto es una citoquina. En una realización más especialmente preferida, el compuesto que incrementa la cantidad de proteína MARCKS en una célula secretora de moco es el Factor alfa de Necrosis Tumoral de citoquina (conocido por sus siglas en inglés, TNF- $\alpha$ ).

La presente invención describe así procedimientos y composiciones útiles para la regulación (incremento o disminución) de secreción mucosa. Tales procedimientos y composiciones son útiles en el tratamiento de afecciones médicas en las que tiene lugar la hipersecreción mucosa, y son especialmente útiles en el tracto respiratorio. Los procedimientos y composiciones pueden ser útiles en el tratamiento afecciones médicas en las que se desea incrementar la secreción mucosa.

Los procedimientos y composiciones de la presente invención pueden ser usados para inhibir o reducir la secreción mucosa que tiene lugar a partir de cualquier célula de secreción mucosa (tales como células de copa) o tejido (tales como membranas mucosas de las vías respiratorias). No deseando estar limitados por una teoría en especial, estos inventores creen también que las composiciones y procedimientos pueden ser también usados para bloquear la secreción de mediadores inflamatorios de células tales como macrófagos, neutrófilos y mastocitos. De esta forma, las presentes composiciones inhibitorias del moco pueden tener una doble función de disminuir tanto la secreción mucosa como la inflamación.

Como se discute *infra*, también se describen fragmentos de péptido activo de proteína MARCKS que muestran un efecto bimodal cuando se distribuyen a células secretoras de moco. En un determinado nivel de

dosificación (una cantidad fortalecedora del moco), tales péptidos incrementan o fortalecen la secreción mucosa (comparado con lo que sucedería en ausencia de dicho tratamiento). En un diferente nivel de dosificación, este reforzamiento no se observa. Una dosificación aún más extrema tiene como resultado la inhibición de o disminución en la secreción mucosa (en comparación con lo que ocurriría en ausencia de dicho tratamiento).

Consecuentemente, se describen procedimientos y composiciones para la regulación de la secreción mucosa, por la regulación de los efectos de la proteína MARCKS en la vía de secreción mucosa. Tal regulación puede ser conseguida por la administración de fragmentos activos de proteína MARCKS en cantidades pre – determinadas, administración de cantidades inhibitorias del moco de oligonucleótidos antisentido MARCKS, o administración de estas u otras composiciones (solas o en combinación) que fortalecen o inhiben la vía secretoria relacionada con MARCKS. Tales composiciones incluyen aquellas que bloquean el acto de enlace de la proteína MARCKS desfosforilada que lleva a la liberación de mucina. Tales composiciones pueden enlazar y bloquear la zona que está enlazada por proteína MARCKS endógena, o puede enlazar con la proteína MARCKS en el punto pertinente. Se cree que el péptido MANS aquí descrito compete con la proteína MARCKS endógena por el punto de enlace pertinente en la célula, bloqueando así la liberación mediada por MARCKS de mucina en el interior de la célula. De forma alternativa, se prevería que un anticuerpo dirigido a la secuencia terminal N de la proteína MARCKS (por ejemplo, la secuencia MANS) enlazaría con la proteína MARCKS endógena y bloquearía el enlazado.

No deseando estar limitados por una teoría en especial, se cree que las composiciones que incrementa la secreción mucosa relacionada con MARCKS cuando se administran a una célula secretora de moco (tal como el péptido MA-PSD; número de identificación secuencial:2) pueden estar enlazando a proteínas endógenas en la célula que, de otra forma, se enlazarían con la proteína MARCKS e inhibirían a MARCKS de completar una fase en la vía de secreción mucosa. La calmodulina es uno de tales inhibidores endógenos de MARCKS; la calmodulina enlaza con MARCKS e impide la fosforilación, impidiendo así que la proteína MARCKS se desvincule de la membrana de plasma. La expresión usada aquí de “inhibidores endógenos de proteína MARCKS” son composiciones presentes, de forma natural, en una célula que se enlaza con una proteína MARCKS e impide que se complete una etapa en la vía de secreción mucosa relacionada con MARCKS. Un péptido u otra composición que se enlaza con un inhibidor de MARCKS dejaría más proteína endógena MARCKS libre para funcionar en la vía de secreción mucosa. Así, un procedimiento para incrementar la secreción mucosa es el administrar a una célula secretora de moco, un compuesto que enlaza con un inhibidor de proteína MARCKS.

Será deseable, en muchas situaciones terapéuticas, el mantenimiento de algún nivel de secreción (esto es, un nivel basal o normal), para los efectos protectores del moco. El mantenimiento de la secreción mucosa basal puede ser conseguido por la regulación de la dosis del componente activo utilizado. Adicionalmente, no deseando estar limitados por una teoría en especial, estos inventores sugieren que, en algunas membranas mucosas, un nivel basal de secreción mucosa puede ser mantenido por una vía separada de la vía relacionada con MARCKS y la secreción mucosa estimulada.

La presente invención proporciona procedimientos y composiciones aptas para disminuir o reducir la hipersecreción mucosa que se da en muchas dolencias patológicas, incluidas las dolencias patológicas relacionadas con causas inflamatorias, víricas, bacterianas o genéticas. En concreto, los procedimientos y composiciones actuales proporcionan procedimientos para tratar enfermedades de las vías respiratorias en las cuales la secreción mucosa se incrementa en relación con lo que se da en la ausencia de la enfermedad (esto es, se incrementa por encima de los niveles basales, o sobre los niveles de secreción mucosa que se dan normalmente). Los sujetos que van a ser tratados por los procedimientos actuales incluyen sujetos humanos y no humanos. Los sujetos no humanos incluyen animales de compañía tales como perros y gatos, además de semovientes como ganado, caballos, ovejas y cerdos.

Los procedimientos y composiciones actuales pueden ser usadas para reducir la secreción mucosa, o para inhibir la hipersecreción mucosa en cualquier epitelio secretorio, o célula epitelial, incluyendo, pero no limitado a células epiteliales de las vías respiratorias (por ejemplo, orales, nasales, bronquiales), células epiteliales oculares, células epiteliales gástricas o intestinales, y células epiteliales que cubren el tracto reproductor (por ejemplo, vaginal, cervical). Como será evidente para los expertos en la materia basándose en el sujeto y en la dolencia que van a ser tratados, puede ser deseable mantener un nivel basal de secreción mucosa, mientras que se reduce la hipersecreción del moco. Tal como se usa aquí un tratamiento que reduce o inhibe la secreción mucosa se refiere a un tratamiento que reduce la cantidad de moco secretado en comparación con lo que sucedería en el sujeto en ausencia de dicho tratamiento.

Se describe ulteriormente un procedimiento y composiciones para incrementar o estimular la secreción mucosa por células epiteliales, incluyendo, pero no limitado a, células epiteliales de vías respiratorias, células epiteliales oculares (epitelio corneal o conjuntivo), células epiteliales gástricas o intestinales, y células epiteliales que cubren el tracto reproductor. Usado aquí, un tratamiento que incrementa, fortalece o estimula la secreción mucosa hace referencia a un tratamiento que incrementa la cantidad de moco secretado en comparación con lo que ocurriría en ausencia de dicho tratamiento. En concreto, los procedimientos y composiciones actuales son útiles para incrementar la secreción de moco por células epiteliales oculares (para tratar afecciones de sequedad ocular), y por células epiteliales vaginales (para tratar la sequedad vaginal).

Los péptidos y compuestos de la presente invención bloquean la secreción mucosa en respuesta a activadores conocidos de PKC y proteína quinasa G (Figura 1), y a estímulos fisiológicamente relevantes (por ejemplo, UTP) (Figura 2).

La presente invención proporciona así procedimientos y composiciones para tratar células epiteliales o tejido epitelial, donde es deseable disminuir la cantidad de moco secretado por las células o tejido. También se describen procedimientos y composiciones para el tratamiento de células epiteliales o tejido epitelial, donde es deseable disminuir la cantidad de moco secretado por las células o tejido. En concreto, la presente invención proporciona procedimientos y composiciones para tratar afecciones respiratorias donde es deseable disminuir la cantidad de moco presente en las vías respiratorias. Las afecciones adecuadas para su tratamiento por estos procedimientos incluyen enfermedades de las vías respiratorias, humanas y animales, inflamatorias, víricas o bacterianas (por ejemplo, asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, resfriado común, rinitis, bronquitis aguda o crónica, neumonía, y tos de las perreras), afecciones alérgicas (atopia, inflamación alérgica), bronquiectasia y ciertas afecciones genéticas (por ejemplo, fibrosis quística).

### **SECRECIÓN MUCOSA EN LAS VÍAS RESPIRATORIAS**

La secreción mucosa normal en el pulmón juega un importante papel en la eliminación de partículas extrañas inhaladas y patógenos de las vías respiratorias. El moco atrapa las partículas inhaladas y es entonces, a su vez, eliminado de las vías respiratorias por acción ciliar o por la tos. La existencia de niveles superiores a los normales de secreción mucosa (hipersecreción) en las vías respiratorias puede llevar a una acumulación mucosa intraluminal, resultando en obstrucción del flujo de aire y una susceptibilidad incrementada a agentes infecciosos. Las células secretoras en las vías respiratorias incluyen glándulas sub – mucosas y células mucosas epiteliales superficiales (células de copa).

La secreción mucosa de las vías respiratorias es una importante determinación en la prognosis y características clínicas de las enfermedades pulmonares. La hipertrofia y/o hiperplasia de células secretoras de las vías respiratorias (glándulas bronquiales y células de copa epiteliales) se encuentran a menudo en afecciones asociadas con inflamación crónica de las vías respiratorias. En sujetos con bronquitis crónica y asma bronquial, se ha observado hiperplasia de células de copa, con un incremento de dos a tres veces de los números de células de copia en comparación con los controles. Cutz et al., *Histopathology*, 2:407-421 (1978), Glynn & Michaels Thorax 15:142-153 (1960). La inflamación de las vías respiratorias puede inducir la hipersecreción mucosa por múltiples mecanismos, incluyendo la liberación de mediadores químicos de los tejidos y células de alrededor. La hipersecreción de mucosa de las vías respiratorias es un descubrimiento clínico especialmente dominante en fibrosis quística, bronquitis, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (conocida por sus siglas en inglés, COPD), enfisema, y asma bronquial. Ver, por ejemplo, *Airway Secretion*, Takishima y Shimura (Editores), Marcel Dekker Inc., 1994. La presencia de excesivo moco bronquial puede llevar a fallo respiratorio e infección bacteriana. Los pulmones de los pacientes muestran a menudo, en las autopsias, la presencia de una mucosidad bronquial excesiva y conexión mucosa. Los procedimientos de reducción de la secreción mucosa de vías respiratorias serían útiles para el tratamiento de tales afecciones, además de para el tratamiento de infecciones bacterianas o víricas (por ejemplo, neumonía, gripe y el resfriado común); en animales, tales procedimientos son además útiles para el tratamiento de tos de las perreras y enfermedad pulmonar obstructiva crónica equina.

En la actualidad se utilizan diversos procedimientos para reducir la secreción mucosa cuando es necesario en estados patológicos. Algunas terapias actúan para disminuir las señales o estímulos que sobrerregulan la secreción mucosa. Por ejemplo, los mediadores inflamatorios puede sobrerregular la secreción mucosa; los tratamientos con esteroides se usan a menudo para disminuir la inflamación y, así, disminuyen, indirectamente, la secreción mucosa. Se usan antihistaminas para bloquear las respuestas a alérgenos que pueden desencadenar ataques de asma alérgica. El moco engrosado presente en pacientes con fibrosis quística es eliminado por terapia de compresión, y las infecciones que tienen lugar debido al moco engrosado son tratadas con antibióticos. Los procedimientos y composiciones de la presente invención varían de los tratamientos *supra* en que la secreción celular de moco en respuesta a una variedad de estímulos es directamente bloqueada al nivel celular.

### **CAPA MUCOSA OCULAR**

La capa mucosa sobre la superficie ocular es importante para el mantenimiento y expansión de la película lacrimonal, y se necesita para un funcionamiento normal de los ojos. El epitelio de la superficie ocular ha demostrado expresar múltiples genes de mucina. Gipson, *Adv. Exp. Med Biol.* 438:221 (1998). Diversas enfermedades y síndromes tienen como resultado dolencias de "sequedad ocular", incluyendo la queratoconjuntivitis seca, el síndrome de Stevens-Johnson, pénfigo ocular, y sequedad ocular inducida por cirugía o radiación. El epitelio de la superficie ocular sufre cambios en tales enfermedades, cambios que pueden incluir pérdida de células de copa, deficiencia en mucina, y queratinización. Se han comprobado menores densidades de células de copa en el epitelio ocular en estos síndromes. Ralph, *Invest. Ophthalmol.* 14:299 (1975).

Además de los sujetos a los que la sequedad ocular produce malestar en la vida diaria, muchos individuos tienen sequedad ocular "marginal" que puede presentar dificultades sólo cuando el sujeto intenta llevar lentes de

contacto. La intolerancia a las lentes de contacto se debe frecuentemente a una película lacrimal insuficiente. Jurkus et al., *J. Am. Optom. Assoc.* 65:756 (1994); Toda et al., *Br. J. Ophthalmol.* 80: 604 (1996). Los tratamientos existentes para sequedad ocular incluyen el uso tópico de tretinoína (Tseng, *J. Am. Acad. Dermatol.* 15:860 (1986)) o ácido retinoico (Driot & Bonne, *Invest. Ophthalmol.* 33:190 (1992)).

Es deseable un incremento de la secreción mucosa en los ojos cuando una falta de mucosa ocular afecta a la función normal del ojo. Adicionalmente, el incremento de la secreción mucosa en el ojo es deseable como una ayuda al llevar lentes de contacto.

## **ADMINISTRACIÓN**

El procedimiento descrito aquí puede ser usado para reducir (esto es, disminuir o inhibir) o fortalecer (esto es, incrementar o estimular) la producción de secreciones mucosas por membranas mucosas o células secretoras de moco, en un sujeto que necesite tal tratamiento por cualquier razón. El uso de procedimientos de administración conocidos en el estado de la técnica, las terapias actuales pueden estar dirigidas a las membranas mucosas o células secretoras de mucosa de un concreto órgano objeto (incluyendo, de forma no exhaustiva, la cavidad oral, la cavidad nasal, los pulmones, el tracto gastrointestinal, el ojo y el tracto reproductivo), con objeto de reducir o incrementar la cantidad de moco secretado por, o retenido sobre, las superficies que están siendo tratadas. El cambio (reducción o incremento) en la mucosidad es medido en comparación al que estaba presente con anterioridad al tratamiento (o en ausencia de tratamiento), o con lo que podría esperarse en la ausencia de dicho tratamiento en vista de la dolencia del sujeto.

Los procedimientos descritos aquí pueden ser usados en conjunción con otras terapias o compuestos, incluyendo fases para eliminar las secreciones de mucosa retenidas de las vías respiratorias de sujetos previamente a la fase de administración de los presentes compuestos. Esto facilita la aplicación del agente activo al epitelio respiratorio durante la fase de administración. Tal eliminación de secreciones mucosas retenidas puede ser llevada a cabo por cualquier medio físico o médico adecuado conocido en el estado de la técnica.

La administración vía mucosa de drogas basadas en péptidos se discute en Chien, *Novel Drug Delivery Systems*, Capítulo 4 (Marcel Dekker, 1992); la administración nasal se discute en Chien, *supra*, en Capítulo 5. Ver también, Chang et al., *Nasal Drug Delivery, "Treatise on controlled Drug Delivery"*, Capítulo 9 (Marcel Dekker, 1992). Los agentes conocidos por incrementar la absorción de drogas a través de la piel son descritos en Sloan, Capítulo 5, *"Prodrugs: Topical and Ocular Drug Delivery"* (Marcel Dekker, 1992). Los péptidos de la presente invención pueden ser administrados en células objeto directamente, por ejemplo usando liposomas. Se espera que los expertos en la materia puedan adaptar dichas técnicas y otras técnicas de administración de sustancias para su uso con las composiciones de la presente invención sin experimentaciones indebidas.

Las composiciones farmacéuticas para uso en el presente procedimiento de tratamiento incluyen las aptas para su administración por inhalación, oral, rectal, vaginal, tópica (incluyendo bucal, dérmica y ocular). Las composiciones pueden ser preparadas por cualquiera de los procedimientos conocidos en el estado de la técnica. La vía de administración más adecuada en cualquier caso dependerá de la ubicación del tejido que va a ser tratado, la naturaleza y severidad de la dolencia que está siendo tratada, y el compuesto activo concreto que se está usando, como será evidente a los expertos en la materia. La dosificación del componente activo para el tratamiento de las enfermedades del tracto respiratorio variará dependiendo de la dolencia que está siendo tratada y el estado del sujeto. Un experto en la materia será capaz de determinar las dosificaciones apropiadas de compuestos específicos sin experimentaciones indebidas, usando estudios de respuesta a dosis como se conocen en el estado de la técnica.

Los compuestos activos divulgados aquí pueden ser administrados a las vías respiratorias de un sujeto por cualquier medio adecuado, pero son administrados preferiblemente por la generación de un aerosol que comprenda partículas respirables que comprendan el compuesto activo y que sean inhaladas por el sujeto. Las partículas respirables pueden ser líquidas o sólidas. Las partículas pueden, opcionalmente, contener otros ingredientes terapéuticos (ver, por ejemplo, la patente US número 5.849.708 concedida a Molina y Vedia et al.).

En los procedimientos de tratamiento de los bronquios y/o alvéolos, las partículas compuestas de componente activo para la práctica de la presente invención deberían incluir partículas de tamaños respirables: esto es, partículas de un tamaño lo suficientemente pequeño como para pasar a través de la boca y la laringe al ser inhaladas y al interior de los bronquios y alvéolos de los pulmones. En general, son respirables las partículas que vayan de alrededor de 0.5 a 10 micrones de tamaño (más en concreto, menos de alrededor de 5 micrones de tamaño). Las partículas de tamaño no respirable incluidas en el aerosol tienden a depositarse en la garganta y ser tragadas, y la cantidad de partículas no respirables en los aerosoles dispuestos para el tratamiento de los alvéolos y/o bronquios es, preferiblemente, mínima. Para la administración nasal, un tamaño de partícula del orden de 10-500 micrones es preferible para asegurar la retención en la cavidad nasal.

Las composiciones farmacéuticas líquidas de componente activo para producir un aerosol pueden ser preparadas por combinación del componente activo con un portador adecuado, tal como agua destilada libre de pirógeno.

La administración de los componentes activos puede ser llevada a cabo de forma terapéutica o profiláctica (por ejemplo, antes de que haya tenido un sustancial bloqueo pulmonar debido a las secreciones mucosas retenidas, o en el momento en dichas secreciones retenidas hayan sido al menos parcialmente eliminadas, como se discutió *supra*).

Los aerosoles de partículas líquidas que comprendan el compuesto activo pueden ser producidos por cualquier medio adecuado, tal como con un nebulizador. Ver, por ejemplo, patente US número 4.501.729. Los nebulizadores son dispositivos disponibles en el mercado que transforman soluciones o suspensiones del ingrediente activo en una nube de aerosol terapéutico o bien por medio de la aceleración de un gas comprimido, generalmente aire u oxígeno, a través de un orificio *venturi* estrecho o por medio de agitación ultrasónica. Las formulaciones adecuadas para su uso en nebulizadores consisten en el ingrediente activo en un portador líquido, generalmente agua o una solución alcohólica acuosa diluida, y que ha sido hecha isotónica con líquidos corporales.

Los aerosoles de partículas líquidas que comprenden el componente activo pueden ser, de la misma forma, producidos con cualquier generador de aerosol medicinal de partículas sólidas. Un tipo ilustrativo de generador de aerosol de partículas sólidas es un insuflador.

Las formulaciones adecuadas para administración oral pueden estar presentadas en unidades discretas, tales como cápsulas, cachets, rombos o tabletas, cada una de ellas conteniendo una cantidad predeterminada del componente activo; como un polvo o gránulos; como una solución o una suspensión en un líquido acuoso o no acuoso; o como una emulsión de aceite en agua o de agua en aceite. Tales formulaciones pueden ser preparadas por cualquier procedimiento farmacéutico adecuado que incluya la fase de asociar el componente activo y un portador adecuado (que puede contener uno o más ingredientes accesorios como se señaló *supra*). Las formulaciones para administración oral pueden incluir, opcionalmente, revestimientos entéricos conocidos en el estado de la técnica para impedir la degradación de la formulación en el estómago y proporcionar la liberación de la droga en el intestino delgado.

Las formulaciones adecuadas para administración rectal o vaginal pueden ser presentadas como supositorios de dosis unitaria. Estos pueden ser preparados por mezcla del compuesto activo con uno o más portadores sólidos convencionales, por ejemplo, manteca de cacao, y, entonces, dar forma a la mezcla resultante.

## **PÉPTIDOS**

El sustrato de proteína de quinasa C rico en alanina miristoilada (MARCKS) es un sustrato celular principal para la proteína de quinasa C. La MARCKS se regula en una forma específica celular, textil y de estado de desarrollo y la expresión de MARCKS puede ser estimulada por diversas citoquinas. La MARCKS ha sido identificada en especies humana, bovina, roedora y aviar. Harlan et al., *J. Biol.Chem.* 266:14399 (1991); Graff et al., *J.Biol.Chem.* 266:14390 (1991); Graff et al., *Mol. Endocrinol.* 3:1903 (1989); Stumpo et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:4012-16 (Junio 1989).

Los péptidos que se corresponden con la proteína MARCKS están disponibles en el mercado. Un "péptido psd" MARCKS se comercializa por la casa BIOMOL (Plymouth Meeting, Pennsylvania), teniendo la secuencia KKKKKRFSFK KSKLGSF KKNKK (número de identificación secuencial: 2). Ver P. Blackshear, *J.Biol.Chem.* 268:1501 (1993).

Estos inventores han identificado dos fragmentos específicos activos de la proteína MARCKS que son capaces de afectar la secreción mucosa. Un polipéptido miristoilado, de longitud de 24 amino ácidos, con secuencia de ácido mirístico – GAQFSKTAAGGAAAERPGEAAVA (número de identificación secuencial: 1), es aludido aquí como péptido MANS para la secuencia terminal N miristolada. El péptido inhibe la secreción de moco de las membranas mucosas y de las células secretoras de moco, incluyendo células epiteliales de vías respiratorias humanas. Los datos de estos inventores sugieren que este péptido bloquea la adhesión de proteína MARCKS al gránulo de mucina, bloqueando o inhibiendo así la liberación de gránulos de mucina y la secreción de moco por la célula.

Fue también examinado un segundo péptido que se corresponde a la zona PSD (fosforilación) de MARCKS. En algunas concentraciones, este péptido estimula la secreción mucosa, mientras que en otras dosis (más elevadas) no tiene efecto sobre la secreción estimulada (Figura 3), y se predice que dosis incluso más elevadas disminuirían la secreción mucosa estimulada. La secuencia de péptido PSD es ácido mirístico-KKKKKRFSFKKSKLGSF KKNKK (número de identificación secuencial: 2), aludido aquí como el péptido MA-PSD. Sin pretensión de estar condicionados por una única teoría subyacente a la presente invención, estos inventores creen que los fragmentos de proteína MARCKS que son capaces de incrementar la secreción mucosa (tales como el péptido MA-PSD, número de identificación secuencial: 2), puede estar enlazando a proteínas endógenas en la célula que inhiben, competitivamente, la fosforilación de MARCKS, inhibiendo así la liberación de MARCKS de la membrana de plasma hacia el interior de la célula (ver Figura 4). Tal inhibidor de fosforilación de MARCKS ES la calmodulina. Otros "inhibidores de MARCKS", a los fines de la presente invención, son aquellos

compuestos endógenos que impiden que la proteína MARCKS complete un paso necesario en la camino de la secreción mucosa. Los inhibidores de MARCKS pueden actuar así para inhibir la fosforilación o la desfosforilación de MARCKS (cada una de las cuales es necesaria en el presente camino), o enlazar con MARCKS para impedir su enlace con la membrana de gránulo de mucina. Los compuestos de la presente invención que incrementan la secreción mucosa pueden actuar por enlace con tales inhibidores endógenos, liberando así las proteínas MARCKS endógena de completar el camino de secreción mucosa.

Así, los fragmentos de péptidos de las proteínas MARCKS puede estar diseñados, analizados y seleccionados por su capacidad para inhibir o reforzar la secreción mucosa, usando la presente divulgación y procedimientos del estado de la técnica.

Las secuencias nucleótidas y amino ácidas de cADN MARCKS y proteína humanas, como se informa por Harlan et al., J.Biol.Chem. 266:14399 (1991) (Acceso a GenBank nº M68956) son suministradas como número de identificación secuencial: 3 y número de identificación secuencial:4. Las secuencias nucleótidas y amino ácidos de cADN MARCKS y proteína humanas, como se informa por Sakai et al., Genomics 14:175 (1992) son suministradas como número de identificación secuencial: 5 y número de identificación secuencial: 6. Una publicación adicional Harlan et al., J.Biol.Chem. 266:14399 (1991) proporciona una secuencia nucleótida para MARCKS humana que difiere de la de Sakai et al. en los nucleótidos 619 y 724; en esta secuencia, G es sustituido por T en la posición 619 y C es sustituido por G en la posición 724. Serían de esperar variantes alélicas de proteínas MARCKS humanas y otras.

Sin pretensión de estar condicionados por una única teoría subyacente a la presente invención, estos inventores proponen que el camino para la implicación de MARCKS en la secreción mucosa del epitelio de las vías respiratorias es como se muestra en la Figura 4. Se cree actualmente que los fragmentos de péptido activo de MARCKS afectan a la secreción mucosa al nivel de la interacción de MARCKS con los gránulos de mucina, que contienen los principales componentes proteínicos del moco. Como se muestra en la Figura 4, estos inventores creen que MARCKS debe ser desfosforilado para enlazarse con el gránulo de mucina, que desencadena la exocitosis de mucina y tiene como resultado la secreción mucosa.

Los procedimientos de la presente invención incluyen el uso de moléculas de ADN aisladas que codifican los péptidos de la presente invención. Tales moléculas de ADN aisladas son útiles para producir los péptidos terapéuticos, y pueden ser usadas adicionalmente en un vector de expresión génica apropiada, utilizando procedimientos del estado de la técnica para la expresión del péptido *in vivo*. Pueden ser usados promotores específicos celulares o inducibles para controlar la expresión del péptido terapéutico *in vivo*. Los procedimientos de suministro de ADN codificador de un péptido deseado para conseguir un efecto terapéutico se divulgan, por ejemplo, en la Patente US nº 5.580.859 y 5.703.055, concedidas a Felgner et al.

Se describen análogos de los péptidos terapéuticos divulgados aquí. Usado aquí, el término "análogo" es un compuesto químico similar en su estructura a un primer compuesto, y con una acción fisiológica similar al mismo. En referencia concreta a la presente invención, los análogos de péptido MARCKS son aquellos compuestos que, aún no teniendo las secuencias amino ácidas exactas del fragmento MARCKS originario, son capaces de enlazar con los mismos lugares que el fragmento MARCKS originario. Tales análogos pueden ser análogos de péptido o no – péptido, incluyendo análogos de ácido nucleico, según se describe en ulterior detalle *infra*.

En moléculas de proteína que interactúan con un receptor, la interacción entre la proteína y el receptor debe tener lugar en zonas de superficie, accesibles, en una molécula tridimensional estable. Al disponer los residuos de la zona crítica de enlace en una conformación apropiada, los péptidos que mimetizan las características esenciales de superficie de los enlazantes p20 puede ser diseñados y sintetizados de acuerdo con técnicas conocidas.

Los procedimientos para determinar la estructura tridimensional del péptido y los análogos son conocidos, y, a veces, se les llama "técnicas de diseño racional de drogas". Ver, por ejemplo, la patente US nº 4.833.092, concedida a Geysen; La patente US nº 4.859.765 concedida a Nestor; la patente US nº 4.853.871 concedida a Pantoliano; la patente US nº 4.863.857 concedida a Blalock; ver también Waldrop, Science, 247, 28029 (1990); Rossman, Nature, 333, 392-393 (1988); Weis et al., Nature, 333, 426-431 (1988); James et al., Science, 260, 1937 (1993) (desarrollo de compuestos peptidomiméticos de benzodiazepinas basados en la estructura y función de enlazantes tetrapéptidos).

En general, los expertos en la materia apreciarán que pueden ser realizadas omisiones o sustituciones menores de las secuencias amino ácidas de péptidos de la presente invención sin afectar de forma indebidamente adversa a la actividad de los mismos. En los péptidos que contienen sustitutos o reemplazos de amino ácidos, uno o más amino ácidos de una secuencia de péptidos pueden ser reemplazados por uno o más amino ácidos cuando tal reemplazo no afecte la función de dicha secuencia. Tales cambios pueden ser guiados por similitudes conocidas entre amino ácidos en relación con características físicas como densidad de carga, hidrofobia/hidrofilia, tamaño y configuración, de tal forma que los amino ácidos son sustituidos con otros amino ácidos que tienen esencialmente las mismas propiedades funcionales. Por ejemplo: Ala puede ser reemplazado con Val ó Ser; Val puede ser reemplazado con Ala, Leu, Met, ó Tie, preferiblemente Ala ó Leu; Leu puede ser reemplazado con Ala, Val ó Ile,

preferiblemente Val ó Ile; Gly puede ser reemplazado con Pro ó Cys, preferiblemente Pro; Pro puede ser reemplazado con Gly, Cys, Ser ó Met, preferiblemente Gly, Cys, ó Ser; Cys puede ser reemplazado con Gly, Pro, Ser, ó Met, preferiblemente Pro ó Met; Met puede ser reemplazado con Pro ó Cys, preferiblemente Cys; His puede ser reemplazado con Phe o Gln, preferiblemente Phe; Phe puede ser reemplazado con His, Tyr, ó Trp, preferiblemente His ó Tyr; Tyr puede ser reemplazado con His, Phe, ó Trp, preferiblemente Phe ó Trp; Trp puede ser reemplazado con Phe ó Tyr, preferiblemente Tyr; Asn puede ser reemplazado con Gln ó Ser, preferiblemente Gln; Gln puede ser reemplazado con His, Lys, Glu, Asn ó Ser, preferiblemente Asn ó Ser; Ser puede ser reemplazado con Gln, Thr, Pro, Cys ó Ala; Thr puede ser reemplazado con Gln o Ser, preferiblemente Ser; Lys puede ser reemplazado con Gln o Arg; Arg puede ser reemplazado con Lys, Asp ó Glu, preferiblemente Lys ó Asp; Asp puede ser reemplazado con Lys, Arg, o Glu, preferiblemente Arg ó Glu; y Glu puede ser reemplazado con Arg ó Asp, preferiblemente Asp. Una vez realizados, los cambios pueden ser rutinariamente explorados para determinar sus efectos en función de las enzimas.

Se describen también los miméticos no péptidos de los péptidos de la presente invención. El diseño de drogas no proteínicas puede ser llevado a cabo usando modelado gráfico por ordenador para diseñar moléculas orgánicas, no péptidas, que enlazan con lugares enlazados por los fragmentos MARCKS originarios divulgados aquí. Ver, por ejemplo, Knight, *BIO/Technology*, 8, 105 (1990). Itzstein et al, *Nature*, 363, 418 (1993); Lam et al, *Science*, 263, 380 (Jan. 1994) (diseño racional de ureas cíclicas no péptidas biodisponibles que funcionan como inhibidores de proteasa HIV). Pueden ser desarrollados también análogos por la generación de una genoteca de moléculas, seleccionar aquellas moléculas que actúan como enlaces para un objetivo especificado, e identificación y ampliación de los enlaces seleccionados. Ver, por ejemplo, Kohl et al., *Science*, 260, 1934 (1993). Se conocen técnicas para la construcción y exploración de genotecas combinatorias de biomoléculas oligoméricas para identificar aquellas que enlazan específicamente a una proteína receptora dada. Los oligómeros adecuados incluyen péptidos, oligonucleótidos, carbohidratos, no – oligonucleótidos (por ejemplo, oligonucleótidos de fosforotioato; ver Chein. *And Engineering News*, página 20, 7 Febrero 1994) y polímeros no péptidos (ver, por ejemplo, “peptoides” de Simon et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89, 9367 (1992)). Ver también Patente US nº 5.270.170 concedida a Schatz; Scott y Smith, *Science*, 249, 386-390 (1990); Devlin et al., *Science* 249, 404-406 (1990); Edgington, *BIO/Technology*, 11, 285 (1993). Las genotecas de péptidos pueden ser sintetizadas sobre soportes sólidos, o expresadas sobre la superficie de virus bacteriófagos (genotecas de despligue fágico). Los procedimientos de exploración conocidos pueden ser usados por los expertos en la materia para explorar genotecas combinatorias para identificar análogos de péptidos adecuados. Se conocen procedimientos en el estado de la técnica para conseguir que esas moléculas activas seleccionadas puedan ser identificadas. Ver, por ejemplo, Brenner y Lerner, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89, 5381 (1992); PCT U593/06948 concedida a Berger et al.; Simon et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89, 9367, (1992); Patente US Nº 5.283.173 concedida a Fields et al.

Usado aquí, el término “genoteca combinatoria” hace referencia a agrupaciones de diversas biomoléculas oligoméricas de diferente secuencia, que pueden ser exploradas simultáneamente por actividad como enlaces para un objetivo concreto. Las genotecas combinatorias pueden ser denominadas igualmente “genotecas de forma”, esto es, una población de polímeros aleatorios, que son enlaces potenciales. La forma de una molécula hace referencia a aquellas características de una molécula que gobiernan sus interacciones con otras moléculas, incluyendo Van der Maals, hidrofóbicas, electrostáticas y dinámicas.

Las moléculas de ácido nucleico pueden actuar también con enlaces para proteínas receptoras. Ver, por ejemplo, Edgington, *BIO/Technology*, 11, 285 (1993). La Patente US Nº 5.270.163 concedida a Gold y Tuerk describe un procedimiento para identificar enlaces para una molécula objeto dada por selección, de una genoteca de moléculas de ARN con secuencias aleatorias, aquellas moléculas que enlazan específicamente la molécula objeto. Un procedimiento para la selección *in vitro* de moléculas de ARN de reactividad cruzada inmunológica con un péptido específico se divulga en Tsai, Kenan y Keene, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89, 8864 (1992), y Tsai y Keene, *J. Immunology*, 150, 1137 (1993).

### **OLIGONUCLEÓTIDOS ANTISENTIDO**

Estos inventores han demostrado ulteriormente que los oligonucleótidos antisentido dirigidos contra ARNm MARCKS disminuyen (inhiben) la secreción mucosa en células epiteliales de las vías respiratorias humanas (Ver Ejemplo 6 y Figura 5).

Se ha demostrado que los oligonucleótidos antisentido que son complementarios a ARNs específicos pueden inhibir la expresión de genes celulares como proteínas. Ver Erickson e Izant, *Gene Regulation: Biology Of Antisense RNA and DNA*, Vol. 1, Raven Press, Nueva York, 1992. Por ejemplo, se ha informado de la inhibición selectiva de un gen p21 que difería de un gen normal por un único nucleótido. Chang et al., *Biochemistry* 1991, 30:8283-8286. Se han propuesto muchas hipótesis para explicar los mecanismos por los cuales oligonucleótidos antisentido inhiben la expresión génica, sin embargo, el mecanismo específico implicado puede depender del tipo celular estudiado, el ARN objeto, los lugares específicos en el ARN objeto, y la naturaleza química del oligonucleótido. Chiang et al., *J. Biol. Chem.* 1991, 266:18162-18171; Stein y Cohen, *Cancer Res.* 1988, 48:2659-2668.

Se han descrito oligonucleótidos sustancialmente complementarios a una secuencia nucleótida de proteína MARCKS que tienen lugar de forma endógena en una célula secretora de moco. Tales oligonucleótidos son útiles para disminuir la producción mucosa por células en las que son suministrados. La "secuencia nucleótida" hace referencia a un polinucleótido formado de una serie de unidades nucleótidas unidas. El término "sustancialmente complementario", usado aquí, hace referencia a aquella cantidad de complementariedad secuencial entre el oligonucleótido y una secuencia de nucleótida génica MARCKS que permite la hibridación inter – hileras bajo condiciones fisiológicas y permite que el oligonucleótido inhiba la expresión del gen MARCKS. La hibridación inter – hileras es la interacción entre el oligonucleótido y la secuencia nucleótida MARCKS. La potencia de formación de un híbrido inter – hileras estable puede ser determinado por los expertos en la materia utilizando procedimientos del estado de la técnica, como, por ejemplo, determinación de la temperatura de fusión para el híbrido por modelado matemático o análisis empírico, o hibridaciones de ácido nucleico de soporte sólido. (Ver, por ejemplo, Marmur y Doty, J. Mol. Biol. 1962, 5, 113).

Usado aquí, el término "secuencia nucleótida MARCKS" hace referencia a cualquier secuencia nucleótida derivada de un gen que codifique una proteína MARCKS, incluyendo, por ejemplo, secuencia de ADN o ARN, secuencia de ADN del gen, cualquier secuencia de ARN transcrita, secuencia de ARN del pre – ARNm o ARNm transcritos, y ADN o ARN enlazados con proteína.

Los oligonucleótidos hechos objetos de secuencias en los genes MARCKS pueden ser usados para inhibir la producción mucosa en células epiteliales. El oligonucleótido puede ser cualquier longitud de secuencia capaz de formar un híbrido estable con la secuencia nucleótida MARCKS endógena bajo condiciones fisiológicas. Se prefiere que la longitud del oligonucleótido sea de entre 5 y 200 nucleótidos. Se prefiere más que el oligonucleótido esté entre 10 y 50 nucleótidos de longitud. Se prefiere aún más que el oligonucleótido sea de entre 15 y 25 nucleótidos de longitud.

Los nucleótidos de los oligonucleótidos pueden ser cualquiera de los del estado de la técnica incluyendo grupos funcionales naturales y sintéticos. El término "oligonucleótido" usado aquí, hace referencia a un polinucleótido formado de nucleótidos unidos. Además, el término "oligonucleótido" incluye oligonucleótidos que se dan de forma natural u oligonucleótidos sintéticos formados de sub – unidades que se dan de forma natural o sub – unidades análogas diseñadas para conferir propiedades especiales en el oligonucleótido de tal forma que sea más estable en sistemas biológicos o enlace de forma más firme a secuencias objeto. También incluye modificaciones de los oligonucleótidos tales como enlazarlos químicamente con otros compuestos que fortalecerán el transporte a células o al núcleo y otros compartimentos de células. Los oligonucleótidos de la invención pueden ser sintetizados por cualquier procedimiento conocido en el estado de la técnica, incluyendo procedimientos químicos sintéticos. Ver, por ejemplo, Vu y Hirschbein, Tetrahedron Lett. 1991, 32:30005-30008. Los oligonucleótidos pueden ser modificados por la vía de procedimientos químicos conocidos por el experto en la materia, incluyendo la encapsulación en liposomas, o enlace químico a esteroides, anticuerpos y receptores celulares.

Se describe un oligonucleótido complementario a una secuencia nucleótida MARCKS endógena encontrada en la célula que va a ser tratada, o con la suficiente complementariedad para permitir una hibridación inter – hileras estable entre el oligonucleótido y un nucleótido MARCKS endógeno, y que inhibe la expresión del gen MARCKS. Un oligonucleótido preferido es el que sea complementario a una secuencia nucleótida MARCKS derivada o seleccionada de un mamífero, en concreto, un humano.

Los oligonucleótidos pueden ser oligodesoxirribonucleótidos u oligoribonucleótidos, incluyendo oligodesoxirribonucleótidos modificados u oligoribonucleótidos modificados. Además, los oligonucleótidos pueden estar comprendidos de combinaciones de oligodesoxirribonucleótidos u oligoribonucleótidos. Además, los oligonucleótidos pueden incluir también sub – unidades modificadas. Por ejemplo, pueden ser incluidos oligodesoxirribonucleótidos fosforotioatos. Se prefiere que los oligonucleótidos sean modificados para incrementar la estabilidad e impedir la degradación intracelular y extracelular. Se prefiere más que los oligonucleótidos ue secuencias objeto, y su transporte a las células y compartimentos celulares apropiados cuando son suministrados a un mamífero en forma farmacológicamente activa.

Se prefiere que los oligonucleótidos sean oligonucleótidos antisentido. Los oligonucleótidos pueden ser objeto de una parte con codificada de una MARCKS u objeto de secuencias codificadas del gen, y puede incluir una estructura intrón – exón (esto es, diversos nucleótidos en uno o en ambos lados de la estructura intrón – exón).

Los oligonucleótidos pueden ser administrados por cualquier procedimiento que produzca contacto de los oligonucleótidos con el tejido o célula objeto en el sujeto que está siendo tratado, incluyendo de forma no exhaustiva la administración oral, administración tópica, e inhalación. Las composiciones farmacológicas que comprenden los oligonucleótidos pueden estar en formas de dosificación sólidas, tales como cápsulas, tabletas y polvos, o en formas de dosificación líquida, tales como elixires, jarabes, y suspensiones. Las dosis administradas varía dependiendo de factores tales como: características farmacodinámicas; su forma y vía de administración; edad, salud, y peso del efecto deseado. Las dosis efectivas son las aptas para inhibir la producción mucosa en las vías respiratorias en un nivel que alivia, reduce o elimina los síntomas o afecciones relacionadas con la producción mucosa.

Los oligonucleótidos pueden ser administrados de forma individual, o en combinación con otros compuestos, otros compuestos farmacéuticos o terapias. Los oligonucleótidos se administran preferiblemente con un portador o diluyente farmacológicamente aceptable seleccionado sobre la base de la vía de administración seleccionada y la práctica farmacéutica normalizada.

La inhibición de la secreción de moco, por medio de la inhibición de la función de la proteína MARCKS en las células secretoras epiteliales, es punto central de esta invención. Para alcanzar este fin, la invención describe procedimientos de inhibición de secreción mucosa que comprenden el contactar una célula secretora de moco con una cantidad, inhibitoria de la expresión génica de MARCKS endógena, de un oligonucleótido sustancialmente complementario de una secuencia nucleótida génica de MARCKS endógena. La invención incluye también un procedimiento en el cual la fase de contacto comprende lipofectina como un portador para el oligonucleótido. Los oligonucleótidos de la invención se administran a mamíferos o aves, y preferiblemente, a humanos, en cantidades o concentraciones terapéuticamente efectivas, lo suficiente como para inhibir o reducir la producción mucosa en el tejido u órgano objeto.

Los oligonucleótidos será capaces de alcanzar su objetivo intracelular para inhibir o reducir la expresión de la proteína MARCKS en el mismo. La invención proporciona, por tanto, procedimientos para inhibir la secreción mucosa que comprenden el contactar al menos un elemento de la maquinaria de la expresión génica de MARCKS con una cantidad inhibitoria de la expresión génica de un oligonucleótido. A los fines de la invención, los elementos de la maquinaria de la expresión génica pueden comprender cualquier secuencia nucleótida de un gen MARCKS, la secuencia nucleótida de ARNms empalmados transcritos de un gen, ARNs no empalmados y ARNs parcialmente empalmados transcritos de un gen, híbridos de ADN-ARN que comprenden secuencias derivadas de un gen, tal como en genes activamente transcritos, ARN transcrito de un gen enlazado con proteína, y cualquier molécula o estructura de la que se conoce, en el estado de la técnica, su implicación en la expresión génica.

La Patente US nº 5.858.784, concedida a Debs et al., proporciona un procedimiento de administración de ácidos nucleicos a las células pulmonares de un sujeto por la preparación de una mezcla de ácido nucleico y liposoma apta para nebulización; nebulización de la mezcla y depósito de la mezcla nebulizada resultante en los pulmones del sujeto. La secuencia de ácido nucleico puede incluir secuencias de ADN que codifican polipéptidos que son responsables directos o indirectos de un efecto terapéutico, o secuencias de nucleótido activas tales como secuencias antisentido y ribozimas. Las construcciones de ácido nucleico pueden ser proporcionadas a las células del sujeto como cassettes génicos de expresión; preferiblemente, la construcción no se integra en el genoma celular huésped y se introduce en el huésped como parte de un vector de expresión no integrador.

### **ARN DE DOBLE HILERA Y RIBOZIMAS**

Se ha demostrado recientemente que la introducción de ARN de doble hilera exógeno (ARNdh) puede interrumpir, de forma específica, la actividad de genes que contienen secuencias homólogas, posiblemente por efectos post – transcripcionales. Montgomery et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:15502 (1998); Ngo et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:14687 (1998). Consecuentemente, los procedimientos descritos aquí pueden ser llevados a cabo por la introducción de ARNdh exógeno en una célula secretora de moco, en donde el ARNdh tiene suficiente similitud se secuencia con el ARN de un gen MARCKS endógeno para resultar en una reducción de proteína MARCKS en la célula (en comparación con la que tendría lugar en ausencia del ARNdh exógeno).

La administración de ARNdh puede ser llevada a cabo utilizando los procedimientos descritos *supra* en cuanto al péptido y la administración del oligonucleótido antisentido.

En una realización alternativa, puede ser introducido ADN codificador de una molécula enzimática de ARN (ribozima) en la célula objeto. Las ribozimas se dirigen contra la transcripción de ARNm de la proteína MARCKS endógena de la célula y se adhieren a la misma. El ADN que codifica las moléculas enzimáticas de ARN pueden ser producidas de acuerdo con técnicas conocidas (ver, por ejemplo, la patente US nº 4.987.071). La producción de tales moléculas enzimáticas de ARN e interrupción de producción de proteína MARCKS afecta a la producción mucosa por la célula objeto en esencialmente la misma forma que la producción de una molécula antisentido de ARN.

### **PROCEDIMIENTOS DE EXPLORACIÓN**

Se describe también un procedimiento de exploración de la capacidad de compuestos para afectar (reforzar o inhibir) la producción mucosa. Los procesos de química combinatoria, como se conocen en el estado de la técnica, pueden ser usados para generar grandes números de compuestos estructuralmente diversos, que pueden ser entonces explorados. Tales procedimientos de exploración comprenden el proporcionar un cultivo de células secretoras de moco, tales como los cultivos de células epiteliales bronquiales humanas normales descritas aquí en el Ejemplo 1. Se administra a las células un compuesto de evaluación, y dichas células pueden ser también expuestas a un compuesto del que se sepa que estimula la producción mucosa (por ejemplo, PMA, UTP, 8-bromo-cGMP). El compuesto de evaluación y el compuesto estimulador pueden ser administrados a las células, por ejemplo, por exposición de las mismas a medios conteniendo los compuestos. Las células pueden, por ejemplo, ser

primero pre – incubadas con el compuesto de evaluación, entonces co – incubadas con el compuesto estimulador y el compuesto de evaluación. De forma alternativa, la fase de pre – incubación puede ser descartada. La capacidad del compuesto de evaluación para enlazar o bien con la membrana del gránulo de mucina (o un receptor relacionado con la membrana de gránulo de mucina) o con proteína MARCKS endógena en el lugar de enlace de la membrana de gránulo de mucina es evaluada por la detección de si el compuesto de evaluación inhibe el enlace del MARCKS endógeno con el gránulo de mucina. Tal detección puede ser llevada a cabo usando procedimientos del estado de la técnica, por ejemplo, por marcado del compuesto de evaluación con una molécula detectable.

Son conocidas moléculas detectables por medios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inmunoquímicos, eléctricos y ópticos. Las moléculas ópticamente detectables incluyen marcadores fluorescentes (fluoresceína, sulforodamina 101 ácido cloruro [Rojo Tejas], proteína fluorescente verde). Se conocen procedimientos para ver células intactas, incluyendo microscopía de exploración con láser con – focal en tiempo real y microscopía de exploración con láser de dos fotones.

La mucosidad secretada por las células puede ser también medida después de un período de tiempo pre – determinado, por ejemplo usando una evaluación ELISA conocida en el estado de la técnica. La secreción mucosa de las células expuestas al compuesto de evaluación puede ser también comparada con las de las células de control que no fueron expuestas al compuesto de evaluación. Una disminución en la secreción mucosa por las células de evaluación comparadas con las células de control indica que el compuesto de evaluación inhibe la secreción mucosa, y un incremento en la secreción mucosa por las células de evaluación comparado con las células de control indica que el compuesto de evaluación fortalece la secreción mucosa.

Se proporcionan los siguientes ejemplos para ilustrar de forma más completa la presente invención y no deberían ser considerados como limitativos de la misma.

## EJEMPLO 1

### EVALUACIÓN *IN VITRO* DE SECRECIÓN MUCOSA

**Sistema de cultivo celular: Expansión y criopreservación.** Fueron dejadas caer células del epitelio bronquial humano normal (conocido por NHBE, por sus siglas en inglés) de la casa Clonetics, de San Diego, California, en redomas de cultivo de tejido T75 con orificios (500 células/cm<sup>2</sup>) en un medio basal epitelial bronquial (conocido por BEBM, por sus siglas en inglés; también de la casa Clonetics, de San Diego, California) conteniendo 25 ng/ml de factor de crecimiento epidérmico recombinante humano (conocido por EGF, por sus siglas en inglés; de la casa Intergen, de Purchase, Nueva York), 65 ng/ml de extracto de pituitaria bovina (preparado por los procedimientos de Bertolero et al., Exp Cell Res 155:64, 1984) 5 x 10<sup>-8</sup>M de ácido transretinoico, 1.5 µg/ml de albúmina de suero bovino (de la casa Intergen, de Purchase, Nueva York), 20 IU/ml de nistatina (de la casa Gibco, Grand Island, Nueva York), 0.5 µg/ml de hidrocortisona, 5 µg/ml de insulina, 10 µg/ml de transferrina, 0.5 µg/ml de epinefrina, 6.5 ng/ml de triiodotironina, 50 µg/ml de gentamicina, y 50 µg/ml de amfotericina B (de la casa Clonetics, de San Diego, California). Una vez confluentes, los cultivos fueron disociados con tripsina/EDTA y congelados como pasaje-2 de acuerdo con los procedimientos de Clonetics Corporation.

**Cultivo de interfaz aéreo-líquido de células NHBE.** Siguiendo la expansión, las células de NHBE fueron cultivadas en una interfaz aéreo/líquida de acuerdo con los procedimientos de Gray y colaboradores con modificaciones menores (Gray et al. Am J Respir Cell Mol Biol 14:104, 1996). El cultivo de interfaz aéreo – líquido fue iniciado por el depósito de células NHBE (pasaje-2, 2x10<sup>4</sup> células/cm<sup>2</sup>) en añadidos de cultivo Transwell-clear® (24.5 mm, 0.45 µm de tamaño de poro; Costar, Cambridge, Massachusset). Las células fueron cultivadas sumergidas hasta un 70 % de confluencia (5-7 días) en una mezcla 1:1 de medio de crecimiento celular epitelial bronquial (de la casa Clonetics, de San Diego, California): Medio Águilas modificado de Dulbecco, con glucosa alta (BEGM:DMEM-H, por sus siglas en inglés), conteniendo los mismos suplementos descritos *supra* con la excepción de EGF (0.5 ng/ml). Cuando los cultivos fueron confluentes en un 70 %, la interfaz aéreo – líquida fue creada por la eliminación de medio apical, y el medio basal (BEGM:DMEM-H) fue, en consecuencia, cambiado a diario. Las células fueron entonces cultivadas durante 14 días adicionales en una interfaz aéreo – líquida, un total de 21 días en cultivo.

**Mucosidad ELISA:** Fue evaluada la mucosidad secretada de las células epiteliales *in vitro* de las vías respiratorias después de la estimulación por activadores usando un procedimiento ELISA (procedimiento de captura de anticuerpos) (E. Harlow, D. Lane "Antibodies: A Laboratory Manual, Nueva York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988), en donde la mucosidad recogida está directamente ligada a la plancha ELISA. La mucosidad fue detectada usando un anticuerpo cultivado contra la mucosidad de las vías aéreas del mono (Lin et al. Am J Respir Cell Mol Biol 1:41, 1989).

## EJEMPLO 2

### ARNm MARCKS en células epiteliales bronquiales humanas

Fue detectado ARN mensajero MARCKS en células epiteliales bronquiales humanas cultivadas en cultivo de interfaz aéreo/líquido por análisis Northern (Ausubel et al., eds. "Current Protocols in Molecular Biology", Nueva York, John Wiley & Sons, 1992) usando un ADNc MARCKS (longitud aproximada 1 kb) como sonda radiomarcada. El mensaje de MARCKS se incrementa a medida que estas células se hacen más diferenciadas mientras son conservadas en un cultivo de interfaz aéreo/líquido.

Para detectar la proteína MARCKS en estas células, las células fueron marcadas con ácido mirístico <sup>3</sup>H (como MARCKS es miristoilada) durante 16 horas en los medios. Las células fueron lisadas, y la proteína MARCKS fue inmunoprecipitada de acuerdo con el procedimiento de Spizz & Blackshear (J Biol Chem 271:553, 1996) usando anticuerpo monoclonal 2F12 (regalo del laboratorio Blackshear).

Se descubrió que la MARCKS en el interior de las células epiteliales de las vías respiratorias era fosforilado por el activador de PKC, PMA (100 nM), mientras que el 4 $\alpha$ -PMA (un control de estero forbol que no activa PKC), no fosforilaba MARCKS. La fosforilación de MARCKS por PMA fue atenuada por Calfofina C (500 nM). Las células NHBE también contienen cantidades sustanciales de actividad de la proteína dependiente de cGMP quinasa tipo 1 $\alpha$  (PKG- 1 $\alpha$ ), que fue localizada en la fracción citosólica. Las células mostraron actividad PKG constitutiva que fue incrementada por incubación con 100  $\mu$ M de dibutililo cGMP. Adicionalmente, la fosforilación de MARCKS inducida por PMA fue revertida por incubación con 8-Br-cGMP (10  $\mu$ M). El ácido okadaico (500 nM) inhibió este efecto. Estos resultados indican que 8-Br-cGMP activa una fosfatasa (tipo 1 ó 2<sup>a</sup>), que, a su vez, desforforila MARCKS.

### EJEMPLO 3

#### Bloqueo de secreción mucina por péptido MANS

Fue evaluado el efecto sobre la secreción mucosa de un péptido miristoilado que contiene los primeros 24 amino ácidos de la proteína MARCKS humana (MANS; secuencia terminal N miristoilada; número de identificación secuencial:1). Fueron usadas células epiteliales bronquiales humanas normales cultivadas como se describe *supra*. Las células de evaluación fueron co – incubadas durante 15 minutos en medios apicales y basolaterales conteniendo 1, 10 ó 100  $\mu$ M de péptido MANS, y, entonces, co – incubadas durante 15 minutos con el péptido y 100 nM PMA más 1  $\mu$ M 8-Br-cGMP (columnas 3-5 de la **Figura 1A**). Las células de control no fueron expuestas al péptido MANS pero fueron preincubadas sólo en medios de cultivo (columna 1 de la **Figura 1A**) o medios de cultivo que contenían PMA y 8-Br-cGMP (columna 2 de la **Figura 1A**). Los asteriscos solitarios (\*) indican que la respuesta fue estadísticamente diferente al control de medios de cultivo (columna 1), y los asteriscos dobles (\*\*) indican que la respuesta fue estadísticamente diferente a la observada en células estimuladas que no fueron expuestas al péptido MANS (columna 2).

La estimulación por PMA y 8-Br-cGMP provocó al menos un 100% de incremento en la secreción mucosa sobre los niveles de control. Este incremento, sin embargo, fue bloqueado por la pre – y co – incubación con el péptido MANS. Los niveles de mucosa secretada cayeron a niveles de control cuando se usaron 10  $\mu$ M de péptido, y los niveles de secreción mucosa estuvieron bien por debajo de los valores de control siguiendo la incubación con 100  $\mu$ M de péptido MANS (**Figura 1A**).

Se descubrió también que el péptido MANS (100  $\mu$ M) disminuía la secreción mucosa (basal) constitutiva por una hora de incubación. Las células fueron tratadas como se describió *supra* excepto en que no se usó PMA ni 8-Br-cGMP. Adicionalmente, un péptido de control negativo de la misma composición amino ácida que el péptido MANS en orden aleatorio (RNS; secuencia terminal N aleatoria) no afectó a la secreción mucosa constitutiva. Los resultados se representan gráficamente en la **Figura 1B**. El asterisco solitario (\*) indica que la respuesta fue estadísticamente diferente a la del control de medios de cultivo (columna 1).

### EJEMPLO 4

#### Secreción mucina inducida por UTP es bloqueada por péptido MANS

Estos experimentos fueron llevados a cabo de forma similar a los descritos en el Ejemplo 3. Para evaluar la secreción estimulada, las células fueron expuestas apical y basolateralmente a uridina 5'-trifosfato (conocida por UTP, por sus siglas en inglés) en una concentración de 0.1 mM en medios de cultivo. Las células fueron pre – incubadas durante 15 minutos con el péptido MANS y los cultivos de evaluación fueron entonces co – incubados con el péptido MANS y UTP durante 45 minutos.

Los resultados se muestran en la Figura 2, donde la columna 1 es el medio de cultivo/control; la columna 2 = 0.1 mM UTP; la columna 3 = 0.1 UTP y 1  $\mu$ M de péptido MANS; la columna 4 = 0.1 mM UTP y 10  $\mu$ M de péptido MANS; y la columna 5 = 0.1 mM UTP y 100  $\mu$ M de péptido MANS. Los asteriscos solitarios (\*) indican que la respuesta fue estadísticamente diferente al control de medios de cultivo (columna 1), y los asteriscos dobles (\*\*) indican que la respuesta fue estadísticamente diferente a la observada en células estimuladas que no fueron expuestas al péptido MANS (columna 2).

**EJEMPLO 5****Efecto del Péptido MA-PSD en la Secreción de mucina**

5 Estos experimentos fueron llevados a cabo usando células epiteliales bronquiales humanas normales *in vitro* como se describió *supra*. Fue preparado un péptido miristoilado compuesto del dominio del lugar de fosforilación amino ácida 25 de MARCKS (péptido MA-PSD; número de identificación secuencial nº: 2). Las células de evaluación fueron preincubadas durante 15 minutos en medios apicales y basolaterales que contenían el péptido MA-PSD (1, 10 ó 100  $\mu\text{M}$ ), y, entonces, co-incubadas durante 15 minutos con el péptido y estímulo (100 nM PMA plus 1  $\mu\text{M}$  8-Br-cGMP). Las células de control fueron pre – incubadas solamente en medios de cultivo (columna 1 de la **Figura 3 A**); o solamente con 100 nM PMA; o con 100 nM PMA y 1  $\mu\text{M}$  8-Br-cGMP (columna 3).

15 La estimulación por PMA y 8-Br-cGMP provocó un incremento de alrededor del 100 % en la secreción mucosa por encima de los niveles de control. Este incremento fue aumentado en una forma dependiente de la dosis por pre- y co- incubación con el péptido MA-PSD, 1 ó 10  $\mu\text{M}$ . De forma interesante, los niveles estimulados de secreción mucosa no fueron afectados por la presencia de 100  $\mu\text{M}$  de péptido. Los resultados se representan gráficamente en la **Figura 3 A**. Los resultados usando el péptido MANS (1, 10 y 100  $\mu\text{M}$ ) se muestran en las columnas 7-9 para comparación. Los asteriscos solitarios (\*) indican que la respuesta fue estadísticamente diferente al control de medios de cultivo (columna 1), y los asteriscos dobles (\*\*) indican que la respuesta fue estadísticamente diferente a la observada en células estimuladas que no fueron expuestas al péptido (columna 3).

20 Se midió también el efecto del péptido MA-PSD (1, 10 y 100  $\mu\text{M}$ ) sobre la secreción mucina basal. Fueron incubadas células como las descritas *supra* durante una hora con el péptido MA-PSD (no PMA ni 8-Br-cGMP). Los resultados se muestran de forma gráfica en la **Figura 3 B**. El asterisco solitario (\*) indica que la respuesta a 100  $\mu\text{M}$  de péptido MA-PSD fue estadísticamente diferente al control de medios de cultivo (columna 1), mientras que no se vio una diferencia estadísticamente significativa cuando se usó 1 ó 10  $\mu\text{M}$  de péptido (columnas 3 y 4).

**EJEMPLO 6****Inhibición de la secreción mucosa por oligonucleótidos antisentido**

30 La secreción mucosa fue inhibida *in vitro* en células epiteliales de vías respiratorias humanas por el uso de un oligonucleótido antisentido dirigido al gen MARCKS humano endógeno. El sistema de evaluación *in vitro* descrito en el Ejemplo 1 fue utilizado para evaluar los efectos de oligonucleótidos antisentido sobre ARNm MARCKS.

35 Un oligonucleótido antisentido fue producido por un suministrador comercial (la casa Chemicon International, de Temecula, California; en conjunción con la casa Biagnostik GmbH, de Gottingen, Alemania) basado en la secuencia génica MARCKS humana de Sakai et al. (Genomics 14:175 (1992); acceso al GenBank número D10522, D90498). Un oligonucleótido de control fue también producido.

40 Los oligonucleótidos fueron administrados a los cultivos epiteliales diferenciados de las vías respiratorias por incubación en medios de cultivo que contenían los oligonucleótidos (5  $\mu\text{M}$ ) durante tres días. El oligonucleótido fue suministrado a la superficie apical de las células en 0,4 ml de medio de cultivo que contenía reagente de lipofectina (2  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ; de la casa Gibco BRL). Las células fueron incubadas con el oligonucleótido en la presencia de lipofectina durante 24 horas. Siguiendo un cambio en los medios de cultivo, las células fueron incubadas con el oligonucleótido solo durante 48 horas adicionales. Para evaluar la capacidad de los oligonucleótidos de afectar a la secreción mucosa estimulada, las células de evaluación fueron estimuladas durante 15 minutos con 100 nM PMA y 1  $\mu\text{M}$  8-Br-cGMP (activadores de PKC y PKG, respectivamente).

45 Los resultados se muestran en la Figura 5 donde la columna 1 = medios de cultivo/control 2 = células estimuladas con PMA y 8-Br-cGMP; columna 3 = células expuestas a 5  $\mu\text{M}$  de oligonucleótido de control y estimuladas con PMA y 8-Br-cGMP. Los asteriscos solitarios (\*) indican que la respuesta fue estadísticamente diferente al control de medios de cultivo (columna 1), y los asteriscos dobles (\*\*) indican que la respuesta fue estadísticamente diferente a la observada en células estimuladas que no fueron expuestas a un oligonucleótido (columna 2).

50 El moco secretado por las células epiteliales de las vías respiratorias después de la estimulación con los activadores PKC y PKG fue evaluada usando un procedimiento ELISA (procedimiento de captura de anticuerpos). El oligonucleótido de control (columna 3) no tuvo efecto en la secreción mucosa estimulada. En contraste, el oligonucleótido antisentido (columna 4) provocó una disminución estadísticamente significativa en la secreción mucosa en comparación con los niveles estimulados.

55 Estos resultados indican que los oligonucleótidos antisentido MARCKS inhiben la secreción mucosa estimulada, aunque puede ser mantenido un nivel basal de secreción mucosa por selección de dosificaciones apropiadas. En contraste, los oligonucleótidos de control no tuvieron efecto sobre la secreción estimulada.

**EJEMPLO 7****El TNF- $\alpha$  aumenta la expresión de MARCKS y aumenta la hipersecreción mucina**

5 Fueron incubadas células NBHE con 10 ng/ml de recombinante humano TNF- $\alpha$  o con un medio de cultivo solo durante 4 horas, siendo entonces estimuladas con PMA (100 nM) + 8-Br-cGMP (1  $\mu$ M) durante 15 minutos, o UTP (0.1 mM) durante 2 horas. Se recogió mucina secretada y se midió con ELISA. El ARN y proteínas totales fueron aislados de las células tratadas. El ARNm MARCKS fue evaluado por la técnica Northern de hibridación, y la proteína por la técnica de Western blot. Los resultados se muestran en las **Figuras 6 A, 6 B y 6 C.**

10 El Northern Blot y el gráfico mostrados en la Figura 6 A muestran un incremento en ARNm MARCKS en células incubadas con TNF- $\alpha$  (fila 2 del "blot", columna 2 del gráfico) comparadas con las células incubadas en un medio de cultivo solo (fila 1 del "blot", columna 1 del gráfico). El "Western-blot" y el gráfico mostrados en la Figura 6 B muestran incremento de tres a cuatro veces de la proteína MARCKS en las células incubadas con TNF- $\alpha$  (fila 2 del "blot", columna 2 del gráfico) comparadas con las células incubadas en un medio de cultivo solo (fila 1 del "blot", columna 1 del gráfico). El gráfico en la Figura 6 C muestra que, en las células incubadas con TNF- $\alpha$ , la hipersecreción mucina fue significativamente incrementada en respuesta a la estimulación subsiguiente por PMA + 8-Br-cGMP o UTP en comparación con la secreción mucina de células incubadas únicamente en un medio de cultivo. Los datos son presentados como promedio  $\pm$  SEM (n=6 en cada punto). Los asteriscos solitarios (\*) indican una diferencia estadísticamente significativa con relación a las muestras de control (únicamente en medio de cultivo) ( $p < 0.05$ ). Una cruz única ( $\square$ ) indica una diferencia estadísticamente diferente del estímulo ( $p < 0.05$ ).

**EJEMPLO 8****Hipersecreción de mucina estimulada por bloques de ácido okadaico**

25 Las células de NHBE fueron pre – incubadas con ácido okadaico (500 nM) durante 15 minutos a 37°C/5% CO<sub>2</sub>, luego estimuladas por PMA (100 nM) + 8-Br-cGMP (1  $\mu$ M) durante 15 minutos, o UTP (0.1 mM) durante 2 horas. Se recogió la mucina secretada en el medio apical y fue evaluada con ELISA. Los resultados se muestran en la Figura 7.

30 El gráfico mostrado en la Figura 7 muestra que el ácido okadaico, un inhibidor de la fosfatasa, bloquea la hipersecreción mucina inducida por PMA + 8-Br-cGMP o UTP. La columna 1 muestra los resultados de la incubación sólo con medio de cultivo durante 30 min. La columna 2 muestra los resultados de pre – incubación sólo con medio de cultivo durante 15 minutos, luego la incubación con PMA + 8-Br-cGMP durante 15 minutos adicionales. La columna 3 muestra los resultados de pre – incubación con ácido okadaico durante 15 minutos, luego la co-incubación con PMA + 8-Br-cGMP durante 15 minutos adicionales. La columna 4 muestra los resultados de incubación sólo con medio de cultivo durante 2 horas. La columna 5 muestra los resultados de pre-incubación sólo con medio de cultivo durante 15 minutos, luego incubación con UTP con 2 horas adicionales. La columna 6 muestra los resultados de la pre-incubación con ácido okadaico durante 15 minutos, luego la co-incubación con UTP durante 2 horas adicionales. Los datos son presentados como promedio  $\pm$  SEM (n=6 en cada punto). Los asteriscos solitarios (\*) indican una diferencia estadísticamente significativa con relación a las muestras de control ( $p < 0.05$ ). Una cruz única ( $\square$ ) indica una diferencia estadísticamente diferente del estímulo ( $p < 0.05$ ).

**EJEMPLO 9****La Hipersecreción de mucina inducida por UTP es inhibida por inhibidores de la vía de señalización de secreción mucosa**

50 Las células de NHBE fueron pre-incubadas con el inhibidor indicado durante 15 minutos, luego estimuladas con UTP (0.1 mM) durante 2 horas. Se recogió mucina secretada en el medio apical y se evaluó con ELISA. Los resultados se muestran en la Figura 8.

55 El gráfico de la Figura 8 muestra que la hipersecreción mucina inducida por UTP implica la activación de PKC y PKG. La columna 1 indica el resultado de la incubación sólo con medio de cultivo. La columna 2 indica los resultados de incubación en 0.1 mM de UTP. La columna 3 indica los resultados de incubación en 0.1 mM UTP + 500 nM calfofina C (un inhibidor de PKC). La columna 4 indica los resultados de incubación con 0.1 mM UTP + 10  $\mu$ M Rp-8-Br-cGMP (un inhibidor de PKG). La columna 5 indica los resultados de incubación con 0.1 mM UTP + 50  $\mu$ M LY83583 (un inhibidor de ciclase de guanililo soluble). La columna 6 indica los resultados de incubación con 0.1 mM UTP + 500 nM (un inhibidor de PKA). Los datos son presentados como promedio  $\pm$  SEM (n=6 en cada punto). Los asteriscos solitarios (\*) indican una diferencia estadísticamente significativa con relación al control ( $p < 0.05$ ). Una cruz única ( $\square$ ) indica una diferencia estadísticamente diferente del estímulo de UTP ( $p < 0.05$ ).

65 Lo anterior es ilustrativo de la presente invención, y no debe ser considerado como limitativo de la misma. La invención se define por las siguientes reivindicaciones, considerándose incluidos los equivalentes de las mismas.

LISTA DE SECUENCIAS

5 <210> 1  
 <211> 24  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 1

Gly Ala Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu  
 1 5 10 15

Arg Pro Gly Glu Ala Ala Val Ala  
 20

10

<210> 2 <211> 25 <212> PRT <213> Homo sapiens <400> 2

Lys Lys Lys Lys Lys Arg Phe Ser Phe Lys Lys Ser Phe Lys Leu Ser  
 1 5 10 15

Gly Phe Ser Phe Lys Lys Asn Lys Lys  
 20 25

15

<210> 3  
 <211> 1885  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens  
 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (309)..(1307)  
 <400> 3

20

tttattactt cttttttttt cgaactacac ttgggctcct ttttttgtgc tcgacttttc 60

cacccttttt cctccctcc tgtgctgctg ctttttgatc tcttcgacta aaattttttt  
 120

atccggagtg tatttaatcg gttctgttct gtcctctcca ccacccccac cccctcct  
 180

ccggtgtgtg tgccgctgcc gctgttgccg ccgccgctgc tgctgctgct cgccccgtcg  
 240

ttacaccaac ccgaggctct ttgtttcccc tcttgatct gttgagtttc tttgttgaag  
 300

aagccagc atg ggt gcc cag ttc tcc aag acc gca gcg aag gga gaa gcc  
 350

Met Gly Ala Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala  
 1 5 10

gcc gcg gag agg cct ggg gag gcg gct gtg gcc tcg tcg cct tcc aaa  
 398

Ala Ala Glu Arg Pro Gly Glu Ala Ala Val Ala Ser Ser Pro Ser Lys  
 15 20 25 30

25

ES 2 391 225 T3

gcg aac gga cag gag aat ggc cac gtg aag gta aac ggc gac gct tcg  
446  
Ala Asn Gly Gln Glu Asn Gly His Val Lys Val Asn Gly Asp Ala Ser  
35 40 45

ccc gcg gcc gcc gag tcg ggc gcc aag gag gag ctg cag gcc aac ggc  
494  
Pro Ala Ala Ala Glu Ser Gly Ala Lys Glu Glu Leu Gln Ala Asn Gly  
50 55 60

agc gcc ccg gcc gcc gac aag gag gag ccc gcg gcc gcc ggg agc ggg  
542  
Ser Ala Pro Ala Ala Asp Lys Glu Glu Pro Ala Ala Ala Gly Ser Gly  
65 70 75

gcg gcg tcg ccc tcc gcg gcc gag aaa ggt gag ccg gcc gcc gcc gct  
590  
Ala Ala Ser Pro Ser Ala Ala Glu Lys Gly Glu Pro Ala Ala Ala Ala  
80 85 90

gcc ccc gag gcc ggg gcc agc ccg gta gag aag gag gcc ccc gcg gaa  
638  
Ala Pro Glu Ala Gly Ala Ser Pro Val Glu Lys Glu Ala Pro Ala Glu  
95 100 105 110

ggc gag gct gcc gag ccc ggc tcg ccc acg gcc gcg gag gga gag gcc  
686  
Gly Glu Ala Ala Glu Pro Gly Ser Pro Thr Ala Ala Glu Gly Glu Ala  
115 120 125

gcg tcg gcc gcc tcc tcg act tct tcg ccc aag gcc gag gac ggg gcc  
734  
Ala Ser Ala Ala Ser Ser Thr Ser Ser Pro Lys Ala Glu Asp Gly Ala  
130 135 140

acg ccc tcg ccc agc aac gag acc ccg aaa aaa aaa aag aag cgc ttt  
782  
Thr Pro Ser Pro Ser Asn Glu Thr Pro Lys Lys Lys Lys Lys Arg Phe  
145 150 155

tcc ttc aag aag tct ttc aag ctg agc ggc ttc tcc ttc aag aag aac  
830  
Ser Phe Lys Lys Ser Phe Lys Leu Ser Gly Phe Ser Phe Lys Lys Asn  
160 165 170

aag aag gag gct gga gaa ggc ggt gag gct gag gcg ccc gct gcc gaa  
878  
Lys Lys Glu Ala Gly Glu Gly Gly Glu Ala Glu Ala Pro Ala Ala Glu  
175 180 185 190

ggc ggc aag gac gag gcc gcc ggg ggc gca gct gcg gcc gcc gcc gag  
926  
Gly Gly Lys Asp Glu Ala Ala Gly Gly Ala Ala Ala Ala Ala Ala Glu  
195 200 205

gcg ggc gcg gcc tcc ggg gag cag gca gcg gcg ccg ggc gag gag gca  
974  
Ala Gly Ala Ala Ser Gly Glu Gln Ala Ala Ala Pro Gly Glu Glu Ala  
210 215 220

ES 2 391 225 T3

gca gcg ggc gag gag ggg gcg gcg ggt ggc gac tcg cag gag gcc aag  
1022  
Ala Ala Gly Glu Glu Gly Ala Ala Gly Gly Asp Ser Gln Glu Ala Lys  
225 230 235

ccc cag gag gcc gct gtc gcg cca gag aag ccg ccc gcc agc gac gag  
1070  
Pro Gln Glu Ala Ala Val Ala Pro Glu Lys Pro Pro Ala Ser Asp Glu  
240 245 250

acc aag gcc gcc gag gag ccc agc aag gtg gag gag aaa aag gcc gag  
1118  
Thr Lys Ala Ala Glu Glu Pro Ser Lys Val Glu Glu Lys Lys Ala Glu  
255 260 265 270

gag gcc ggg gcc agc gcc gcc gcc tgc gag gcc ccc tcc gcc gcc ggg  
1166 Glu Ala Gly Ala Ser Ala Ala Ala Cys Glu Ala Pro Ser  
Ala Ala Gly 275 280 285

ctg gtg tgc ccc cgg aga gga ggc agc ccc cgc gga gga gcc cgc ggc  
1214  
Leu Val Cys Pro Arg Arg Gly Gly Ser Pro Arg Gly Gly Ala Arg Gly  
290 295 300

cgc cgc agc ctc aat caa gcc tgc gca gcc ccc tca cag gag gcc cag  
1262  
Arg Arg Ser Leu Asn Gln Ala Cys Ala Ala Pro Ser Gln Glu Ala Gln  
305 310 315

ccc gag tgc agt cca gaa gcc ccc cca gcg gag gcg gca gag taa  
1307  
Pro Glu Cys Ser Pro Glu Ala Pro Pro Ala Glu Ala Ala Glu  
320 325 330

aagagcaagc ttttgtgaga taatcgaaga acattttctc ccccgtttgt ttggttggag  
1367

tggtgccagg tactggattt tggagaactt gtctacaacc agggattgat tttaaagatg  
1427

tcttttttta ttttactttt ttttaagcac caaattttgt tgtttttttt ttctcccctc  
1487

cccacagatc ccatctcaaa tcattctggt aaccaccatt ccaacaggtc gaggagagct  
1547

taaacacctt cttcctctgg ccttgtttct cttttatttt ttattttttc gcatcagtat  
1607

taatgttttt gcatactttg catctttatt caaaagtgta aactttcttt gtcaatctat  
1667

ggacatgccc atatatgaag gagatgggtg ggtcaaaaag ggatatcaaa tgaagtgata  
1727

ggggtcacaa tggggaaatt gaagtgggtc ataacattgc caaatagtg tgccactaga  
1787

aatgggtgtaa aggctgtctt tttttttttt ttttaaagaaa agttattacc atgtattttg  
1847

**tgaggcaggt ttacaacact acaactcgtg ccgaattc**  
**1885**

5 <210> 4  
 <211> 332  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 4

Met	Gly	Ala	Gln	Phe	Ser	Lys	Thr	Ala	Ala	Lys	Gly	Glu	Ala	Ala	Ala	1	5	10	15
Glu	Arg	Pro	Gly	Glu	Ala	Ala	Val	Ala	Ser	Ser	Pro	Ser	Lys	Ala	Asn	20	25	30	
Gly	Gln	Glu	Asn	Gly	His	Val	Lys	Val	Asn	Gly	Asp	Ala	Ser	Pro	Ala	35	40	45	
Ala	Ala	Glu	Ser	Gly	Ala	Lys	Glu	Glu	Leu	Gln	Ala	Asn	Gly	Ser	Ala	50	55	60	
Pro	Ala	Ala	Asp	Lys	Glu	Glu	Pro	Ala	Ala	Ala	Gly	Ser	Gly	Ala	Ala	65	70	75	80
Ser	Pro	Ser	Ala	Ala	Glu	Lys	Gly	Glu	Pro	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Pro	85	90	95	
Glu	Ala	Gly	Ala	Ser	Pro	Val	Glu	Lys	Glu	Ala	Pro	Ala	Glu	Gly	Glu	100	105	110	
Ala	Ala	Glu	Pro	Gly	Ser	Pro	Thr	Ala	Ala	Glu	Gly	Glu	Ala	Ala	Ser	115	120	125	
Ala	Ala	Ser	Ser	Thr	Ser	Ser	Pro	Lys	Ala	Glu	Asp	Gly	Ala	Thr	Pro	130	135	140	
Ser	Pro	Ser	Asn	Glu	Thr	Pro	Lys	Lys	Lys	Lys	Lys	Arg	Phe	Ser	Phe	145	150	155	160
Lys	Lys	Ser	Phe	Lys	Leu	Ser	Gly	Phe	Ser	Phe	Lys	Lys	Asn	Lys	Lys	165	170	175	
Glu	Ala	Gly	Glu	Gly	Gly	Glu	Ala	Glu	Ala	Pro	Ala	Ala	Glu	Gly	Gly	180	185	190	
Lys	Asp	Glu	Ala	Ala	Gly	Gly	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Glu	Ala	Gly	195	200	205	
Ala	Ala	Ser	Gly	Glu	Gln	Ala	Ala	Ala	Pro	Gly	Glu	Glu	Ala	Ala	Ala	210	215	220	
Gly	Glu	Glu	Gly	Ala	Ala	Gly	Gly	Asp	Ser	Gln	Glu	Ala	Lys	Pro	Gln	225	230	235	240
Glu	Ala	Ala	Val	Ala	Pro	Glu	Lys	Pro	Pro	Ala	Ser	Asp	Glu	Thr	Lys	245	250	255	
Ala	Ala	Glu	Glu	Pro	Ser	Lys	Val	Glu	Glu	Lys	Lys	Ala	Glu	Glu	Ala	260	265	270	

ES 2 391 225 T3

Gly Ala Ser Ala Ala Ala Cys Glu Ala Pro Ser Ala Ala Gly Leu Val  
 275 280 285

Cys Pro Arg Arg Gly Gly Ser Pro Arg Gly Gly Ala Arg Gly Arg Arg  
 290 295 300

Ser Leu Asn Gln Ala Cys Ala Ala Pro Ser Gln Glu Ala Gln Pro Glu  
 305 310 315 320

Cys Ser Pro Glu Ala Pro Pro Ala Glu Ala Ala Glu  
 325 330

5 <210> 5  
 <211> 2589  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens  
 <220>  
 10 <221> CDS  
 <222> (370)..(1368)  
 <400> 5

caaccagga gatttctcca ttttctctt gtctacagt cggtacaaa tctgggatt 60  
 ttttattact tcttttttt tcgaactaca cttgggctcc tttttttgtg ctcgactttt  
 120  
 ccaccctttt tccctccctc ctgtgctgct gctttttgat ctcttcgact aaaattttt  
 180  
 tatecggagt gtatttaate ggttctgttc tgctctctcc accaccccca cccccctccc  
 240  
 tccggtgtgt gtgccgtgc cgctgttgcc gccgccgctg ctgctgctgc tcgcccctgc  
 300  
 gttacaccaa cccgaggctc tttgtttccc ctcttgatc tgttgagttt ctttgttgaa  
 360  
 gaagccagc atg ggt gcc cag ttc tcc aag acc gca gcg aag gga gaa gcc  
 411  
 Met Gly Ala Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala  
 1 5 10  
 gcc gcg gag agg cct ggg gag gcg gct gtg gcc tcg tcg cct tcc aaa  
 459  
 Ala Ala Glu Arg Pro Gly Glu Ala Ala Val Ala Ser Ser Pro Ser Lys  
 15 20 25 30  
 gcg aac gga cag gag aat ggc cac gtg aag gta aac ggc gac gct tcg  
 507  
 Ala Asn Gly Gln Glu Asn Gly His Val Lys Val Asn Gly Asp Ala Ser  
 35 40 45  
 ccc gcg gcc gcc gag tcg ggc gcc aag gag gag ctg cag gcc aac ggc  
 555  
 Pro Ala Ala Ala Glu Ser Gly Ala Lys Glu Glu Leu Gln Ala Asn Gly  
 50 55 60



ES 2 391 225 T3

acc aag gcc gcc gag gag ccc agc aag gtg gag gag aaa aag gcc gag  
 1179  
 Thr Lys Ala Ala Glu Glu Pro Ser Lys Val Glu Glu Lys Lys Ala Glu  
 255 260 265 270

gag gcc ggg gcc agc gcc gcc gcc tgc gag gcc ccc tcc gcc gcc ggg  
 1227  
 Glu Ala Gly Ala Ser Ala Ala Ala Cys Glu Ala Pro Ser Ala Ala Gly  
 275 280 285

ccc ggc gcg ccc ccg gag cag gag gca gcc ccc gcg gag gag ccc gcg  
 1275  
 Pro Gly Ala Pro Pro Glu Gln Glu Ala Ala Pro Ala Glu Glu Pro Ala  
 290 295 300

gcc gcc gca gcc tcg tca gcc tgc gca gcc ccc tca cag gag gcc cag  
 1323  
 Ala Ala Ala Ala Ser Ser Ala Cys Ala Ala Pro Ser Gln Glu Ala Gln  
 305 310 315

ccc gag tgc agt cca gaa gcc ccc cca gcg gag gcg gca gag taa  
 1368  
 Pro Glu Cys Ser Pro Glu Ala Pro Pro Ala Glu Ala Ala Glu  
 320 325 330

aagagcaagc ttttgtgaga taatogaaga acttttctcc cccgtttggt tghtggagtg  
 1428

gtgccaggta ctgttttga gaacttgtct acaaccaggg attgatttta aagatgtctt  
 1488

ttttatattt actttttttt aagcaccaaa ttttgtggt ttttttttc tcccctcccc  
 1548

acagatccca tctcaaatca ttctgttaac caccattcca acaggtcgag gagagcttaa  
 1608

acaccttctt cctctgcctt gtttctcttt tattttttat tttttcgcgcat cagtattaat  
 1668

gtttttgcat actttgcatc tttattcaaa agtgtaaact ttctttgtca atctatggac  
 1728

atgcccatat atgaaggaga tgggtgggtc aaaaagggat atcaaatgaa gtgatagggg  
 1788

tcacaatggg gaaattgaag tgggtcataa cattgcaaaa atagtgtgcc actagaaatg  
 1848

gtgtaaaggc tgtctttttt ttttttttta aagaaaagtt attacatgt attttgtgag  
 1908

gcaggtttac aacactacaa gtcttgagtt aagaaggaaa gaggaaaaaa gaaaaaacac  
 1968

caataccag atttaaaaaa aaaaaaacga tcatagtctt aggagttcat ttaaaccata  
 2028

ggaacttttc acttatctca tgtagctgt accagtcagt gattaagtag aactacaagt  
 2088

ES 2 391 225 T3

tgtatagget ttattgttta ttgctggttt atgaccttaa taaagtgtaa ttatgtatta  
2148

ccagcagggt gtttttaact gtgactattg tataaaaaca aatcttgata tccagaagca  
2208

catgaagttt gcaactttcc accctgcca tttttgtaa actgcagtca tcttgacct  
2268

tttaaacac aaattttaa ctcaaccaag ctgtgataag tggaatggtt actgtttata  
2328

ctgtggtatg tttttgatta cagcagataa tgctttcttt tccagtcgtc tttgagaata  
2388

aaggaaaaa aatcttcaga tgcaatggtt ttgtgtagca tcttgtctat catgttttgt  
2448

aaatactgga gaagcttga ccaattgac ttagagatgg aatgtaactt tgcttacaaa  
2508

aattgctatt aaactcctgc ttaagtggtt ctaattttct gtgagcacac taaaagcgaa  
2568

aaataaatgt gaataaatg t  
2589

- <210> 6
- <211> 332
- 5 <212> PRT
- <213> Homo sapiens
- <400> 6

Met	Gly	Ala	Gln	Phe	Ser	Lys	Thr	Ala	Ala	Lys	Gly	Glu	Ala	Ala	Ala
1				5						10					15
Glu	Arg	Pro	Gly	Glu	Ala	Ala	Val	Ala	Ser	Ser	Pro	Ser	Lys	Ala	Asn
			20					25					30		
Gly	Gln	Glu	Asn	Gly	His	Val	Lys	Val	Asn	Gly	Asp	Ala	Ser	Pro	Ala
			35				40					45			
Ala	Ala	Glu	Ser	Gly	Ala	Lys	Glu	Glu	Leu	Gln	Ala	Asn	Gly	Ser	Ala
		50				55					60				
Pro	Ala	Ala	Asp	Lys	Glu	Glu	Pro	Ala	Ala	Ala	Gly	Ser	Gly	Ala	Ala
65					70					75					80
Ser	Pro	Ser	Ser	Ala	Glu	Lys	Gly	Glu	Pro	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Pro
				85					90						95
Glu	Ala	Gly	Ala	Ser	Pro	Val	Glu	Lys	Glu	Ala	Pro	Ala	Glu	Gly	Glu
			100					105					110		
Ala	Ala	Glu	Pro	Gly	Ser	Ala	Thr	Ala	Ala	Glu	Gly	Glu	Ala	Ala	Ser
		115					120					125			
Ala	Ala	Ser	Ser	Thr	Ser	Ser	Pro	Lys	Ala	Glu	Asp	Gly	Ala	Thr	Pro
		130					135				140				

ES 2 391 225 T3

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

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un péptido consistente de entre 5 a menos de 50 amino ácidos contiguos de una secuencia terminal N de número de identificación secuencial: 4, inhibiendo dicho péptido la secreción mucosa relacionada con la proteína MARCKS y reduciendo dicho péptido la secreción mucosa por una célula secretora de moco en comparación con lo que sucedería en ausencia de dicho péptido.
- 10 2. Un péptido consistente de entre 10 a 50 amino ácidos contiguos de una secuencia terminal N de número de identificación secuencial: 4, inhibiendo dicho péptido la secreción mucosa relacionada con la proteína MARCKS y reduciendo dicho péptido la secreción mucosa por una célula secretora de moco en comparación con lo que sucedería en ausencia de dicho péptido.
3. Un péptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, bloqueando dicho péptido la secreción de mediadores inflamatorios de células y disminuyendo la inflamación.
4. Un péptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, estando dicho péptido miristoilado.
- 15 5. El péptido de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, teniendo dicho péptido una secuencia amino ácida que comprende el número de identificación secuencial: 1.
6. Un péptido miristoilado de la zona terminal N de la proteína MARCKS, consistiendo el péptido de una secuencia amino ácida que es idéntica a una secuencia terminal N de número de identificación secuencial: 4, inhibiendo dicho péptido la secreción mucosa relacionada con la proteína MARCKS y reduciendo dicho péptido la secreción mucosa por una célula secretora de moco en comparación con lo que sucedería en ausencia de dicho péptido.
- 20 7. Un péptido miristoilado consistente en la secuencia: ácido mirístico- GAQFSKTAAKGEAAAERPGEAAVA (número de identificación secuencial: 1), o fragmentos miristoilados de la misma consistentes en al menos 10 amino ácidos, inhibiendo dicho péptido la secreción mucosa relacionada con la proteína MARCKS y reduciendo dicho péptido la secreción mucosa por una célula secretora de moco en comparación con lo que sucedería en ausencia de dicho péptido.
- 25 8. Un péptido miristoilado consistente en la secuencia: ácido mirístico- GAQFSKTAAKGEAAAERPGEAAVA (número de identificación secuencial: 1), o fragmentos miristoilados de la misma consistentes en al menos 5 amino ácidos, inhibiendo dicho péptido la secreción mucosa relacionada con la proteína MARCKS y reduciendo dicho péptido la secreción mucosa por una célula secretora de moco en comparación con lo que sucedería en ausencia de dicho péptido.
- 30 9. Un péptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para su uso como medicamento.
10. Una composición farmacéutica que comprende el péptido de cualquiera de las reivindicaciones 4, 6, 7 ó de la reivindicación 8 y un portador farmacéuticamente aceptable.
11. El uso de un péptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para la producción de un medicamento para el tratamiento terapéutico o profiláctico de la secreción mucosa.
- 35 12. El uso de un péptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para la producción de un medicamento para el tratamiento terapéutico o profiláctico de la inflamación.
13. El uso de un péptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para la producción de un medicamento para el tratamiento terapéutico o profiláctico de la secreción mucosa y la inflamación.
- 40 14. El uso de un péptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para la producción de un medicamento para el tratamiento terapéutico o profiláctico de la enfermedad de las vías respiratorias.
15. El péptido de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para su uso en el tratamiento de la secreción mucosa.
16. El péptido de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para su uso en el tratamiento de la inflamación.
17. El péptido de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para su uso en el tratamiento de la secreción mucosa y de la inflamación.
- 45 18. El péptido de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para su uso en el tratamiento de la enfermedad de las vías respiratorias.

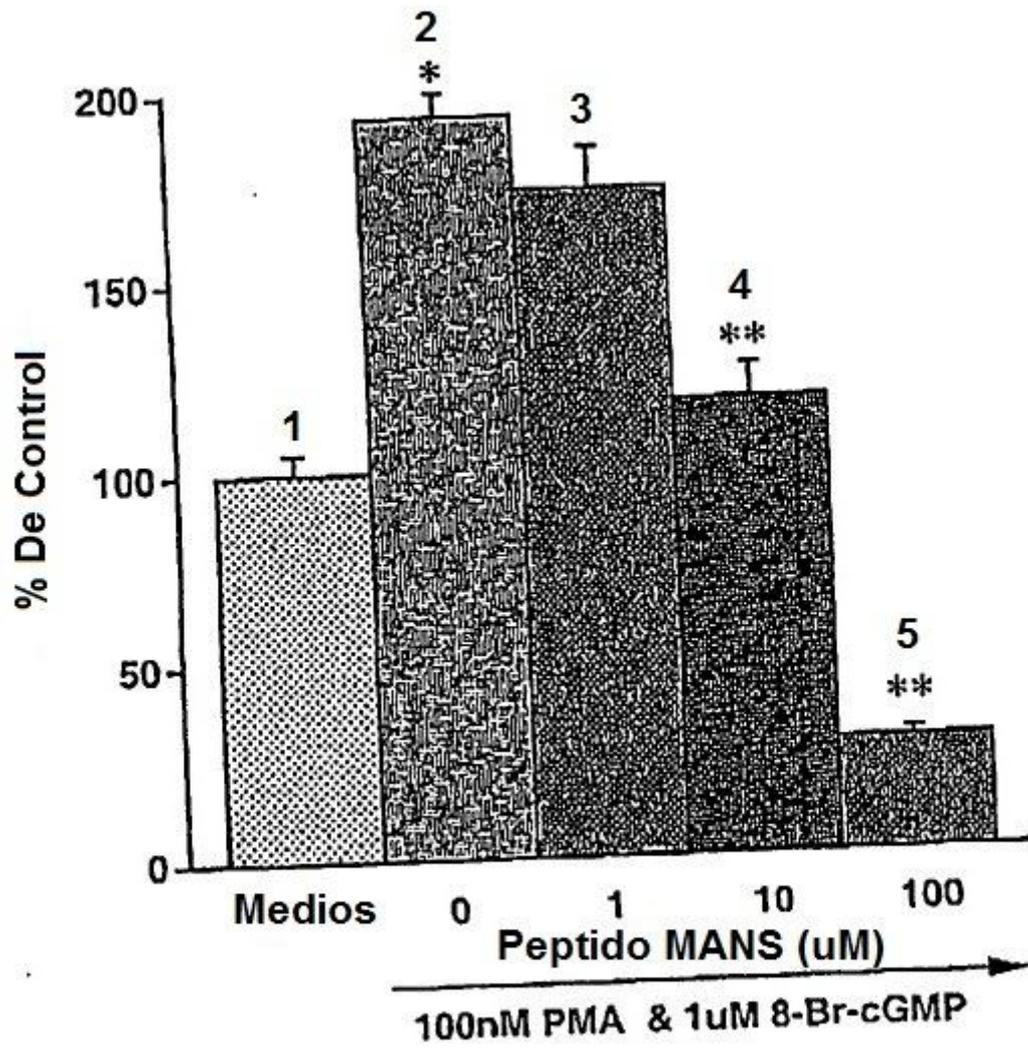
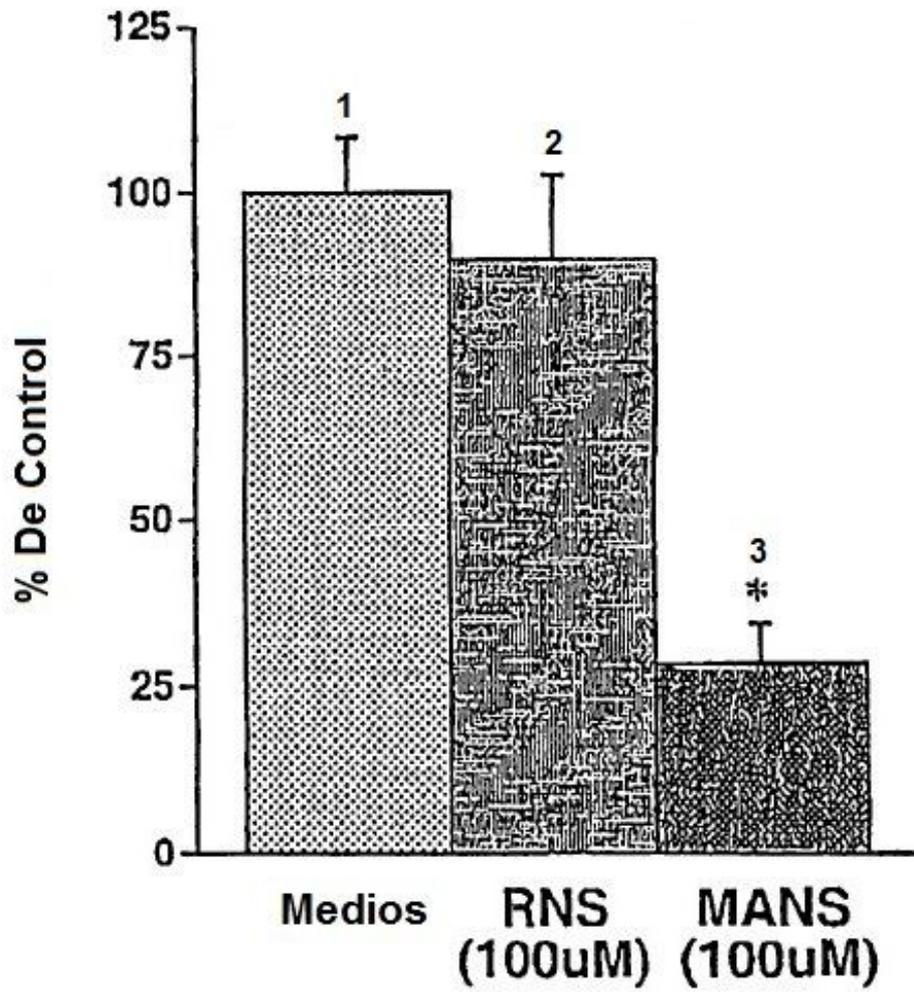
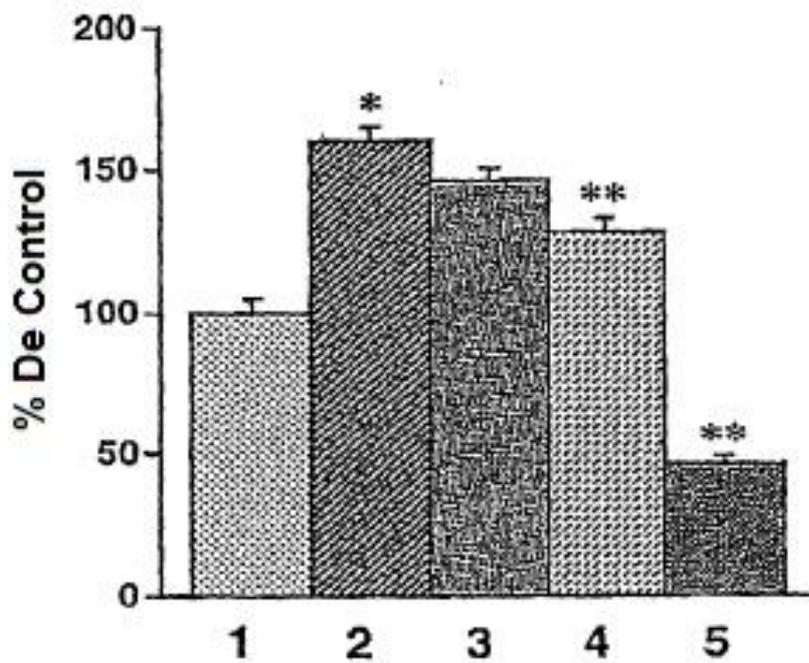


FIG. 1A



**FIG. 1B**

**FIG. 2**



**Columna 1: Medios**

**Columna 2: 0.1 mM UTP**

**Columna 3: 0.1 mM UTP & 1 uM péptido MANS**

**Columna 4: 0.1 mM UTP & 10 uM péptido MANS**

**Columna 5: 0.1 mM UTP & 100 uM péptido MANS**

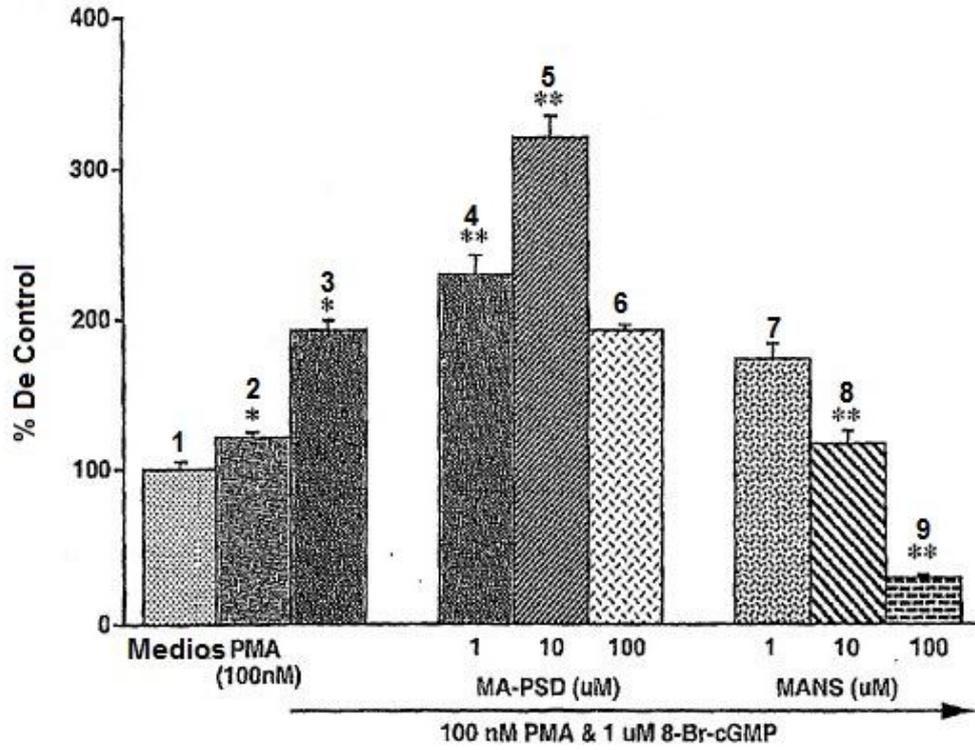


FIG. 3A

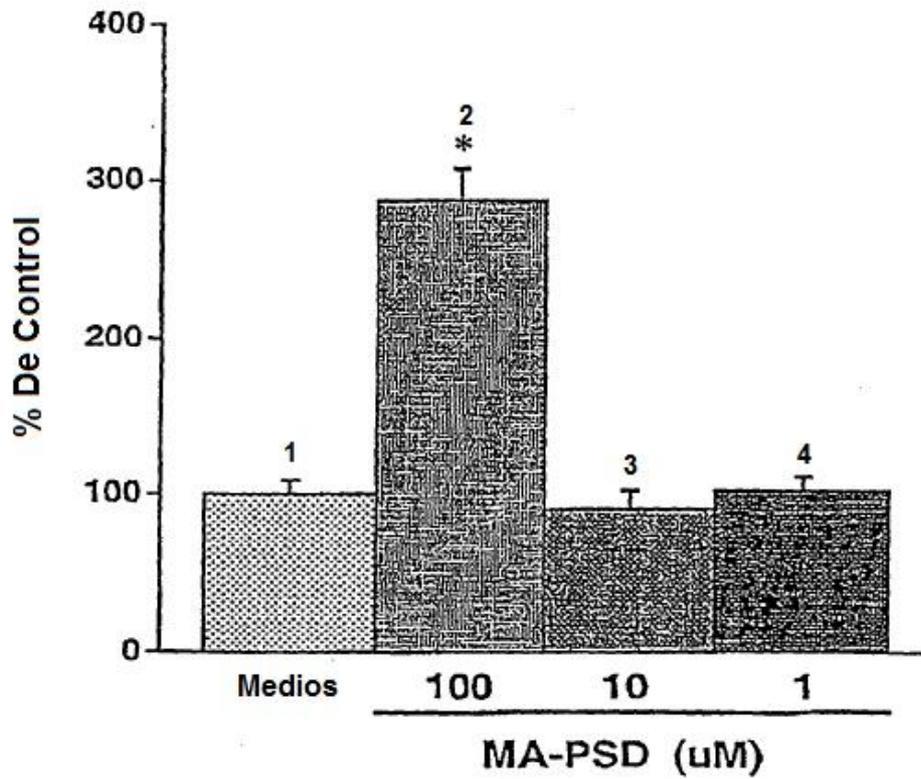


FIG. 3B

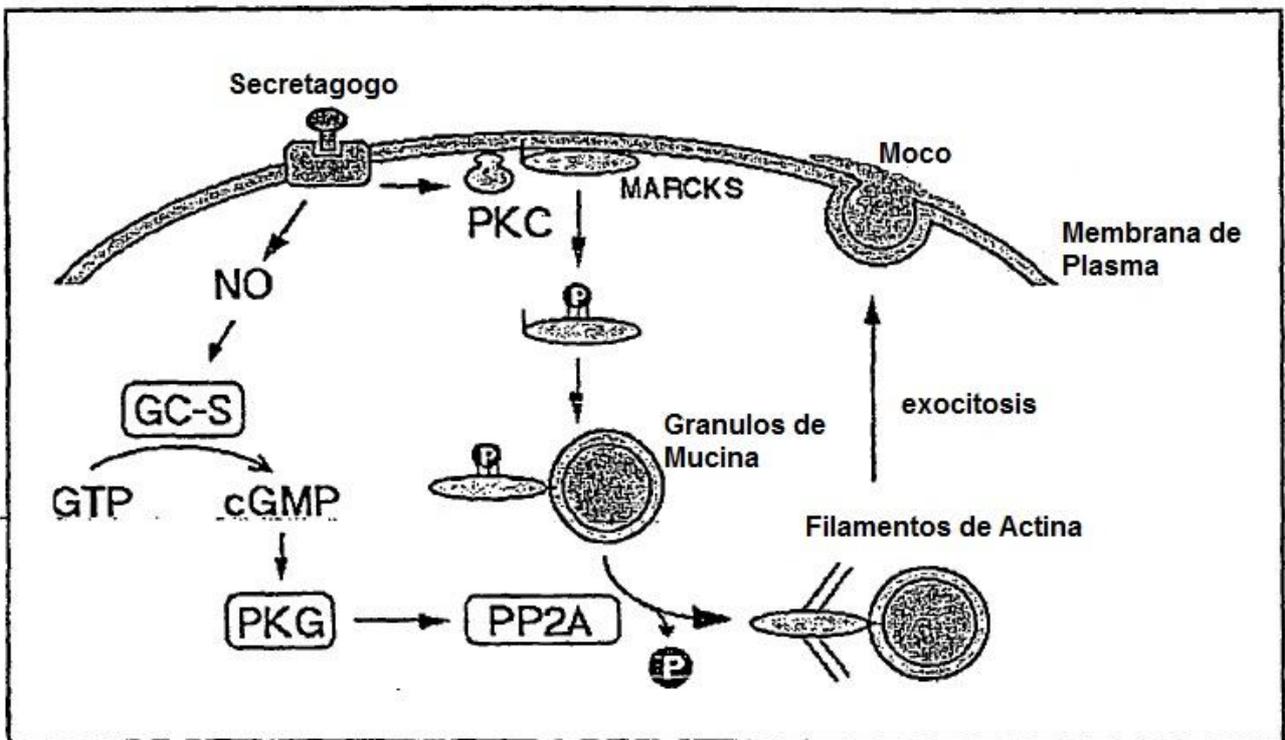
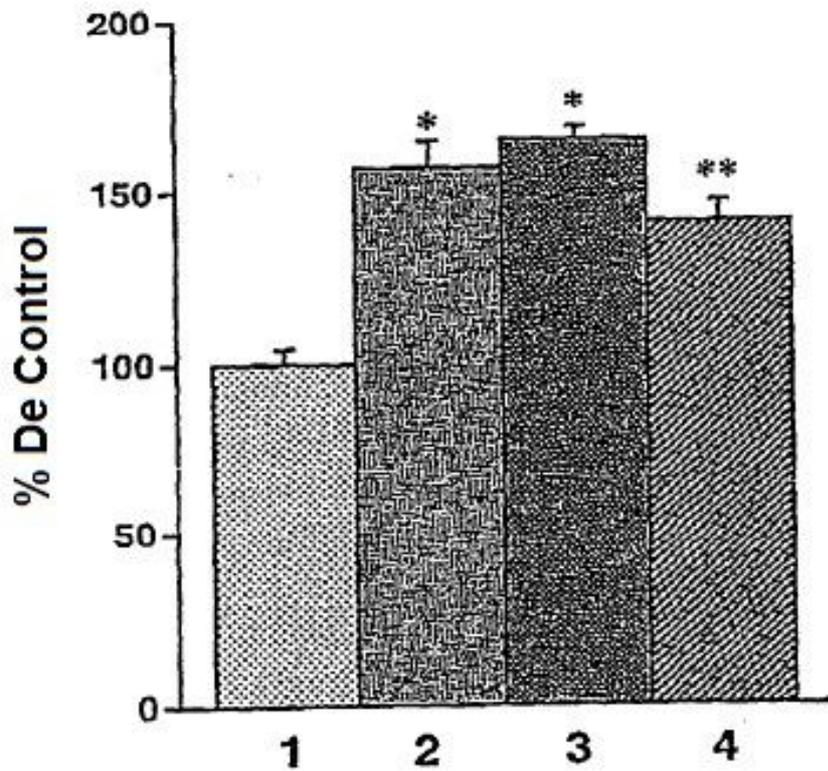


FIG. 4

**FIG. 5**

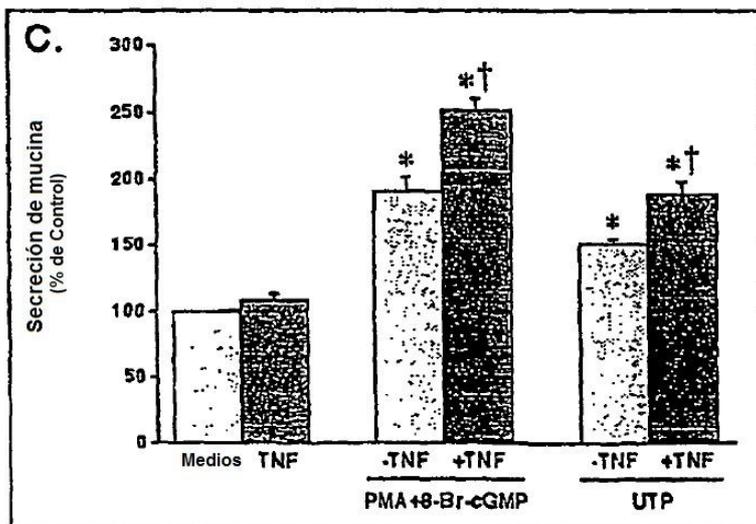
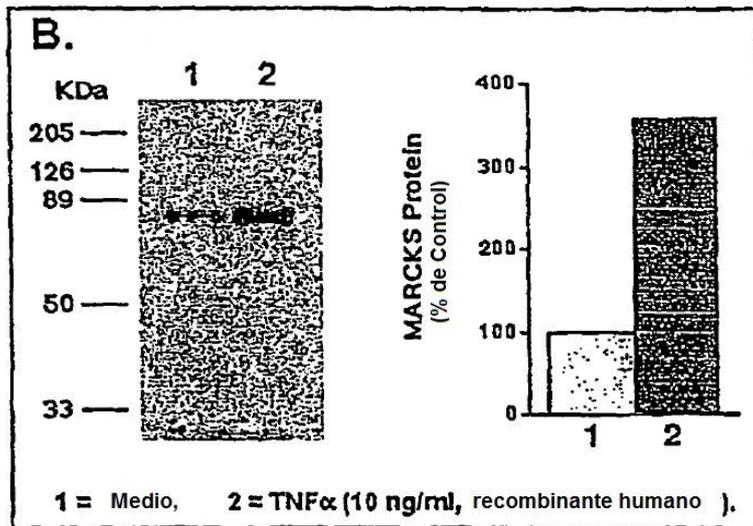
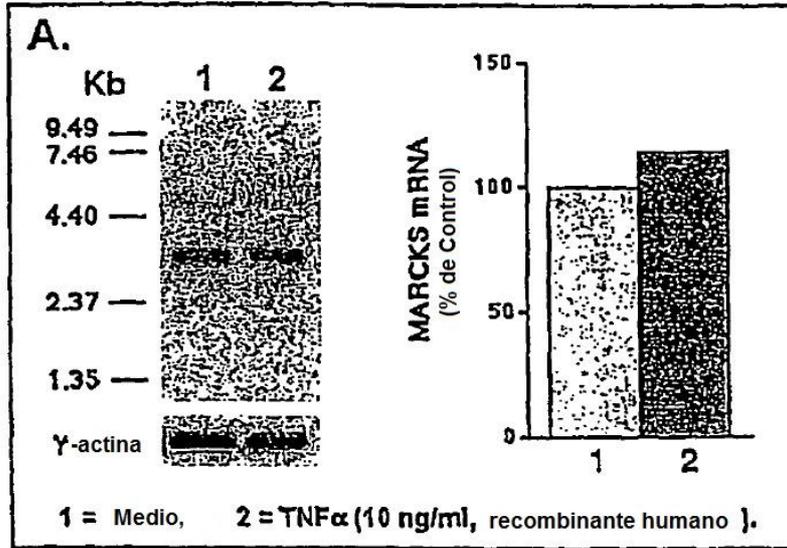


Columna 1: Medios / Control

Columna 2: 100 nM PMA & 1 uM 8-Br-cGMP

Columna 3: 5 uM Control Oligo / 100 nM PMA & 1 uM 8-Br-cGMP

Columna 4: 5 uM Antisentido Oligo / 100 nM PMA & 1 uM 8-Br-cGMP



**FIG. 6**

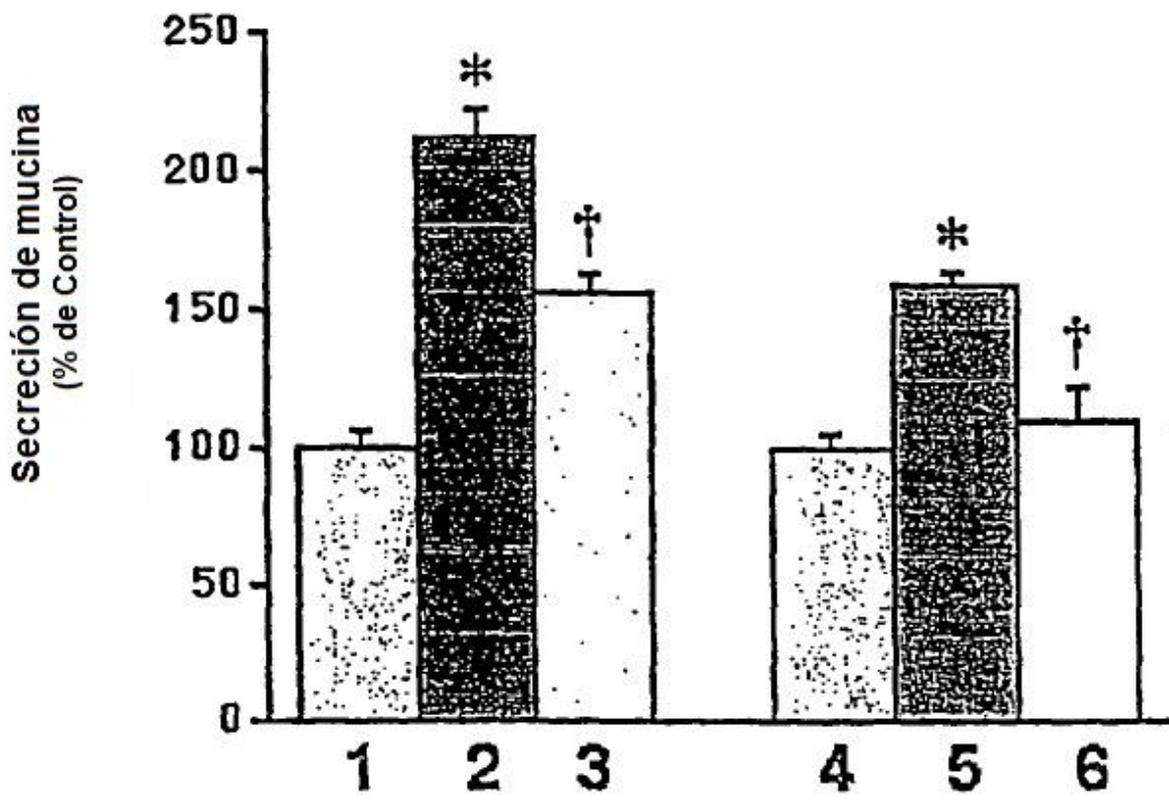


FIG. 7

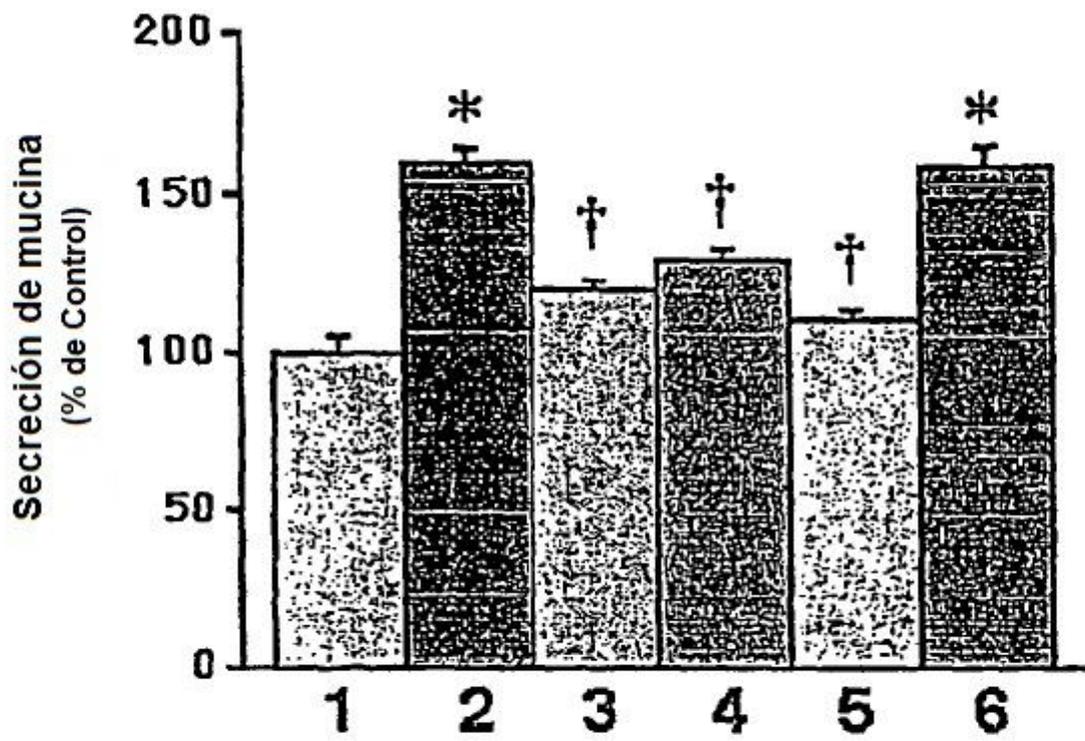


FIG. 8