

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 716 723**

51 Int. Cl.:

A61K 38/17 (2006.01)

C07K 14/435 (2006.01)

A61P 11/06 (2006.01)

A61P 1/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.09.2012 PCT/US2012/056112**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.03.2013 WO13043720**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.09.2012 E 12833524 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.11.2018 EP 2760463**

54 Título: **Regulación de los canales de sodio por las proteínas PLUNC**

30 Prioridad:

20.09.2011 US 201161536647 P

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

14.06.2019

73 Titular/es:

**THE UNIVERSITY OF NORTH CAROLINA AT
CHAPEL HILL (100.0%)**

**308 Bynum Hall, Campus Box 4105
Chapel Hill, NC 27599-4105, US**

72 Inventor/es:

**TARRAN, ROBERT;
STUTTS, MONROE JACK y
DONALDSON, SCOTT**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 716 723 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

Regulación de los canales de sodio por las proteínas PLUNC.

5

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a la capacidad de las proteínas PLUNC, tales como SPLUNC1 y SPLUNC2, para fijarse a los canales de sodio e inhibir la activación de los canales de sodio. La invención se refiere adicionalmente a métodos para regular la absorción de sodio y el volumen de fluido y tratar trastornos sensibles a la modulación de la absorción de sodio por modulación de la fijación de proteínas PLUNC a los canales de sodio.

10

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Las superficies de las mucosas epiteliales están revestidas con fluidos cuyos volumen y composición están controlados con precisión. En las vías respiratorias, una película delgada de líquido en la superficie de las mismas ayuda a proteger las vías respiratorias de los mamíferos contra la infección por actuar como lubricante para el aclaramiento eficiente del moco (Chmiel *et al.*, *Respir. Res*, 4: 8 (2003); Knowles *et al.*, *J. Clin. Invest*, 109: 571 (2002)). Esta capa se desplaza cefálicamente durante el aclaramiento del moco y el exceso de líquido que se acumula cuando convergen dos vías respiratorias es eliminado por la absorción de líquido de la superficie de las vías respiratorias conducida por Na⁺ con Na⁺ que pasa a través del canal epitelial de Na⁺ (ENaC) (Knowles *et al.*, *J. Clin. Invest*, 109: 571 (2002)). El modo en que la actividad de ENaC es sentida y controlada por las vías respiratorias no está bien comprendido. Sin embargo, existen pruebas de que moléculas informadoras existentes en el líquido de la superficie de las vías respiratorias pueden servir como señales detectoras de volumen cuya dilución o concentración puede alterar receptores específicos de la superficie de las células que controlan las velocidades de transporte iónico para absorber o secretar líquido de la superficie de las vías respiratorias a medida que es necesario (Chambers *et al.*, *Respir. Physiol. Neurobiol*, 159: 256 (2007)). ENaC tiene que ser escindido por proteasas intracelulares tipo furina y/o proteasas activadoras de canales extracelulares (CAPs) tales como prostasina para ser activo y conducir Na⁺ (Planes *et al.*, *Curr. Top. Dev. Biol*, 78: 23 (2007); Rossier, *Proc. Am. Thorac. Soc*, 1: 4 (2004); Vallet *et al.*, *Nature* 389: 607 (1997); Chraïbi *et al.*, *J. Gen. Physiol*, 111: 127 (1998)). ENaC puede ser también escindido y activado por serina-proteasas exógenas tales como tripsina, acción que es atenuada por el inhibidor de las proteasas aprotinina (Vallet *et al.*, *Nature* 389: 607 (1997)). Cuando se montan cultivos epiteliales bronquiales humanos en cámaras Ussing en las que el líquido nativo de la superficie de las vías respiratorias se elimina por lavado, ENaC es predominantemente activo, lo que sugiere que son predominantes proteasas fijadas a las células (Bridges *et al.*, *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol*, 281: L16 (2001); Donaldson *et al.*, *J. Biol. Chem*, 277: 8338 (2002)). En contraste, en condiciones de película delgada, en las que está presente líquido nativo de la superficie de las vías respiratorias, la actividad de ENaC es reducida, lo que sugiere que el líquido de la superficie de las vías respiratorias contiene inhibidores de proteasas solubles (Myerburg *et al.*, *J. Biol. Chem*, 281: 27942 (2006); Tarran *et al.*, *J. Gen. Physiol*, 127: 591 (2006)).

15

20

25

30

35

40

45

50

La familia de clones epiteliales de Paladar, Pulmón y Nasal (LPLUNC) son proteínas secretadas que se subdividen en miembros cortos (SPLUNCs) y largos (LPLUNCs) que contienen uno o dos dominios respectivamente (Bingle *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta* 1493: 363 (2000); Weston *et al.*, *J. Biol. Chem*, 274: 13698 (1999)). El gen PLUNC original que se denomina ahora SPLUNC1 comprende hasta 10% de proteína total en el líquido de la superficie de las vías respiratorias y puede ser detectado fácilmente en secreciones de lavado nasal y traqueales (Bingle, C. D., y Craven, C. J. (2002) PLUNC: a novel family of candidate host defense proteins expressed in the upper airways and nasopharynx *Hum Mol Genet* 11, 937; Campos, M. A., *et al.* (2004) Purification and characterization of PLUNC from human tracheobronchial secretions *Am J Respir Cell Mol Biol* 30, 184; Lindahl, M., Stahlbom, B., and Tagesson, C. (2001) Identification of a new potential airway irritation marker, palate lung nasal epithelial clone protein, in human nasal lavage fluid with two-dimensional electrophoresis and matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight, *Electrophoresis* 22, 1795). SPLUNC1 se expresa en las glándulas submucosas, los epitelios superficiales y en los neutrófilos y teóricamente está presente en las regiones correctas del pulmón, siendo una molécula sensible al volumen dado que puede secretarse en la superficie mucosa del epitelio superficial donde se expresa ENaC (Bartlett *et al.*, *J. Leukoc. Biol*, 83: 1201 (2008); Bingle *et al.*, *J. Pathol*, 205: 491 (2005)).

55

La presente invención aborda deficiencias anteriores en la técnica por describir la regulación de los canales de sodio por las proteínas PLUNC y la manipulación de este mecanismo para regular la absorción de sodio y el volumen de fluido y el tratamiento de trastornos sensibles a la modulación de la absorción de sodio.

SUMARIO DE LA INVENCION

60

La presente invención está basada, en parte, en el descubrimiento de la capacidad de las proteínas PLUNC para regular la actividad de los canales de sodio. Conforme a esto, en un aspecto la invención se refiere a un método *in vitro* de inhibición de la activación de un canal de sodio o inhibición de la absorción de sodio a través de un canal de sodio, que comprende poner en contacto un canal de sodio con un polipéptido conforme a la reivindicación 1. Realizaciones adicionales se exponen en las reivindicaciones dependientes, incorporadas en esta memoria por referencia.

65

Un aspecto adicional de la invención se refiere a un polipéptido constituido por la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14, así como un polinucleótido que codifica el polipéptido y un vector y/o célula que comprende el polinucleótido.

5 Otro aspecto de la invención se refiere a un kit que comprende el polipéptido, polinucleótido, vector, célula, peptidomimético, o compuesto de la invención.

Otro aspecto de la invención se refiere al uso de una proteína PLUNC o un fragmento funcional de la misma para la preparación de un medicamento para tratar un trastorno sensible a la inhibición de la absorción de sodio en un individuo que se encuentra en necesidad de ello.

Otro aspecto de invención se refiere al uso de un inhibidor de una proteína PLUNC para la preparación de un medicamento para tratar un sensible a la activación de la absorción de sodio en un individuo que se encuentra en necesidad de ello.

La invención concierne también a una composición farmacéutica que comprende el polipéptido, polinucleótido, vector, o célula definido en las reivindicaciones.

Estos y otros aspectos de la invención se expresan con mayor detalle en la descripción de la invención que sigue.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Fig. 1 muestra que SPLUNC1 está presente en el líquido de la superficie de las vías respiratorias de cultivos bronquiales humanos. Se incubó líquido de la superficie de las vías respiratorias con cuentas tripsina-agarosa \pm aprotinina y las proteínas se separaron en gel SDS al 15% y se visualizaron con un tinte de plata. Las bandas destacadas se cortaron luego y se analizaron por MALDI-MS/MS y las proteínas identificadas se muestran en la Tabla 2. Se detectó SPLUNC1 en las bandas un & 2, y su fijación a tripsina se atenúa en presencia de aprotinina.

Figs. 2A-2E muestran la presencia y función de SPLUNC1 en el fluido de las vías respiratorias.

Fig. 3 muestra que SPLUNC1 es escindida por tripsina. Un tratamiento de 60 min con 1 U/ml de tripsina causaba a la vez un cambio de \sim 1 kD y un cambio de 10 kD en el tamaño de SPLUNC1. SPLUNC1 se marcó en el terminal C con una etiqueta V5 y se detectó con un anticuerpo anti-V5. Los productos de escisión de SPLUNC1 se muestran con flechas.

Fig. 4 muestra que SPLUNC1 afecta a la resistencia (Rt) de una manera similar a amilorida. Cultivos epiteliales bronquiales humanos se lavaron 5 veces con PBS durante una hora para eliminar cualquier SPLUNC1 nativo y se expusieron luego a 50 ng/ml de SPLUNC1 recombinante durante 30 min o 100 mM de amilorida durante 10 min o SPLUNC1 seguido por amilorida. n total= 12. * = p < 0,05 diferente del control.

Figs. 5A-5C muestran el efecto de la expresión de SPLUNC1 y ENaC en oocitos de *Xenopus*.

Figs. 6A-6B muestran el efecto de SPLUNC1 sobre la escisión de ENaC.

45 Figs. 7A-7E muestran el efecto de la expresión de SPLUNC1 y ENaC en oocitos de *Xenopus*.

Fig. 8 representa una transferencia western que muestra la expresión de α ENaC en células JME transfectadas establemente con pQCXIN- α -ENaC-YFP, pero no en células de la misma pasada infectadas con el vector pQCXIN vacío.

50 Figs. 9A-9B muestran la fijación de SPLUNC1 a ENaC.

Fig. 10 muestra que SPLUNC1 se fija a subunidades α , β y γ ENaC. Se co-inyectaron oocitos con 0,3 ng de subunidades $\alpha\beta\gamma$ ENaC \pm SPLUNC1 (1 ng). Los geles muestran la co-inmunoprecipitación representativa de SPLUNC1 marcada con V5 y subunidades ENaC marcadas con HA. Las puntas de flecha denotan bandas de ENaC o SPLUNC1 y U. I. denota oocitos de control no inyectados.

Figs. 11A-11 E muestran la inhibición de SPLUNC1 con shRNA.

60 Fig. 12 muestra que SPLUNC1 se expresa fuertemente en tráquea, colon y riñón. Se obtuvo cDNA de tráquea, riñón, estómago y colon enteros frente a cDNA específico de SPLUNC1.

Fig. 13 muestra el efecto de miembros de la familia PLUNC sobre la actividad de ENaC.

65 Fig. 14 muestra que la capacidad de SPLUNC1 para inhibir el PD transepitelial es atenuada por pretratamiento con DTT en cultivos epiteliales bronquiales humanos primarios. Los cultivos se prelavaron para eliminar SPLUNC1

endógena y se midió el PD basal (control, ctrl), se añadieron luego 50 ng/ml de SPLUNC1 recombinante o SPLUNC1 recombinante que se había reducido con DTT, y se midió de nuevo el PD en los mismos cultivos 45 min después.
 *= p < 0,05 diferente del control. †=p<0,05 diferente de SPLUNC1 sola.

5 Fig. 15 representa una transferencia western realizada en condiciones no desnaturalizantes, mostrando que SPLUNC1 reducida (es decir, tratada con DTT) migra a lo largo del gel a una velocidad diferente a la de SPLUNC1 no desnaturalizada.

10 Figs. 16A-16B muestran que SPLUNC1 puede inhibir ENaC por disminución del número de canales ENaC en la membrana plasmática. A, la biotilación superficial de α ENaC muestra que ENaC de la membrana plasmática disminuye después de coexpresión con SPLUNC1 en oocitos, 1, control; 2, α ENaC, 3, α ENaC & SPLUNC1. El lisado total por pista era 3-4 huevos corridos en un gel al 10%. B, la adición de MTSET a ENaC que contiene el mutante β S518C aumenta ENaC P₀ a 1,0 cuando se coexpresa en oocitos, pero la corriente total es reducida todavía por expresión de SPLUNC1, lo que sugiere que ENaC se ha internalizado. Barras abiertas, control. Barras cerradas, adición de MTSET. n total= 6.

Figura 17 muestra el modelo predicho de SPLUNC1 (SEQ ID NO: 12).

20 Figs. 18A-18C muestran la identificación del sitio activo de SPLUNC1 (SEQ ID NO: 11). A, se construyeron truncantes de SPLUNC1. Todos los truncantes tenían delecciones que partían del término C, retenían la secuencia señal N-terminal y todos ellos eran secretados espontáneamente por los oocitos en el medio (como se determinó por transferencia western). B, se determinó el efecto de estos truncantes sobre la corriente sensible a amilorida (ENaC) mediante pinza de voltaje de 2 electrodos. La delección de hasta 85% de SPLUNC1 dio como resultado una inhibición similar de ENaC a la de SPLUNC1 de longitud total. n total = 10-14. Un péptido de 18 aminoácidos, correspondiente a la región 22-39, denominada S18, inhibe también ambas corrientes de ENaC basal y estimulada por tripsina cuando se incubaba en el baño de oocitos durante una hora a 10 μ M. Barras abiertas, control. Barras cerradas, S18, n = 9.
 25 *p < 0,05 diferente del control.

30 Fig. 19 muestra una comparación de la secuencia de aminoácidos de SPLUNC1 (aminoácidos 22-39 de SEQ ID NO: 1) con la secuencia de las subunidades α 26 y γ 43 de ENaC (SEQ ID NOS: 9 y 10).

Fig. 20 muestra que S18 se fija específicamente a β ENaC. Un pull-down de S18 biotilado de subunidades ENaC se expresaba individualmente en células HEK. IN = entrada, PD = elución del pull-down. La entrada representaba 4% del lisado total. El gel era gel en gradiente bis-tris 4-12% y se repitió 3 veces.

35 Fig. 21 muestra que la fijación extracelular de S18 altera la FRET de ENaC intracelular. Ai, dibujo de α ENaC-eGFP y β ENaC-mCherry en condiciones basales (no se representa γ ENaC). Aii, se supone que la fijación de S18 al bucle extracelular de β ENaC (1) induce un cambio de conformación en ENaC que se refleja como FRET intracelular alterada (2). Este cambio puede facilitar la ubiquitinación inducida por NEDD4-2 (3), conduciendo a la internalización de $\alpha\beta\gamma$ ENaC (4). B, la FRET con fotoblanqueo de aceptor indica que las subunidades α y β ENaC cambian su orientación/distancia una respecto a otra después de fijación de S18, lo que indica alosteria. En contraste, la exposición a aprotinina no tenía efecto alguno. n total=8-10. C, imágenes confocales típicas de células HEK que expresan $\alpha\gamma$ ENaC y β ENaC-eGFP antes y una hora después de 100 μ M S18. Los contornos de las células se representan en blanco.

45 Figs. 22A-22D muestran que S18 inhibe la hiperabsorción de la fibrosis quística (CF). A, altura del líquido de la superficie de las vías respiratorias (ASL) con el tiempo en CF HBECs, medida por microscopía confocal XZ después de adición apical de 20 μ l de Ringer con rodamina-dextrano. ■=control; ▲=10 μ M S18. Ambos n=6. B, PD transepitelial sensible a la amilorida en película delgada en los mismos cultivos que A, con microelectrónicos posicionados en el baño ASL y serosal. Barras abiertas, control, barras cerradas, S18. n=6. C, respuesta de la dosis de S18 frente a la altura de ASL en cultivos epiteliales bronquiales humanos primarios (HBECs) de CF medida 8 h después de la adición de S18. D, gráfico de barras de la altura de ASL a las 8 h en CF HBECs. Control (barras abiertas), S18 barras negras, aprotinina, barras grises. NE, elastasa de neutrófilos. ANS, sobrenadante de neutrófilos activados. n total=6. * p<0,05 diferente del vehículo, † p<0,05 diferente de aprotinina.

50 Fig. 23 muestra que S18 es resistente al calor e inhibe todavía la hiperabsorción de CF ASL después de exposición a 67°C. Se midió la altura de ASL en CF HBECs 2 h después de la exposición a S18, S18 a 67°C y/o elastasa de neutrófilos (NE). n total = 6.

60 Fig. 24 muestra que la homeostasis de volumen de ASL requiere pH de ASL correcto y la presencia de SPLUNC1. HBECs normales de pulmón (NL) y CF HBECs se infectaron establemente con retrovirus que contenía shRNA anti-luciferasa o anti-SPLUNC1 (García-Cabellero *et al.*, 2009). Se añadieron 20 μ l de Ringer que contenía rodamina-dextrano y se midió la altura de ASL 3 h más tarde. En algunos casos, se utilizó un Ringer modificado en el que se cambió 50 mM NaCl por POPSO 100 mM. Barras abiertas, NL. Barras negras, CF. Barras grises, NL o CF con POPSO.
 65 n total = 6-9. *=p<005 diferente de control. †=p<0,05 diferente de NL.

- 5 Figs. 25A-25C muestran que SPLUNC1 recombinante, pero no S18, es disfuncional en CF ASL y en medios ácidos. A, gel teñido con Coomassie que muestra SPLUNC1 purificada por filtración en columna de gel S 200 a 0,4 y 0,8 mg/ml (pistas un y 2 respectivamente). B, altura de ASL en NL HBECs (barras abiertas) y CF (barras cerradas) después de exposición a 100 μ M SPLUNC1 o S18. n total = 6. C, se expresó $\alpha\beta\gamma$ ENaC en oocitos de *Xenopus laevis* y se midió la corriente sensible a amilorida, como un indicador específico de la actividad de ENaC. La corriente se normalizó cada día a corrientes basales sensibles a amilorida. Se añadieron SPLUNC1 o S18 a 100 μ M a la solución de baño a pH 7,4 (barras abiertas) o pH6 (barras grises) durante 2 h antes de medir la actividad de ENaC. n total = 7-10. * = p<0,05 diferente del control. †=p<0,05 diferente entre NL y CF.
- 10 Figs. 26A-26B muestran que SPLUNC1 es resistente a la escisión proteolítica a pH6. A, la actividad de la elastasa de neutrófilos es moderadamente mayor a pH 6 que a pH 7,4. B, gel teñido con Coomassie que muestra 10 μ M SPLUNC1 expuestos a 100 nM de elastasa de neutrófilos a pH 6 y 7,4. La reacción se paró a intervalos regulares.
- 15 Fig. 27 muestra que el mutante bisagra de pH SPLUNC1 es todavía funcional en las vías respiratorias de CF. Se midió la altura de ASL durante 24 h por microscopía confocal XZ en CF HBECs después de exposición a 20 ml de PBS que contenía vehículo, SPLUNC1 tipo salvaje (30 μ M) o el mutante bisagra de pH SPLUNC1 (30 μ M). n total = 6.
- Figs. 28A-28D muestran que el péptido S18 no afecta a la función de los canales ASIC1a, -2a y -3.
- 20 Figs. 29A-29C muestran que el péptido S18 interacciona específicamente con la subunidad β -ENaC.
- Figs. 30A-30C muestran que la interacción β -ENaC/S18 es dependiente de la glicosilación.
- Fig. 31 muestra resultados de escaneo de alanina para S18.
- 25 Fig. 32 muestra que S18 induce natriuresis cuando se añade sistémicamente a ratones.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

- 30 La presente invención se describirá a continuación con mayor detalle con referencia a los dibujos adjuntos, en los cuales se muestran realizaciones preferidas de la invención. Esta invención puede, sin embargo, materializarse en formas diferentes y no debería considerarse limitada a las realizaciones que se presentan en esta memoria. En lugar de ello, estas realizaciones se proporcionan a fin de que la presente descripción resulte exhaustiva y completa, y transmita plenamente el alcance de la invención a los expertos en la técnica.
- 35 A no ser que se definan de otro modo, todos los términos técnicos y científicos utilizados en esta memoria tienen el mismo significado que es entendido comúnmente por un experto en la técnica a la que pertenece esta invención. La terminología utilizada en la descripción de la invención en esta memoria tiene por objeto describir únicamente realizaciones particulares y no pretende ser limitante de la invención.
- 40 Las secuencias de nucleótidos se presentan en esta memoria únicamente por una sola cadena, en la dirección 5' a 3', de izquierda a derecha, a no ser que se indique específicamente otra cosa. Los nucleótidos y aminoácidos se representan en esta memoria de la manera recomendada por la Comisión de Nomenclatura Bioquímica IUPAC-IUB o (para los aminoácidos) por el código de una sola letra, o el código de tres letras, ambos de acuerdo con 37C. F. R. §1,822 y el uso establecido.
- 45 Excepto que se indique otra cosa, pueden utilizarse métodos estándar conocidos por los expertos en la técnica para la clonación de genes, amplificación y detección de ácidos nucleicos, etc. Tales métodos son conocidos por los expertos en la técnica. Véase, *v.g.*, Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual 2^a Ed. (Cold Spring Harbor, NY, 1989); Ausubel *et al.* Current Protocols in Molecular Biology (Green Publishing Associates, Inc. y John Wiley y & Sons, Inc., Nueva York).
- 50

I. Definiciones

- 55 Como se utilizan en la descripción de la invención y las reivindicaciones adjuntas, debe entenderse que las formas singulares "un", "uno/a" y "el/la" incluyen asimismo las formas plurales, a no ser que el contexto indique claramente lo contrario.
- 60 Como se utiliza también en esta memoria, "y/o" se refiere a y abarca cualquiera y todas las combinaciones posibles de una o más de las partidas asociadas enumeradas, así como la ausencia de combinaciones cuando se interpreta en la alternativa ("o").
- 65 El término "está constituido esencialmente por" (y sus variantes gramaticales), cuando se aplica a una secuencia de polinucleótido o polipéptido de esta invención, significa un polinucleótido o polipéptido que está constituido tanto por la secuencia citada (*v.g.*, SEQ ID NO) y un total de 10 o menos (*v. g.*, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, ó 10) nucleótidos o aminoácidos adicionales en los extremos 5' y/o 3' N-terminal y/o C-terminal de la secuencia citada de tal modo que la

- función del polinucleótido o polipéptido no se altere materialmente. El total de 10 o menos nucleótidos o aminoácidos adicionales incluye el número n total de nucleótidos o aminoácidos adicionales en ambos extremos juntos. El término "alterado materialmente", como se aplica a los polinucleótidos de la invención, se refiere a un aumento o disminución en la capacidad de expresar el polipéptido codificado de al menos aproximadamente 50% o más en comparación con el nivel de expresión de un polinucleótido constituido por la secuencia citada. El término "alterado materialmente", como se aplica a los polipéptidos la invención, se refiere a un aumento o disminución en la actividad de fijación (v.g., a un canal de sodio o proteína PLUNC) de al menos 50% o más en comparación con actividad de un polipéptido constituido por la secuencia citada.
- El término "modular", "modula", o "modulación" se refiere a la mejora (v.g., un aumento) o inhibición (v.g., una disminución) en el nivel o actividad especificado.
- El término "mejora" o "aumento" se refiere a un aumento en el parámetro especificado de al menos aproximadamente 1,25 veces, 1,5 veces, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 8 veces, 10 veces, 12 veces, o incluso 15 veces.
- El término "inhibir" o "reducir" o variaciones gramaticales de los mismos como se utilizan en esta memoria, se refiere a un decrecimiento o disminución en el nivel o actividad especificado de al menos aproximadamente 15%, 25%, 35%, 40%, 50%, 60%, 75%, 80%, 90%, 95% o más. En realizaciones particulares, la inhibición o reducción da como resultado una actividad pequeña o esencialmente indetectable (como máximo, una cantidad insignificante, v.g., menor que aproximadamente 10% o incluso 5%).
- El término "contacto" o variaciones gramaticales del mismo como se utilizan con respecto a una proteína PLUNC y un canal de sodio, se refiere a poner la proteína PLUNC y el canal de sodio en proximidad lo suficientemente estrecha uno con respecto al otro para que uno ejerza un efecto biológico sobre el otro. En algunas realizaciones, el término contacto significa fijación de la proteína PLUNC al canal de sodio.
- Una cantidad "terapéuticamente eficaz" como se utiliza en esta memoria es una cantidad que proporciona cierta mejora o beneficio al individuo. Expuesto de otro modo, una cantidad "terapéuticamente eficaz" es una cantidad que proporciona cierto alivio, mitigación, o disminución en al menos un síntoma clínico en el individuo. Los expertos en la técnica apreciarán que los efectos terapéuticos no necesitan ser completos o curativos, con tal que se proporcione algún beneficio al individuo.
- Por los términos "tratar", "terapia" o "tratamiento", debe entenderse que la gravedad del estado del individuo se reduce o al menos se mejora o modifica parcialmente y que se consigue cierto alivio, mitigación o disminución en al menos un síntoma clínico.
- Como se utiliza en esta memoria, "ácido nucleico", "secuencia de nucleótidos", y "polinucleótido" se utilizan de modo intercambiable y abarcan tanto RNA como DNA, con inclusión de cDNA, DNA genómico, mRNA, DNA o RNA sintético (v.g., sintetizado químicamente) y quimeras de RNA y DNA. El término ácido nucleico se refiere a una cadena de nucleótidos con indiferencia de la longitud de la cadena. El ácido nucleico puede ser bicatenario o monocatenario. En caso de ser bicatenario, el ácido nucleico puede ser una cadena de sentido o antisentido. El ácido nucleico puede sintetizarse utilizando análogos o derivados oligonucleotídicos (v.g., nucleótidos inosina o fosforoditioato). Tales oligonucleótidos pueden utilizarse, por ejemplo, para preparar ácidos nucleicos que tienen capacidades alteradas de apareamiento de bases o resistencia incrementada a las nucleasas. La presente invención proporciona adicionalmente un ácido nucleico que es el complemento (que puede ser un complemento total o un complemento parcial) de una secuencia de ácido nucleico o nucleótido de esta invención.
- Un "polinucleótido aislado" es una secuencia nucleotídica (v.g., DNA o RNA) que no es inmediatamente contigua con secuencias nucleotídicas a las cuales es inmediatamente contigua (una en el extremo 5' y una en el extremo 3') en el genoma existente naturalmente del organismo del que se deriva. Así, en una realización, un ácido nucleico aislado incluye algunas o la totalidad de las secuencias 5' no codificantes (v.g., promotoras) que son inmediatamente contiguas a una secuencia codificante. Así pues, el término incluye, por ejemplo, un DNA recombinante que está incorporado en un vector, en un plásmido o virus autónomamente replicante, o en el DNA genómico de un procarionte o eucariote, o que existe como una molécula separada (v.g., un cDNA o un fragmento de DNA genómico producido por PCR o tratamiento con endonucleasas de restricción), con independencia de otras secuencias. El mismo incluye también un DNA recombinante que es parte de un ácido nucleico híbrido que codifica un polipéptido o secuencia peptídica adicional. Un polinucleótido aislado que incluye un gen no es un fragmento de un cromosoma que incluye dicho gen, sino que más bien incluye la región codificante y regiones reguladoras asociadas con el gen, pero no genes adicionales encontrados naturalmente en el cromosoma.
- El término "aislado" puede referirse a un ácido nucleico, secuencia de nucleótidos o polipéptido que está sustancialmente exento de material celular, material viral, y/o medio de cultivo (cuando se produce por técnicas de DNA recombinante), o precursores químicos u otros productos químicos (cuando se sintetiza químicamente). Además, un "fragmento aislado" es un fragmento de un ácido nucleico, secuencia de nucleótidos o polipéptido que no existe naturalmente como fragmento y no se encontraría en el estado natural. "Aislado" no significa que la preparación

sea técnicamente pura (homogénea), sino que es suficientemente puro para proporcionar el polipéptido o ácido nucleico en una forma en la cual puede utilizarse el mismo para el propósito deseado.

5 Una célula aislada se refiere a una célula que está separada de otros componentes con los cuales está asociada normalmente la misma en su estado natural. Por ejemplo, una célula aislada puede ser una célula en medio de cultivo y/o una célula en un vehículo farmacéuticamente aceptable de esta invención. Así, una célula aislada puede suministrarse a y/o introducirse en un individuo. En algunas realizaciones, una célula aislada puede ser una célula que se retira de un individuo y se manipula como se describe en esta memoria *ex vivo* y se devuelve después al individuo.

10 El término "fragmento", como se aplica a un polinucleótido, debe entenderse que significa una secuencia nucleotídica de longitud reducida con relación a una secuencia de ácido nucleico o nucleótidos de referencia y que comprende, está constituida esencialmente por, y/o consiste en una secuencia nucleotídica de nucleótidos contiguos idénticos o casi idénticos (*v.g.*, 90%, 92%, 95%, 98%, 99% idénticos) a la secuencia de ácido nucleico o nucleótidos de referencia. Un fragmento de ácido nucleico de este tipo conforme a la invención puede estar incluido, en caso apropiado, en un polinucleótido mayor del cual es un constituyente el mismo. En algunas realizaciones, tales fragmentos pueden comprender, estar constituidos esencialmente por, y/o consistir en oligonucleótidos que tienen una longitud de al menos aproximadamente 8, 10, 12, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 75, 100, 150, 200, o más nucleótidos consecutivos de una secuencia de ácido nucleico o nucleótidos conforme a la invención. En otras realizaciones, tales fragmentos pueden comprender, estar constituidos esencialmente por, y/o consistir en oligonucleótidos que tienen una longitud menor que aproximadamente 200, 150, 100, 75, 60, 50, 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15, 12, 10, 8, o menos nucleótidos consecutivos de una secuencia de ácido nucleico o nucleótidos conforme a la invención.

25 El término "fragmento", como se aplica a un polipéptido, debe entenderse que significa una secuencia de aminoácidos de longitud reducida con relación a una secuencia de polipéptidos o aminoácidos de referencia y que comprende, está constituida esencialmente por, y/o consiste en una secuencia aminoacídica de aminoácidos contiguos idénticos o cuasi-idénticos (*v.g.*, 90%, 92%, 95%, 98%, 99% idénticos) a la secuencia de polipéptidos o aminoácidos de referencia. Dicho fragmento polipeptídico conforme a la invención puede estar incluido, en caso apropiado, en un polipéptido mayor del cual es constituyente el mismo. En algunas realizaciones, tales fragmentos pueden comprender, estar constituidos esencialmente por, y/o consistir en péptidos que tienen una longitud de al menos aproximadamente 4, 6, 8, 10, 12, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 75, 100, 150, 200, o más aminoácidos consecutivos de una secuencia de polipéptidos o aminoácidos conforme a la invención. En otras realizaciones, tales fragmentos pueden comprender, estar constituidos esencialmente por y/o consistir en péptidos que tienen una longitud menor que aproximadamente 200, 150, 100, 75, 60, 50, 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15, 12, 10, 8, 6, 4, o menos aminoácidos consecutivos de una secuencia de polipéptidos o aminoácidos conforme a la invención.

35 Un "vector" es cualquier molécula de ácido nucleico para la clonación de y/o transferencia de un ácido nucleico en una célula. Un vector puede ser un replicón al cual puede unirse otra secuencia de nucleótidos para permitir la replicación de la secuencia de nucleótidos unida. Un "replicón" puede ser cualquier elemento genético (*v.g.*, plásmido, fago, cósmido, cromosoma, genoma viral) que funciona como una unidad autónoma de replicación de ácido nucleico *in vivo*, es decir, capaz de replicación bajo su propio control. El término "vector" incluye moléculas de ácido nucleico tanto virales como no virales (*v.g.*, plásmido) para la introducción de un ácido nucleico en una célula *in vitro*, *ex vivo*, y/o *in vivo*. Puede utilizarse un gran número de vectores conocidos en la técnica para manipular ácidos nucleicos, incorporar elementos de respuesta y promotores en genes, etc. Por ejemplo, la inserción de los fragmentos de ácido nucleico correspondientes a elementos de respuesta y promotores en un vector adecuado puede realizarse por ligación de los fragmentos de ácido nucleico apropiados en un vector seleccionado que tiene términos cohesivos complementarios. Alternativamente, los extremos de las moléculas de ácido nucleico pueden modificarse enzimáticamente o puede producirse cualquier sitio por ligación de secuencias nucleotídicas (enlazadores) a los extremos del ácido nucleico. Tales vectores pueden modificarse por ingeniería genética de modo que contengan secuencias codificantes de marcadores seleccionables que permitan la selección de células que contienen el vector y/o han incorporado el ácido nucleico del vector en el genoma celular. Tales marcadores permiten la identificación y/o selección de células hospedadoras que incorporan y expresan las proteínas codificadas por el marcador. Un vector "recombinante" hace referencia a un vector viral o no viral que comprende una o más secuencias nucleotídicas heterólogas (es decir, transgenes", *v.g.*, 2, 3, 4, 5 o más secuencias nucleotídicas heterólogas.

55 Se han utilizado vectores virales en una gran diversidad de aplicaciones de suministro de genes en células, así como individuos animales vivos. Vectores virales que pueden utilizarse incluyen, pero sin carácter limitante, vectores de retrovirus, lentivirus, virus adeno-asociados, poxvirus, alfavirus, baculovirus, virus vaccinia, herpesvirus, virus Epstein-Barr, y adenovirus. Vectores no virales incluyen plásmidos, liposomas, lípidos cargados eléctricamente (citofectinas) complejos ácido nucleico-proteína, y biopolímeros. Además de un ácido nucleico de interés, un vector puede comprender también una o más regiones reguladoras, y/o marcadores seleccionables útiles en la selección, medición, y monitorización de resultados de transferencia de ácido nucleico (suministro a tejidos específicos, duración de la expresión, etc.).

65 Los vectores pueden introducirse en las células deseadas por métodos conocidos en la técnica, *v.g.* transfección, electroporación, microinyección, transducción, fusión celular, DEAE-dextrano, precipitación con fosfato de calcio, lipofección (fusión de lisosomas), utilización de un cañón de genes, o un transportador de vectores de ácido nucleico

(véase, *v.g.*, Wu *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 267: 963 (1992); Wu *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 263: 14621 (1988); and Hartmut *et al.*, Solicitud de Patente de Canadá No. 2,012, 311, presentada el 15 de marzo de 1990).

En algunas realizaciones, puede suministrarse un polinucleótido de esta invención a una célula *in vivo* por lipofección. Lípidos catiónicos sintéticos diseñados para limitar las dificultades y riesgos encontrados con la transfección mediada por liposomas pueden utilizarse para preparar liposomas para transfección *in vivo* de una secuencia nucleotídica de esta invención (Felgner *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 7413 (1987); Mackey, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 85: 8027 (1988); y Ulmer *et al.*, *Science* 259: 1745 (1993)). El uso de lípidos catiónicos puede promover la encapsulación de ácidos nucleicos cargados negativamente, y promover también la fusión con membranas celulares cargadas negativamente (Felgner *et al.*, *Science* 337: 387 (1989)). Compuestos y composiciones lipídicas particularmente útiles para la transferencia de ácidos nucleicos se describen en las Publicaciones de Patente Internacional WO95/18863 y WO96/17823, y en la Patente U. S. No. 5,459, 127. El uso de lipofección para introducir secuencias nucleotídicas exógenas en órganos específicos *in vivo* presenta ciertas ventajas prácticas. El direccionamiento molecular de liposomas a células específicas representa un área ventajosa. Está claro que el direccionamiento de la transfección a tipos de células particulares sería particularmente preferido en un tejido con heterogeneidad celular, tal como páncreas, hígado, riñón, y cerebro. Los lípidos pueden acoplarse químicamente a otras moléculas para el propósito de direccionamiento (Mackey, *et al.*, 1988, *supra*). Péptidos direccionados, *v.g.*, hormonas o neurotransmisores, y proteínas tales como anticuerpos, o moléculas no peptídicas pueden acoplarse químicamente a liposomas.

En diversas realizaciones, pueden utilizarse otras moléculas para facilitar el suministro de un ácido nucleico *in vivo*, tal como un oligopéptido catiónico (*v.g.*, WO 95/21, 931), péptidos derivados de proteínas de fijación de ácidos nucleicos (*v.g.*, WO 96/25,508), y/o un polímero catiónico (*v.g.*, WO 95/21, 231).

Asimismo, es posible introducir un vector *in vivo* como ácido nucleico desnudo (véanse Patentes U. S. Nos. 5,693,622, 5,589,466 y 5,580,859). También pueden utilizarse enfoques de suministro de ácido nucleico mediados por receptores (Curiel *et al.*, *Hum. Gene Ther.*, 3: 147 (1992); Wu *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 262: 4429 (1987)).

El término "transfección" o "transducción" significa la absorción de ácido nucleico exógeno o heterólogo (RNA y/o DNA) por una célula. Una célula ha sido "transfectada" o "transducida" con un ácido nucleico exógeno o heterólogo cuando dicho ácido nucleico ha sido introducido o suministrado al interior de la célula. Una célula ha sido "transformada" por ácido nucleico exógeno o heterólogo cuando el ácido nucleico transfectado o transducido imparte un cambio fenotípico en la célula y/o un cambio en una actividad o función de la célula. El ácido nucleico transformante puede integrarse (unirse covalentemente) en el DNA cromosómico que constituye el genoma de la célula o puede estar presente como un plásmido estable.

Como se utilizan en esta memoria, los términos "proteína" y "polipéptido" se emplean intercambiabilmente y abarcan tanto péptidos como proteínas, a no ser que se indique otra cosa.

Una "proteína de fusión" es un polipéptido producido cuando dos secuencias nucleotídicas heterólogas o fragmentos de las mismas que codifican dos (o más) polipéptidos diferentes que no se encuentran fusionados unos a otros en la naturaleza se fusionan entre sí en el marco de lectura correcto de la traducción. Polipéptidos de fusión ilustrativos incluyen fusiones de un polipéptido de la invención (o un fragmento del mismo) a la totalidad o una porción de glutatión-S-transferasa, proteína de fijación de maltosa, o una proteína informadora (*v.g.*, Proteína Verde Fluorescente, β -glucuronidasa, β -galactosidasa, luciferasa, *etc.*), hemaglutinina, c-myc, epítipo FLAG, *etc.*

Como se utiliza en esta memoria, un polipéptido "funcional" o "fragmento funcional" es uno que retiene sustancialmente al menos una actividad biológica asociada normalmente con dicho polipéptido (*v.g.*, fijación o inhibición de un canal de sodio o una proteína PLUNC). En realizaciones particulares, el polipéptido "funcional" o "fragmento funcional" retiene sustancialmente la totalidad de las actividades poseídas por el péptido no modificado. Por "retiene sustancialmente" la actividad biológica, se entiende que el polipéptido retiene al menos aproximadamente 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 75%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99%, o más, de la actividad biológica del polipéptido nativo (y puede incluso tener un nivel de actividad mayor que el polipéptido nativo). Un polipéptido "no funcional" es uno que exhibe poca o esencialmente ninguna actividad biológica detectable asociada normalmente con el polipéptido (*v.g.*, como máximo, sólo una cantidad insignificante, *v.g.*, menos que aproximadamente 10% o incluso 5%). Las actividades biológicas tales como fijación de proteínas y actividad angiogénica pueden medirse utilizando ensayos que son bien conocidos en la técnica y que se describen en esta memoria. En algunas realizaciones, el término "fragmento funcional" abarca también compuestos que son miméticos de una porción del polipéptido (*v.g.*, peptidomiméticos) que tienen al menos una actividad biológica que es sustancialmente igual que una actividad asociada con el polipéptido.

Por el término "expresar" o "expresión" de una secuencia codificante polinucleotídica, se entiende que la secuencia se transcribe, y opcionalmente, se traduce. Típicamente, conforme a la presente invención, la expresión de una secuencia codificante de la invención dará como resultado la producción del polipéptido de la invención. El polipéptido entero expresado o fragmento puede funcionar también en células intactas sin purificación.

El término "aproximadamente", como se utiliza en esta memoria con referencia a un valor que puede medirse tal como una cantidad de polipéptido, dosis, tiempo, temperatura, actividad enzimática u otra actividad biológica y análogos, debe entenderse que abarca variaciones de $\pm 20\%$, $\pm 10\%$, $\pm 5\%$, $\pm 1\%$, $\pm 0,5\%$, o incluso $\pm 0,1\%$ de la cantidad especificada.

5

II. Activación Decreciente de los Canales de Sodio

Un primer aspecto de la invención se refiere a la capacidad de las proteínas PLUNC para fijarse a un canal de sodio y prevenir la activación del canal de sodio, inhibiendo con ello el flujo de iones sodio. Así, un aspecto de la presente invención se refiere a un método de inhibición de la activación de un canal de sodio, que comprende la puesta en contacto (*v.g.*, fijación) de un canal de sodio con una proteína PLUNC o un fragmento funcional de la misma. En una realización, el canal de sodio es un canal de sodio epitelial (ENaC), *v.g.*, ENaC humano. En otra realización, el canal de sodio es uno que es similar en secuencia y/o estructura a ENaC. La inhibición de la activación de los canales de sodio puede medirse por cualquier método conocido en la técnica o expuesto en esta memoria, incluyendo, sin limitación, la medición del flujo de sodio o el cambio de potencial a través de una membrana, a través de una célula, o a través de un revestimiento natural o artificial. La inhibición puede ser al menos aproximadamente 20%, *v.g.*, al menos aproximadamente 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, o 100% con relación a la activación del canal de sodio en ausencia de una proteína PLUNC.

La proteína PLUNC puede ser cualquier proteína de la familia PLUNC que pueda fijarse a e inhibir la activación de un canal de sodio, *v.g.*, fijarse a β -ENaC. En una realización, la proteína PLUNC es una proteína PLUNC humana. En otra realización, la proteína PLUNC es SPLUNC1 o SPLUNC2. La proteína PLUNC puede ser una proteína PLUNC existente naturalmente o una proteína PLUNC en la cual la secuencia de aminoácidos ha sido modificada (*v.g.*, con inserciones, deleciones, sustituciones, o cualquier combinación de las mismas). En ciertas realizaciones, la proteína PLUNC modificada exhibe una modulación en una o más bioactividades de la proteína PLUNC, *v.g.*, una disminución en la sensibilidad al pH. En otras realizaciones, se modifican (insertan, deleccionan o sustituyen) no más de 20 aminoácidos de la secuencia PLUNC existente naturalmente, *v.g.* no más de 15, 10, 9, 8, 7, 6, o 5 aminoácidos.

El método de inhibición de la activación de un canal de sodio puede llevarse a cabo, *v.g.*, sobre un canal de sodio aislado, un canal de sodio en una membrana artificial, o un canal de sodio en una célula. En una realización, el canal de sodio está presente en una célula aislada, *v.g.*, una célula o línea de células primarias cultivada. En otra realización, la célula aislada forma parte de un cultivo de células epiteliales, *v.g.*, un revestimiento epitelial natural o artificial, *v.g.*, un cultivo de células en un dispositivo (tal como una cámara Ussing) en el cual características tales como flujo iónico y/o potencial pueden medirse a través del revestimiento. En otra realización, la célula forma parte de un tejido aislado o un cultivo de tejido. En una realización adicional, que no forma parte de la invención aquí reivindicada, la célula puede estar presente en un animal, *v.g.*, un animal que es un modelo de enfermedad un individuo que se encuentra en necesidad de tratamiento.

En una realización, el paso de puesta en contacto (*v.g.*, fijación) del canal de sodio con una proteína PLUNC comprende suministrar la proteína PLUNC o un fragmento funcional u homólogo de la misma a una célula que comprende el canal de sodio. En otra realización, el paso de puesta en contacto (*v.g.*, fijación) comprende suministrar un polinucleótido que codifica la proteína PLUNC o un fragmento funcional u homólogos de la misma a una célula que comprende el canal de sodio.

Como se utiliza en esta memoria, el término "homólogo" se utiliza para hacer referencia a un polipéptido que difiere de un polipéptido existente naturalmente por modificaciones menores en el polipéptido existente naturalmente, pero que retiene significativamente una actividad biológica del polipéptido existente naturalmente. Modificaciones menores incluyen, sin limitación, cambios en una o unas pocas cadenas laterales de aminoácidos, cambios en uno o unos pocos aminoácidos (con inclusión de deleciones, inserciones, y/o sustituciones), cambios en la estereoquímica de uno o unos pocos átomos, y derivatizaciones menores, incluyendo, sin limitación, metilación, glicosilación, fosforilación, acetilación, miristoilación, prenilación, palmitación, amidación, y adición de glicosilfosfatidil-inositol. La expresión "retiene sustancialmente", como se utiliza en esta memoria, se refiere a un fragmento, homólogo, u otra variante de un polipéptido que retiene al menos aproximadamente 20% de la actividad del polipéptido existente naturalmente (*v.g.*, fijación a un canal de sodio), *v.g.*, aproximadamente 30%, 40%, 50% o más. Otras actividades biológicas, que dependen del polipéptido, pueden incluir sensibilidad al pH, actividad enzimática, fijación de receptores, fijación de ligandos, inducción de un factor de crecimiento, un efecto de transducción de señales celulares, etc.

En una realización, el método comprende suministrar a una célula que comprende un canal de sodio una proteína PLUNC aislada. En realizaciones ilustrativas, la proteína PLUNC comprende, está constituida esencialmente por, o consiste en la secuencia de aminoácidos de la proteína PLUNC conocida públicamente (*v.g.*, como se describe en GenBank y se describe en esta memoria) o un fragmento funcional de la misma. En otra realización, la proteína PLUNC aislada comprende, está constituida esencialmente por, o consiste en una secuencia de aminoácidos que es al menos 70% idéntica, *v.g.*, al menos 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos conocida públicamente o un fragmento funcional de la misma.

65

ES 2 716 723 T3

Las secuencias de aminoácidos de SPLUNC1 humana (SEQ ID NO: 1) y SPLUNC2 humana (SEQ ID NO: 2) se describen a continuación. Se indican los residuos cisteína conservados que están separados por 43 aminoácidos y pueden ser importantes para la actividad.

SPLUNC1

10	20	30	40	50	60
MFQTGGGLIVF	YGLLAQTMAQ	FGGLPVPLDQ	TLPLNVNPA	PLSPTGLAGS	LTNALSNGLL
70	80	90	100	110	120
SGLLGILEN	LPLLDILKPG	GGTSGGLLGG	LLGKVTVIP	GLNNIIDIKV	TDPQLLELGL
130	140	150	160	170	180
VQSPDGHRLY	VTIPLGIKIQ	VNTPLVGASL	LRLAVKLDIT	AEILAVRDKQ	ERIHVLVGD
190	200	210	220	230	240
THSPGSLQIS	LLDGLGPLPI	QGLLDSLTI	LNKVLPELVQ	GNVPLVNEV	LRGLDITLVH
250					
5 DIVNMLIHGL	QFVIKV				

SPLUNC2

10	20	30	40	50	60
MLQLWKLVL	CGVLTGTSES	LLDNLGNDLS	NVVDKLEPVL	HEGLETVDNT	LKGILEKLV
70	80	90	100	110	120
DLGVLQKSSA	WQLAKQKAQE	AEKLLNNVIS	KLLPTNTDIF	GLKISNSLIL	DVKAEPIDG
130	140	150	160	170	180
KGLNLSFPVT	ANVTVAGPII	GQIINLKASL	DLTAVTIET	DPQTHQPVAV	LGEASDPTS
190	200	210	220	230	240
ISLSLLDKHS	QIINKFVNSV	INTLKSTVSS	LLQKEIPLI	RIFIHSLDVN	VIQQVVDNPQ

HKTQLQTLI

10 Las proteínas PLUNC de la invención incluyen también porciones o fragmentos funcionales. La longitud del fragmento no es crítica con tal que el mismo retenga sustancialmente la actividad biológica del polipéptido (v.g., actividad de fijación de canales de sodio). Fragmentos ilustrativos comprenden al menos aproximadamente 4, 6, 8, 10, 12, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 75, 100, 150, 200, o más aminoácidos contiguos de una proteína PLUNC. En otras realizaciones, el fragmento comprende no más de aproximadamente 200, 150, 100, 75, 50, 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15, 12, 10, 8, 6, o

15 esencialmente por, o consiste en una secuencia desde aproximadamente el residuo 20 a aproximadamente el residuo de SPLUNC1 humana, v.g., aproximadamente el residuo 22 a aproximadamente el residuo 39, o la secuencia correspondiente (v.g., los aproximadamente 20 aminoácidos inmediatamente después del péptido señal) de otra proteína PLUNC.

20 En una realización, el fragmento funcional comprende, está constituido esencialmente por, o consiste en la secuencia de aminoácidos GGLPVPLDQTLPLNVNPA (SEQ ID NO: 11), correspondiente a los aminoácidos 22-39 de SPLUNC1 humana, o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70% de identidad de secuencia con ella, v.g. al menos 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% de identidad de secuencia con ella. En otra realización, el

25 fragmento funcional comprende, está constituido esencialmente por, o consiste en la secuencia parcial de aminoácidos LPVPLDQT (SEQ ID NO: 14). Se ha demostrado que cada uno de estos residuos de aminoácido es importante para la actividad inhibidora de ENaC.

Análogamente, los expertos en la técnica apreciarán que la presente invención abarca también polipéptidos de fusión (y secuencias polinucleotídicas que codifican los mismos) que comprenden una proteína PLUNC (o un fragmento

30 funcional de ella). Por ejemplo, puede ser útil expresar el polipéptido (o fragmento funcional) como una proteína de fusión que puede ser reconocida por un anticuerpo disponible comercialmente (v.g., restos FLAG) o como una proteína de fusión que puede ser purificada más fácilmente de otro modo (v.g., por adición de una cola poli-His). Adicionalmente, pueden producirse proteínas de fusión que mejoran la estabilidad del polipéptido, v.g., proteínas de fusión que comprenden proteína de fijación de maltosa (MBP) o glutatión-S-transferasa. Como otra alternativa, la

35 proteína de fusión puede comprender una molécula informadora. En otras realizaciones, la proteína de fusión puede comprender un polipéptido que proporciona una función o actividad que es la misma que o diferente de la actividad del polipéptido, v.g., una actividad o función de direccionamiento, fijación, o enzimática.

Análogamente, se entenderá que los polipéptidos descritos específicamente en esta memoria tolerarán típicamente sustituciones en la secuencia de aminoácidos y retendrán sustancialmente la actividad biológica. Para identificar polipéptidos de la invención distintos de los descritos específicamente en esta memoria, las sustituciones de aminoácidos pueden estar basadas en cualquier característica conocida en la técnica, con inclusión de la semejanza o diferencias relativas de los sustituyentes de cadenas laterales de aminoácidos, por ejemplo, su hidrofobicidad, hidrofilia, carga, tamaño, y análogas.

Sustituciones de aminoácidos distintas de las descritas en esta memoria pueden realizarse cambiando los codones de la secuencia de DNA (o secuencia de RNA), conforme a la tabla de codones siguiente:

TABLA 1

Aminoácido			Codones					
Alanina	Ala	A	GCA	GCC	GCG	GCT		
Cisteína	Cys	C	TGC	TGT				
Ácido aspártico	Asp	D	GAC	GAT				
Ácido glutámico	Glu	E	GAA	GAG				
Fenilalanina	Phe	F	TTC	TTT				
Glicina	Gly	G	GGA	GGC	GGG	GGT		
Histidina	His	H	CAC	CAT				
Isoleucina	Ile	I	ATA	ATC	ATT			
Lisina	Lys	K	AAA	AAG				
Leucina	Leu	L	TTA	TTG	CTA	CTC	CTG	CTT
Metionina	Met	M	ATG					
Asparagina	Asn	N	AAC	AAT				
Prolina	Pro	P	CCA	CCC	CCG	CCT		
Glutamina	Gln	Q	CAA	CAG				
Arginina	Arg	R	AGA	AGG	CGA	CGC	CGG	CGT
Serina	Ser	S	AGC	ACT	TCA	TCC	TCG	TCT
Treonina	Thr	T	ACA	ACC	ACG	ACT		
Valina	Val	V	GTA	GTC	GTG	GTT		
Triptófano	Trp	W	TGG					
Tirosina	Tyr	Y	TAC	TAT				

En la identificación de secuencias de aminoácidos que codifican polipéptidos distintos de los descritos específicamente en esta memoria, puede considerarse el índice hidropático de los aminoácidos. La importancia del índice hidropático de un aminoácido en cuanto a conferir función biológica interactiva a una proteína está comprendida generalmente en la técnica (véase, Kyte y Doolittle, *J. Mol. Biol.*, 157: 105 (1982)). Está aceptado que el carácter hidropático relativo del aminoácido contribuye a la estructura secundaria de la proteína resultante, la cual define a su vez la interacción de la proteína con otras moléculas, por ejemplo, enzimas, sustratos, receptores, DNA, anticuerpos, antígenos y análogos.

Se ha asignado a cada aminoácido un índice hidropático basándose en sus características de hidrofobicidad y carga (Kyte y Doolittle, *id.*); éstos son: isoleucina (+4,5); valina (+4,2); leucina (+3,8); fenilalanina (+2,8); cisteína/cistina (+2,5); metionina (+1,9); alanina (+1,8); glicina (-0,4); treonina (-0,7); serina (-0,8); triptófano (-0, 9); tirosina (-1,3); prolina (-1, 6); histidina (-3,2); glutamato (-3,5); glutamina (-3,5); aspartato (-3,5); asparagina (-3,5); lisina (-3,9); y arginina (-4,5).

De acuerdo con ello, el índice hidropático del aminoácido (o secuencia de aminoácidos) puede considerarse cuando se modifican los polipéptidos descritos específicamente en esta memoria.

Se entiende también en la técnica que la sustitución de aminoácidos puede hacerse basándose en su hidrofilia. La Patente U. S. No. 4,554,101 establece que el valor medio de la hidrofilia máxima local de una proteína, regido por la hidrofilia de sus aminoácidos adyacentes, está correlacionado con una propiedad biológica de la proteína.

Como se detalla en la Patente U. S. No. 4,554,101, se han asignado a los residuos de aminoácidos los valores de hidrofiliia siguientes: arginina (+3,0); lisina ($\pm 3,0$); aspartato ($+3,0 \pm 1$); glutamato ($+3,0 \pm 1$); serina (+0,3); asparagina (+0,2); glutamina (+0,2); glicina (0); treonina (-0,4); prolina ($-0,5 \pm 1$); alanina (-0,5); histidina (-0,5); cisteína (-1,0); metionina (-1,3); valina (-1,5); leucina (-1,8); isoleucina (-1,8); tirosina (-2,3); fenilalanina (-2,5); triptófano (-3,4).

5 Así pues, la hidrofiliia del aminoácido (o secuencia de aminoácidos) puede considerarse cuando se identifican polipéptidos adicionales aparte de los descritos específicamente en esta memoria.

10 Un aspecto de la invención está basado en el descubrimiento de que las proteínas PLUNC inhiben los canales de sodio de una manera sensible al pH. En particular, las proteínas PLUNC son capaces de inhibir los canales de sodio a pH neutro, pero no a valores de pH ácidos. Sin quedar ligados por teoría alguna, se cree que las proteínas PLUNC sufren un cambio de conformación a pH ácido que impide la exposición del sitio activo (v.g., los aminoácidos 22-39 de SPLUNC1 humana) a los canales de sodio. Así, en ciertas realizaciones, la proteína PLUNC de la presente invención comprende una secuencia de aminoácidos modificada que reduce o elimina la desactivación de las proteínas PLUNC a pHs ácidos. En una realización, una región bisagra sensible al pH, v.g. uno o más de los residuos de aminoácido K94, N103, N104, K138, Q140, N142, y D193, se modifican para prevenir un cambio de conformación de la proteína PLUNC a pHs ácidos. En una realización, uno o más aminoácidos en la región bisagra se sustituye, v.g., con alanina. En otra realización, la totalidad de los aminoácidos en la región bisagra se sustituyen, v.g., con alanina. Las proteínas PLUNC modificadas insensibles al pH se utilizan ventajosamente para inhibir los canales de sodio en condiciones ácidas, v.g., como se encuentran en los pulmones de los pacientes de fibrosis quística.

20 En realizaciones de la invención, el polinucleótido que codifica la proteína PLUNC (o fragmento funcional) se hibridará a las secuencias de ácido nucleico que codifican proteínas PLUNC que se conocen en la técnica o fragmentos de las mismas en condiciones estándar como es conocido por los expertos en la técnica y codifican un polipéptido funcional o fragmento funcional del mismo.

25 Por ejemplo, la hibridación de tales secuencias puede llevarse a cabo en condiciones de severidad reducida, severidad media o incluso condiciones severas (v.g., condiciones representadas por una severidad de lavado con formamida al 35-40% con 5x solución de Denhardt, 0,5% SDS y 1x SSPE a 37°C; condiciones representadas por una severidad de lavado con formamida al 40-45% con 5x solución de Denhardt, 0,5% SDS, y 1x SSPE a 42°C; y condiciones representadas por una severidad de lavado con formamida al 50% con 5x solución de Denhardt, 0,5% SDS y 1x SSPE a 42°C, respectivamente) a las secuencias de polinucleótidos que codifican la proteína PLUNC o fragmentos funcionales de la misma descritos específicamente en esta memoria. Véase, v.g., Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual 2ª Ed. (Cold Spring Harbor, NY, 1989).

30 En otras realizaciones, las secuencias de polinucleótidos que codifican la proteína PLUNC tienen al menos aproximadamente una identidad de secuencia de 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o mayor con las secuencias de ácido nucleico conocidas públicamente (descritas en GenBank) o fragmentos funcionales de las mismas y codifican un polipéptido funcional o fragmento funcional del mismo.

35 Adicionalmente, se apreciará por los expertos en la técnica que puede existir variabilidad en los polinucleótidos que codifican los polipéptidos (y fragmentos de los mismos) de la presente invención debido a la degeneración del código genético. La degeneración del código genético, que permite que diferentes secuencias de ácido nucleico codifiquen el mismo polipéptido, es bien conocida en la bibliografía (Véase, v.g., Tabla 1).

40 Análogamente, los polipéptidos (y fragmentos de los mismos) de la invención incluyen polipéptidos que tienen al menos una identidad de secuencia de aproximadamente 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, o mayor con las secuencias de polipéptidos conocidas públicamente.

45 Como se conoce en la técnica, pueden utilizarse cierto número de programas diferentes para identificar si un polinucleótido o polipéptido tiene identidad o semejanza de secuencia con una secuencia conocida. La identidad o semejanza de secuencia puede determinarse utilizando métodos estándar conocidos en la técnica, que incluyen, pero sin carácter limitante, el algoritmo de identidad local de secuencia de Smith & Waterman, *Adv. Appl. Math.*, 2: 482 (1981), por el algoritmo de alineamiento de identidad de secuencias de Needleman & Wunsch, *J. Mol. Biol.*, 48: 443 (1970), por el método de búsqueda de semejanza de Pearson & Lipman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 2444 (1988), por implementaciones computarizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA, y TFASTA en el Paquete de Software Wisconsin Genetics, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, WI), el programa de secuencias Best Fit descrito por Devereux *et al.*, *Nucl. Acid Res.*, 12: 387 (1984), utilizando preferiblemente los ajustes por defecto, o por inspección.

50 Un ejemplo de algoritmo útil es PILEUP. PILEUP crea un alineamiento de secuencias múltiples a partir de un grupo de secuencias afines utilizando alineamientos progresivos por parejas. El mismo puede representar también gráficamente un árbol que muestra las relaciones de agrupación utilizadas para crear el alineamiento. PILEUP utiliza una simplificación del método de alineamiento progresivo de Feng & Doolittle, *J. Mol. Evol.*, 35: 351 (1987); el método es similar al descrito por Higgins & Sharp, *CABIOS* 5: 151 (1989).

55

Otro ejemplo de un algoritmo útil es el algoritmo BLAST, descrito en Altschul *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 215: 403 (1990) y Karlin *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 5873 (1993). Un programa BLAST particularmente útil es el programa WU-BLAST-2 que se obtuvo de Altschul *et al.*, *Meth. Enzymol.*, 266: 460 (1996); blast.wustl.edu/blast/README.html. WU-BLAST-2 utiliza varios parámetros de búsqueda, que se ajustan preferiblemente a los valores por defecto. Los parámetros son valores dinámicos y son establecidos por el propio programa dependiendo de la composición de la secuencia particular y la composición de la base de datos particular contra la cual se está buscando la secuencia de interés; sin embargo, los valores pueden ajustarse para aumentar la sensibilidad.

Un algoritmo útil adicional es gapped BLAST, que ha sido comunicado por Altschul *et al.*, *Nucleic Acid Res.*, 25: 3389 (1997).

Un valor de identidad porcentual de secuencia de aminoácidos está determinado por el número de residuos coincidentes idénticos dividido por el número total de residuos de la secuencia "más larga" en la región alineada. La secuencia "más larga" es la que tiene el número mayor de residuos reales en la región alineada (las lagunas introducidas por WU-BLAST-2 para maximizar el registro de alineamiento se ignoran).

De manera análoga, el porcentaje de identidad de secuencia de ácidos nucleicos con respecto a la secuencia codificante de los polipéptidos descritos en esta memoria se define como el porcentaje de residuos nucleotídicos en la secuencia candidato que son idénticos a los nucleótidos en el polinucleótido descrito específicamente en esta memoria.

El alineamiento puede incluir la introducción de lagunas en las secuencias a alinear. Adicionalmente, para secuencias que contienen más o menos aminoácidos que los polipéptidos descritos específicamente en esta memoria se entiende que, en una realización, el porcentaje de identidad de secuencia se determinará basándose en el número de aminoácidos idénticos en relación con el número total de aminoácidos. Así, por ejemplo, la identidad de secuencia de secuencias más cortas que una secuencia descrita específicamente en esta memoria, se determinará utilizando el número de aminoácidos en la secuencia más corta, en una realización. En los cálculos de porcentaje de identidad no se asigna peso relativo a diversas manifestaciones de variación de secuencia, tales como inserciones, deleciones, sustituciones, etc.

En una realización, únicamente las identidades se registran positivamente (+1) y se asigna a todas las formas de variación de secuencia que incluyen lagunas un valor de "0", lo que obvia la necesidad de una escala ponderada o parámetros como se describen más adelante para los cálculos de semejanza de secuencia. La identidad porcentual de secuencia puede calcularse, por ejemplo, dividiendo el número de residuos coincidentes idénticos por el número total de residuos de la secuencia "más corta" en la región alineada y multiplicando por 100. La secuencia "más larga" es aquella que tiene el mayor número de residuos reales en la región alineada.

Los expertos en la técnica apreciarán que los polinucleótidos aislados que codifican los polipéptidos de la invención están asociados típicamente con secuencias apropiadas de control de la expresión, *v.g.*, señales de control transcripción/traducción y señales de poliadenilación.

Adicionalmente, se apreciará que pueden utilizarse una diversidad de elementos promotores/intensificadores dependiendo del nivel y la expresión específica de tejido deseados. El promotor puede ser constitutivo o inducible, dependiendo del patrón de expresión deseado. El promotor puede ser nativo o extraño y puede ser una secuencia natural o sintética. Por extraño, se entiende que la región de iniciación de la transcripción no se encuentra en el hospedador tipo salvaje en el cual se introduce la región de iniciación de la transcripción. El promotor se selecciona de tal modo que el mismo sea funcional en la o las células diana de interés.

Para ilustración, la secuencia codificante del polipéptido puede asociarse operativamente con un promotor inmediato-temprano de citomegalovirus (CMV) mayor, un promotor de albúmina, un promotor del Factor de Elongación 1- α (EF1- α), un promotor PyK, un promotor MFG, o un promotor del virus del sarcoma de Rous.

Elementos promotores inducible/intensificador incluyen elementos inducibles por hormonas y elementos inducibles por metales, y otros promotores regulados por compuestos suministrados exógenamente, que incluyen, sin limitación, el promotor metalotioneína (MT) inducible por zinc; el promotor del virus del tumor mamario del ratón (MMTV) inducible por dexametasona (Dex); el sistema promotor de la polimerasa T7 (véase WO 98/10088); el promotor de insectos ecdisona (No *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 3346 (1996)); el sistema reprimible de la tetraciclina (Gossen *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 5547 (1992)); el sistema inducible de la tetraciclina (Gossen *et al.*, *Science* 268: 1766 (1995); véase también Harvey *et al.*, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2: 512 (1998)); el sistema inducible de RU486 (Wang *et al.*, *Nat. Biotech.*, 15: 239 (1997); Wang *et al.*, *Gene Ther.*, 4: 432 (1997)); y el sistema inducible de rapamicina (Magari *et al.*, *J. Clin. Invest.*, 100: 2865 (1997)).

Además, se requieren generalmente señales de iniciación específicas para la traducción eficiente de secuencias codificantes polipeptídicas insertadas. Estas secuencias de control de la traducción, que pueden incluir el codón de iniciación ATG y secuencias adyacentes, pueden tener una diversidad de orígenes, tanto naturales como sintéticos.

La presente misión proporciona adicionalmente células que comprenden los polinucleótidos y polipéptidos aislados de la invención. La célula puede ser una célula cultivada o una célula *in vivo*, *v.g.*, para uso en métodos terapéuticos, métodos diagnósticos, métodos de escrutinio, métodos para el estudio de la acción biológica de las proteínas PLUNC, en métodos para producir los polipéptidos, o en métodos de mantenimiento o amplificación de los polinucleótidos la invención, etc. En otra realización, la célula es una célula *ex vivo* que ha sido aislada de un individuo. La célula *ex vivo* puede modificarse y reintroducirse luego en el individuo para propósitos diagnósticos o terapéuticos; sin embargo, dichos usos no forman parte de la invención aquí reivindicada.

En realizaciones particulares, la célula es la célula epitelial no transformada o una célula de una línea de células epiteliales.

El polinucleótido aislado puede incorporarse en un vector de expresión. Vectores de expresión compatibles con diversas células hospedadoras son bien conocidos en la técnica y contienen elementos adecuados para transcripción y traducción de ácidos nucleicos. Típicamente, un vector de expresión contiene una "casete de expresión", que incluye, en la dirección 5' a 3', un promotor, una secuencia codificante que codifica una proteína PLUNC o canal de sodio o fragmento funcional del mismo asociada operativamente con el promotor, y, opcionalmente, una secuencia de terminación que incluye una señal de parada para RNA polimerasa y una señal de poliadenilación para poliadenilasa.

Ejemplos no limitantes de promotores de esta invención incluyen CYC1, HIS3, GAL1, GAL4, GAL10, ADH1, PGK, PHO5, GAPDH, ADC1, TRP1, URA3, LEU2, ENO, TPI, y promotores de fosfatasas alcalinas (útiles para expresión en *Saccharomyces*); el promotor AOX1 (útil para expresión en *Pichia*); los promotores β -lactamasa, lac, ara, tet, trp, IP_L, IP_R, T7, tac, y trc (útiles para expresión en *Escherichia coli*); promotores regulados por luz, específicos de semillas, específicos de polen, específicos de ovario, relacionados con patogénesis o enfermedades, el virus del mosaico de la coliflor 35 S, el virus mínimo CMV 35 S, el virus del mosaico de los nervios de mandioca (CsVMV), la proteína de fijación de las clorofilas a/b, ribulosa 1,5-bisfosfato-carboxilasa, promotores específicos de brotes, promotores específicos de raíz, quitinasa, promotores inducibles por estrés, virus baciliforme del tungro del arroz, super-promotor de plantas, leucina-aminopeptidasa de patata, nitrato-reductasa, manopina-sintasa, nopalina-sintasa, ubiquitina, proteína zeína, y promotores de antocianinas (útiles para expresión en células vegetales).

Ejemplos adicionales de promotores animales y de mamíferos conocidos en la técnica incluyen, pero sin carácter limitante, la región promotora temprana de SV40 (SV40e), el promotor contenido en la repetición terminal larga (LTR) 3' del virus del sarcoma de Rous (RSV), los promotores de los genes E1A o genes del promotor principal tardío (MLP) de adenovirus (Ad), el promotor temprano del citomegalovirus (CMV), el promotor timidina-quinasa (TK) del virus del herpes simple, el promotor IE1 de baculovirus, el promotor del factor de elongación 1-alfa (EF1), el promotor fosfoglicerato-quinasa (PGK), el promotor ubiquitina (Ubc), un promotor de albúmina, las secuencias reguladoras del promotor de metalotioneína-L de ratón y regiones de control de la transcripción, los promotores ubicuos (HPRT, vimentina, α -actina, tubulina y análogos), los promotores de los filamentos intermedios (desmina, neurofilamentos, queratina, GFAP, y análogos), los promotores de genes terapéuticos (del tipo MDR, CFTR o factor VIII, y análogos), promotores relacionados con patogénesis y/o enfermedades, y promotores que exhiben especificidad de tejido, tales como la región de control del gen I de elastasa, que es activa en las células acinares pancreáticas; la región de control del gen de insulina activa en las células beta pancreáticas, la región de control del gen de inmunoglobulina activa en células linfoides, la región de control del virus del tumor mamario del ratón activa en células testiculares, de mama, linfoides y mastocitos; el promotor del gen de albúmina, las regiones de control ApoA1 y ApoAII activas en hígado, la región de control del gen de alfa-fetoproteína activa en hígado, la región de control del gen de alfa 1-antitripsina activa en el hígado, la región de control del gen de beta-globina activa en células mieloides, la relación del control del gen de la proteína básica mielina activa en los oligodendrocitos del cerebro, la región de control del gen de la cadena ligera-2 de miosina activa en los músculos esqueléticos, y la región de control del gen de la hormona liberadora de gonadotropina activa en el hipotálamo, el promotor piruvato-quinasa, el promotor villina, el promotor de la proteína intestinal de fijación de ácidos grasos, el promotor de α -actina de las células musculares lisas, y análogos. Adicionalmente, cualquiera de estas secuencias de expresión de la presente invención puede modificarse por adición de secuencias intensificadoras y/o reguladoras y análogos.

Intensificadores que pueden utilizarse en realizaciones de la invención incluyen, pero sin carácter limitante: un intensificador de SV40, un intensificador de citomegalovirus (CMV), un intensificador del factor de elongación I (EF1), intensificadores de levadura, intensificadores de genes virales, y análogos.

Regiones de control de la terminación, es decir, secuencias terminadoras o de poliadenilación, pueden derivarse de diversos genes nativos de los hospedadores preferidos. En algunas realizaciones de la invención, la región de control de la terminación puede comprender o derivarse de una secuencia sintética, una señal de poliadenilación sintética, una señal de poliadenilación tardía de SV40, una señal de poliadenilación de SV40, una señal de poliadenilación de la hormona del crecimiento de los bovinos (BGH), secuencias terminadoras virales, o análogos.

Será evidente para los expertos en la técnica que puede utilizarse cualquier vector adecuado para suministrar el polinucleótido a una célula o un individuo. El vector puede suministrarse a las células *in vivo*. En otras realizaciones, el vector puede suministrarse a las células *ex vivo*, después de lo cual las células que contienen el vector se suministran al individuo. La elección del vector de suministro puede hacerse basándose en cierto número de factores

conocidos en la técnica, que incluyen la edad y especie del hospedador objetivo, suministro *in vitro* frente a suministro *in vivo*, nivel y persistencia de expresión deseados, finalidad propuesta (v.g., para terapia o escrutinio), la célula u órgano objetivo, ruta de suministro, tamaño del polinucleótido aislado, problemas de seguridad, y análogos.

- 5 Vectores adecuados incluyen vectores plasmídicos, vectores virales (v.g., retrovirus, alfavirus; virus vaccinia; adenovirus, virus adeno-asociados y otros parvovirus, lentivirus, poxvirus, o virus del herpes simple), vectores lipídicos, protectores poli-lisina, vectores de polímeros poliamínicos sintéticos, y análogos.

10 Cualquier vector viral que sea conocido en la técnica puede utilizarse en la presente invención. Protocolos para la producción de vectores virales recombinantes y para utilización de vectores virales para suministro de ácido nucleico pueden encontrarse en Ausubel *et al.*, Current Protocols in Molecular Biology (Green Publishing Associates, Inc. y John Wiley & Sons, Inc., Nueva York) y otros manuales estándar de laboratorio (v.g., Vectores para Terapia Génica. En: *Current Protocols in Human Genetics*. John Wile y and Sons, Inc.: 1997).

15 Pueden emplearse también métodos de transferencia no virales. Muchos métodos no virales de transferencia de ácido nucleico están basados en mecanismos normales utilizados por células de mamífero para absorción y transporte intracelular de macromoléculas. En realizaciones particulares, los sistemas no virales de suministro de ácido nucleico están basados en mecanismos endocíticos para la absorción de la molécula de ácido nucleico por la célula diana. Sistemas ilustrativos de suministro de ácido nucleico de este tipo incluyen sistemas derivados de liposomas, conjugados de poli-lisina, y envolturas virales artificiales.

25 En realizaciones particulares, se utilizan vectores plasmídicos en la práctica de la presente invención. Por ejemplo, pueden introducirse plásmidos desnudos en células musculares por inyección en el tejido. La expresión puede prolongarse a lo largo de muchos meses, aunque el número de células positivas es típicamente bajo (Wolff *et al.*, *Science* 247: 247 (1989)). Se ha demostrado que los lípidos catiónicos favorecen la introducción de ácidos nucleicos en algunas células en cultivo (Felgner and Ringold, *Nature* 337: 387 (1989)). Se ha demostrado que la inyección de complejos de DNA plasmídico de lípidos catiónicos en la circulación de los ratones da como resultado la expresión del DNA en el pulmón (Brigham *et al.*, *Am. J. Med. Sci.*, 298: 278 (1989)). Una ventaja del DNA plasmídico es que el mismo puede introducirse en células no replicantes.

30 En una realización representativa, una molécula de ácido nucleico (v.g., un plásmido) puede quedar atrapada en una partícula lipídica que lleva cargas positivas en su superficie y, opcionalmente, marcarse con anticuerpos contra antígenos de la superficie celular del tejido diana (Mizuno *et al.*, *No Shinkei Geka* 20: 547 (1992); publicación PCT WO 91/06309; solicitud de patente japonesa 1047381; y publicación de patente europea EP-A-43075).

35 Liposomas constituidos por moléculas catiónicas anfifílicas son útiles como vectores no virales para suministro de ácido nucleico *in vitro* e *in vivo* (revisado en Crystal, *Science* 270: 404 (1995); Blaese *et al.*, *Cancer Gene Ther.*, 2: 291 (1995); Behr *et al.*, *Bioconjugate Chem.*, 5: 382 (1994); Rem y *et al.*, *Bioconjugate Chem.*, 5: 647 (1994); y Gao *et al.*, *Gene Therapy* 2: 710 (1995)). Se cree que los liposomas cargados positivamente se complejan con ácidos nucleicos cargados negativamente por interacciones electrostáticas para formar complejos lípido: ácido nucleico. Los complejos lípido: ácido nucleico presentan varias ventajas como vectores de transferencia de ácido nucleico. Al contrario que los vectores virales, los complejos lípido: ácido nucleico pueden utilizarse para transferir casetes de expresión de tamaño esencialmente ilimitado. Dado que los complejos carecen de proteínas, los mismos pueden suscitar menos respuestas inmunógenas e inflamatorias. Además, aquéllos no pueden replicarse o recombinarse para formar un agente infeccioso y exhiben baja frecuencia de integración. Cierta número de publicaciones han demostrado que los lípidos catiónicos anfifílicos pueden mediar el suministro del ácido nucleico *in vivo* e *in vitro* (Felgner *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 7413 (1987); Loeffler *et al.*, *Meth. Enzymol.*, 217: 599 (1993); Felgner *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 269: 2550 (1994)).

50 Varios grupos han informado del uso de complejos lípido anfifílico catiónico-ácido nucleico para transfección *in vivo* tanto en animales como en humanos (revisado en Gao *et al.*, *Gene Therap* y 2: 710 (1995); Zhu *et al.*, *Science* 261: 209 (1993); y Thierry *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 9742 (1995)). La Patente U. S. No. 6,410,049 describe un método de preparación de complejos lípido catiónico: ácido nucleico que tienen una vida útil prolongada.

55 Los vectores de expresión pueden estar diseñados para expresión de polipéptidos en células procariotas o eucariotas. Por ejemplo, pueden expresarse polipéptidos en células bacterianas tales como *E. coli*, células de insecto (v.g., el sistema de expresión de baculovirus), células de levadura, células de plantas o células de mamífero. Algunas células hospedadoras adecuadas se examinan con mayor detalle en Goeddel, *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology* 185, Academic Press, San Diego, Calif. (1990). Ejemplos de vectores bacterianos incluyen pQE70, pQE60, pQE-9 (Qiagen), pBS, pD10, phagescript, psiX174, pbluescript SK, pbsks, pNH8A, pNH16a, pNH18A, pNH46A (Stratagene); ptrc99a, pKK223-3, pKK233-3, pDR540, y pRIT5 (Pharmacia). Ejemplos de vectores para expresión en la levadura *S. cerevisiae* incluyen pYepSecl (Baldari *et al.*, *EMBO J.*, 6: 229 (1987)), pMFa (Kurjan y Herskowitz, *Cell* 30: 933 (1982)), pJRY88 (Schultz *et al.*, *Gene* 54: 113 (1987)), y pYES2 (Invitrogen Corporation, San Diego, Calif.). Vectores de baculovirus disponibles para expresión de ácidos nucleicos a fin de producir proteínas en células de insecto cultivadas (v.g., células de Sf 9) incluyen la serie pAc (Smith *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 3: 2156 (1983)) y la serie pVL (Lucklow y Summers *Virology* 170: 31 (1989)).

Ejemplos de vectores de expresión de mamífero incluyen WLNEO, pSV2CAT, pOG44, pXT1, pSG (Stratagene) pSVK3, PBPV, pMSG, PSVL (Pharmacia), pCDM8 (Seed, *Nature* 329: 840 (1987)) y pMT2PC (Kaufman *et al.*, *EMBO J*, 6: 187 (1987)). Cuando se utilizan en células de mamífero, las funciones de control del vector de expresión son proporcionadas a menudo por elementos reguladores virales. Por ejemplo, promotores utilizados comúnmente se derivan de poliovirus, adenovirus 2, citomegalovirus y el Virus 40 de los simios.

Se han utilizado vectores virales en una gran diversidad de aplicaciones de suministro de genes en células, así como en individuos animales vivos. Vectores virales que pueden utilizarse incluyen, pero sin carácter limitante, vectores de retrovirus, lentivirus, virus adenoasociados, poxvirus, alfavirus, baculovirus, virus vaccinia, herpesvirus, virus Epstein-Barr, adenovirus, geminivirus, y caulimovirus. Vectores no virales incluyen plásmidos, liposomas, lípidos cargados eléctricamente (citofectinas), complejos ácido nucleico-proteína, y biopolímeros. Además de un ácido nucleico de interés, un vector puede comprender también una o más regiones reguladoras, y/o marcadores seleccionables útiles en la selección, medición, y monitorización de resultados de la transferencia de ácidos nucleicos (suministro a tejidos específicos, duración de la expresión, etc.).

Además de las secuencias de control reguladoras expuestas anteriormente, el vector de expresión recombinante puede contener secuencias nucleotídicas adicionales. Por ejemplo, el vector de expresión recombinante puede codificar un gen marcador seleccionable para identificar células hospedadoras que llevan incorporado el vector.

El DNA del vector puede introducirse en células procariotas o eucariotas por técnicas convencionales de transformación o transfección. Como se utilizan en esta memoria, los términos "transformación" y "transfección" se refieren a una diversidad de métodos reconocidos en la técnica para introducir ácidos nucleicos extraños (*v.g.*, DNA y RNA) en una célula hospedadora, con inclusión de co-precipitación con fosfato de calcio o cloruro de calcio, transfección mediada por DEAE-dextrano, lipofección, electroporación, microinyección, liposomas cargados con DNA, complejos lipofectamina-DNA, tratamiento de células por ultrasonidos, bombardeo de genes utilizando microproyectiles de alta velocidad, y transfección mediada por virus. Métodos adecuados para transformación o transfección de células hospedadoras pueden encontrarse en Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* 2ª Ed. (Cold Spring Harbor, NY, 1989), y otros manuales de laboratorio.

Si se desea integración estable, a menudo sólo una pequeña fracción de células (en particular, células de mamífero) integran el DNA extraño en su genoma. Con objeto de identificar y seleccionar los integrantes, puede introducirse en las células hospedadoras un ácido nucleico que codifica un marcador seleccionable (*v.g.*, resistencia a los antibióticos) junto con el ácido nucleico de interés. Marcadores seleccionables preferidos incluyen los que confieren resistencia a fármacos, tales como G418, higromicina y metotrexato. Ácidos nucleicos que codifican un marcador seleccionable pueden introducirse en una célula hospedadora en el mismo vector que el que comprende el ácido nucleico de interés, o pueden introducirse en un vector separado. Las células transfectadas establemente con el ácido nucleico introducido pueden identificarse por selección de fármaco (*v.g.*, las células que han incorporado el gen marcador seleccionable sobrevivirán, mientras que las otras células morirán).

Los polipéptidos y fragmentos de la invención pueden modificarse para uso *in vivo* por la adición, en los extremos amino- y/o carboxil-terminales, de un agente bloqueante para facilitar la supervivencia del polipéptido relevante *in vivo*. Esto puede ser útil en aquellas situaciones en las cuales los extremos del péptido tienden a ser degradados por proteasas antes de la absorción celular. Tales agentes bloqueantes pueden incluir, sin limitación, secuencias peptídicas adicionales afines o no afines que pueden fijarse a los residuos terminales amino y/o carboxilo del péptido a administrar. Esto puede hacerse químicamente durante la síntesis del péptido o por tecnología de DNA recombinante por métodos familiares para los expertos de habilidad media. Alternativamente, agentes bloqueantes tales como ácido piroglutámico u otras moléculas conocidas en la técnica pueden fijarse a los residuos terminales amino y/o carboxilo, o el grupo amino en el término amino o grupo carboxilo en el término carboxilo puede reemplazarse con un resto diferente. Análogamente, los péptidos pueden acoplarse covalente o no covalentemente a proteínas "portadoras" farmacéuticamente aceptables antes de la administración.

En una realización, los polinucleótidos, vectores, polipéptidos, o sus homólogos de la invención se administran directamente a un individuo. Generalmente, los compuestos de la invención se suspenderán en un vehículo farmacéuticamente aceptable (*v.g.*, solución salina fisiológica) y se administrarán por vía oral o por infusión intravenosa, o se administrarán subcutáneamente, por vía intramuscular, intratecal, intraperitoneal, intrarrectal, intravaginal, intranasal, intragástrica, intratraqueal, o intrapulmonar. Aquellos pueden suministrarse directamente al sitio de la enfermedad o trastorno, tal como pulmones, riñón, o intestinos. La dosis requerida depende de la elección de la vía de administración; la naturaleza de la formulación; la naturaleza de la enfermedad del paciente; el tamaño, peso, área superficial, edad, y sexo del individuo; otros fármacos que se administren; y el criterio del médico encargado del tratamiento. Las dosis adecuadas están comprendidas en el intervalo de 0,01- 100,0 µg/kg. Pueden esperarse variaciones amplias en la dosis necesaria teniendo en cuenta la diversidad de polinucleótidos, polipéptidos, fragmentos, y homólogos disponibles y las diferentes eficiencias de las diversas rutas de administración. Por ejemplo, podría esperarse que la administración oral requiera dosis mayores que la administración por inyección intravenosa. Las variaciones en estos niveles de dosificación pueden ajustarse utilizando rutinas empíricas estándar para optimización como es bien comprendido en la técnica. Las administraciones pueden ser simples o múltiples (*v. g.*, 2-

3-, 4-, 6-, 8-, 10-, 20-, 50-, 100-, 150-, o más veces. La encapsulación de los polinucleótidos, polipéptidos, fragmentos, y homólogos en un vehículo de suministro adecuado (v.g., micropartículas polímeras o dispositivos implantables) puede aumentar la eficiencia de suministro, particularmente para el suministro oral.

5 Conforme a ciertas realizaciones, los polinucleótidos, vectores, polipéptidos, u homólogos de los mismos pueden direccionarse a células o tejidos específicos *in vivo*. Vehículos de direccionamiento del suministro, que incluyen liposomas y sistemas vectores virales se conocen en la técnica. Por ejemplo, puede direccionarse un liposoma a una
 10 célula o tejido diana particular por utilización de un agente de direccionamiento, tal como un anticuerpo, receptor o ligando soluble, incorporado con el liposoma, para direccionarse a una célula o tejido particular al cual puede fijarse la molécula diana. Liposomas de direccionamiento se describen, por ejemplo, en Ho *et al.*, *Biochemistry* 25: 5500 (1986); Ho *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 262: 13979 (1987); Ho *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 262: 13973 (1987); y la Patente U. S. No. 4, 957,735 concedida a Huang *et al.*). Vectores virales envueltos pueden modificarse para suministrar una molécula de ácido nucleico a una célula diana por modificación o sustitución de una proteína de envoltura de tal modo que el virus infecta un tipo de célula específico. En los vectores adenovirales, el gen codificante de las fibras de fijación puede modificarse para codificar un dominio proteínico que se fija a un receptor específico de la célula. Los vectores de herpesvirus están direccionados naturalmente a las células del sistema nervioso central y periférico. Alternativamente, la ruta de administración puede utilizarse para direccionar una célula o tejido específico. Por ejemplo, se ha demostrado que la administración intracoronaria de un vector adenoviral es eficaz para el suministro de un gen a miocitos cardiacos (Maurice *et al.*, *J. Clin. Invest.*, 104: 21 (1999)). Se ha demostrado que el suministro intravenoso de liposomas cardiacos que contienen colesterol se dirige preferentemente a los tejidos pulmonares (Liu *et al.*, *Nature Biotechnol.*, 15: 167 (1997)), y media eficazmente la transferencia y expresión de genes *in vivo*. Otros ejemplos de suministro direccionado *in-vivo* con éxito de moléculas de ácido nucleico se conocen en la técnica. Por último, una molécula de ácido nucleico recombinante puede expresarse selectivamente (*es decir*, preferentemente, de modo sustancialmente exclusivo) en una célula diana por selección de una secuencia de control de la transcripción, y preferiblemente, un promotor, que es inducido selectivamente en la célula diana y permanece sustancialmente inactivo en las células distintas a la diana.

Otro aspecto de la invención se refiere a un método de inhibir la absorción de sodio por un canal de sodio, que comprende la puesta en contacto (v.g., fijación) del canal de sodio con una proteína PLUNC o un fragmento funcional u homólogo de la misma. La inhibición de la absorción de sodio puede medirse por cualquier método conocido en la técnica o descrito en esta memoria.

Otro aspecto de la invención se refiere a un método de aumento del volumen de revestimiento fluido de una superficie mucosa epitelial, que comprende poner en contacto (v.g., fijar) un canal de sodio presente en la superficie de la mucosa epitelial con una proteína PLUNC o un fragmento funcional u homólogo de la misma. El volumen de revestimiento fluido de una superficie mucosa epitelial puede medirse por cualquier método conocido en la técnica o descrito en esta memoria.

Un aspecto ulterior de la invención se refiere a un método de reducción del nivel de un canal de sodio presente en la superficie de una célula, que comprende la puesta en contacto (v.g., fijación) del canal de sodio con una proteína PLUNC o un fragmento funcional u homólogo de la misma.

Un aspecto adicional de la invención se refiere a un método de tratamiento de un trastorno sensible a la inhibición de la absorción de sodio a través de una superficie mucosa epitelial en un individuo que se encuentra en necesidad de ello, que comprende suministrar al individuo una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína PLUNC o un fragmento funcional u homólogo de la misma. El trastorno puede ser, por ejemplo, un trastorno pulmonar (v.g., un trastorno asociado con aclaramiento del moco, fibrosis quística, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, bronquitis aguda o crónica, o asma), un trastorno gastrointestinal (v.g., enfermedad inflamatoria del intestino), un trastorno renal, o un trastorno cardiovascular.

Otro aspecto de la invención se refiere a un método de regulación del balance de sales, volumen sanguíneo, presión sanguínea (v.g., por inducción de natriuresis), y/o motilidad del colon en un individuo que se encuentra en necesidad de ello, que comprende suministrar al individuo una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína PLUNC o un fragmento u homólogo funcional de la misma.

III. Aumento de la Activación de los Canales de Sodio

Un aspecto diferente de la invención se refiere a métodos de prevención de la fijación de una proteína PLUNC a un canal de sodio, permitiendo con ello la activación del canal de sodio y aumentando el flujo de iones sodio. Así, un aspecto de la invención se refiere a un método de aumentar la activación de un canal de sodio, que comprende inhibir la fijación de una proteína PLUNC al canal de sodio. En una realización, el canal de sodio es un canal de sodio epitelial (ENaC), v.g., ENaC humano. En otra realización, el canal de sodio es uno que es similar en secuencia y/o estructura a ENaC. En otra realización, la inhibición de la fijación de una proteína PLUNC aumenta la escisión del canal de sodio por una proteasa, conduciendo con ello a la activación del canal. La fijación de una proteína PLUNC al canal de sodio puede medirse por cualquier método conocido en la técnica o como se describe en esta memoria. La activación del

canal de sodio puede ser al menos aproximadamente 20%, *v.g.*, al menos aproximadamente 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, o 100% con relación a la activación del canal de sodio en ausencia de la inhibición de la fijación.

5 La proteína PLUNC puede ser cualquier proteína de la familia PLUNC que pueda fijarse a e inhibir la activación de un canal de sodio. En una realización, la proteína PLUNC es una proteína PLUNC humana, así como fragmentos funcionales y homólogos de la misma. En otra realización, la proteína PLUNC es SPLUNC1 o SPLUNC2.

10 El método de inhibición de la activación de un canal de sodio puede realizarse, *v.g.*, sobre un canal de sodio aislado, un canal de sodio en una membrana artificial, o un canal de sodio en una célula. En una realización, el canal de sodio está presente en una célula aislada, *v.g.*, una célula primaria o línea de células cultivada. En otra realización, la célula aislada forma parte de un cultivo de células epiteliales, *v.g.*, un revestimiento epitelial natural o artificial, *v.g.*, un cultivo de células en un dispositivo (tal como una cámara Ussing) en el cual pueden medirse características tales como flujo iónico y/o potencial a través del revestimiento o un tejido o cultivo tisular aislado. En una realización adicional, que no forma parte de la invención aquí reivindicada, la célula puede estar presente en un animal, *v.g.*, un animal que es un modelo de enfermedad o un individuo en necesidad de tratamiento.

15 En una realización, la inhibición de la fijación de una proteína PLUNC comprende suministrar un inhibidor de proteínas PLUNC a la proteína PLUNC. El inhibidor de proteínas PLUNC puede ser cualquier compuesto o molécula que inhiba la capacidad de PLUNC para fijarse a un canal de sodio o inhiba de cualquier otra manera la activación del canal de sodio. En una realización, el inhibidor de proteínas PLUNC es un anticuerpo que reconoce específicamente la proteína PLUNC, *v.g.*, el sitio activo de la proteína PLUNC.

20 El término "anticuerpo" o "anticuerpos" como se utiliza en esta memoria, se refiere a todos los tipos de inmunoglobulinas, con inclusión de IgG, IgM, IgA, IgD, e IgE. El anticuerpo puede ser monoclonal o policlonal y puede ser de cualquier especie original, incluyendo (por ejemplo), ratón, rata, conejo, caballo, cabra, oveja, camello, humano, o puede ser un anticuerpo quimérico. Véase, *v.g.*, Walker *et al.*, *Molec. Immunol.*, 26: 403 (1989). Los anticuerpos pueden ser anticuerpos recombinantes monoclonales producidos conforme a los métodos descritos en la Patente U. S. No. 4,474,893 o la Patente U. S. No. 4,816,567. Los anticuerpos pueden construirse también típicamente conforme al método descrito en la Patente U. S. No. 4,676,980.

25 Fragmentos de anticuerpo incluidos dentro del alcance de la presente invención incluyen, por ejemplo, fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂, y Fv; diacuerpos; anticuerpos lineales; moléculas de anticuerpos monocatenarios; y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo. Tales fragmentos pueden producirse por técnicas conocidas. Por ejemplo, pueden producirse fragmentos F(ab')₂ por digestión con pepsina de la molécula de anticuerpo, y pueden generarse fragmentos Fab por reducción de los puentes disulfuro de los fragmentos F(ab')₂. Alternativamente, pueden construirse bibliotecas de expresión de Fab para permitir una identificación rápida y fácil de fragmentos Fab monoclonales con la especificidad deseada (Huse *et al.*, *Science* 254: 1275 (1989)).

30 Los anticuerpos de la invención pueden alterarse o mutarse para compatibilidad con especies distintas de la especie en la que se produjo el anticuerpo. Por ejemplo, los anticuerpos pueden ser humanizados o camelizados. Formas humanizadas de anticuerpos no humanos (*v.g.*, murinos) son inmunoglobulinas quiméricas, cadenas de inmunoglobulina o fragmentos de las mismas (tales como Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ u otras subsecuencias de anticuerpos fijadoras de antígeno) que contienen secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. Los anticuerpos humanizados incluyen inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las cuales residuos de una región determinante de la complementariedad (CDR) del receptor están reemplazados por residuos de una CDR de una especie no humana (anticuerpo donante) tal como ratón, rata o conejo que tiene la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, residuos marco Fv de la inmunoglobulina humana están reemplazados por residuos no humanos correspondientes. Los anticuerpos humanizados pueden comprender también residuos que no se encuentran en el anticuerpo receptor ni en la CDR o las secuencias marco importadas. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente la totalidad de al menos uno, y típicamente dos, dominios variables, en los cuales la totalidad o sustancialmente la totalidad de las regiones CDR corresponden a las de una inmunoglobulina no humana y la totalidad o sustancialmente la totalidad de las regiones FR son las de una secuencia de consenso de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado comprenderá también óptimamente al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente la de una inmunoglobulina humana (Jones *et al.*, *Nature* 321: 522 (1986); Riechmann *et al.*, *Nature*, 332: 323 (1988); y Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.*, 2: 593 (1992)).

35 Métodos para humanización de anticuerpos no humanos son bien conocidos en la técnica. Generalmente, un anticuerpo humanizado tiene uno o más residuos de aminoácido introducidos en el mismo a partir de una fuente que es no humana. A menudo se hace referencia a estos residuos de aminoácido no humanos como residuos "importados", que se toman típicamente de un dominio variable "de importación". La humanización puede realizarse esencialmente siguiendo el método de Winter y colaboradores (Jones *et al.*, *Nature* 321: 522 (1986); Riechmann *et al.*, *Nature* 332: 323 (1988); Verhoeven *et al.*, *Science* 239: 1534 (1988)), empleando CDRs o secuencias CDR de roedor en sustitución de las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. De acuerdo con ello, Tales anticuerpos "humanizados" son anticuerpos quiméricos (Patente U. S. No. 4,816,567), en donde sustancialmente menos de un dominio variable humano intacto ha sido sustituido por la secuencia correspondiente de una especie no humana. En la práctica, los

anticuerpos humanizados son típicamente anticuerpos humanos en los cuales algunos residuos CDRs y posiblemente algunos residuos FR están sustituidos por residuos de sitios análogos en anticuerpos de roedor.

Pueden producirse también anticuerpos humanos utilizando diversos métodos conocidos en la técnica, que incluyen bibliotecas de presentación de fago (Hoogenboom y Winter, *J. Mol. Biol.*, 227: 381 (1991); Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 222: 581 (1991)). Las técnicas de Cole *et al.* y Boerner *et al.* están disponibles también para la preparación de anticuerpos monoclonales humanos (Cole *et al.*, *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, p. 77 (1985) y Boerner *et al.*, *J. Immunol.*, 147: 86 (1991)). Análogamente, pueden producirse anticuerpos humanos por introducción de loci de inmunoglobulinas humanas en animales transgénicos, *v.g.*, ratones en los cuales los genes de inmunoglobulina endógenos han sido parcial o completamente desactivados. Después de la exposición, se observa la producción de anticuerpo humano, que se asemeja estrechamente al observado en humanos en todos los aspectos, con inclusión del reordenamiento de los genes, el ensamblaje, y el repertorio de anticuerpos. Este enfoque se describe, por ejemplo, en las Patentes U. S. Nos. 5,545,807; 5,545,806; 5,569,825; 5,625,126; 5,633,425; 5,661,016, y en las publicaciones científicas siguientes: Marks *et al.*, *Bio/Technology* 10: 779 (1992); Lonberg *et al.*, *Nature* 368: 856 (1994); Morrison, *Nature* 368: 812 (1994); Fishwild *et al.*, *Nature Biotechnol.*, 14: 845 (1996); Neuberger, *Nature Biotechnol.*, 14: 826 (1996); Lonberg y Huszar, *Intern. Rev. Immunol.*, 13: 65 (1995).

Los anticuerpos policlonales utilizados para llevar a cabo la presente invención pueden producirse por inmunización de un animal adecuado (*v.g.*, conejo, cabra, etc.) con un antígeno, para lo cual se fija a la diana un anticuerpo monoclonal, se recoge suero inmune del animal, y se separan los anticuerpos policlonales del suero inmune, conforme a procedimientos conocidos.

Los anticuerpos monoclonales utilizados para llevar a cabo la presente invención pueden producirse en una línea de células de hibridoma conforme a técnica de Kohler y Milstein, *Nature* 265: 495 (1975). Por ejemplo, una solución que contiene el antígeno apropiado puede inyectarse en un ratón y, después de un tiempo suficiente, sacrificarse el ratón y obtenerse células del bazo. Las células del bazo se immortalizan luego por fusión de las mismas con células de mieloma o con células de linfoma, típicamente en presencia de polietilenglicol, para producir células de hibridoma. Las células de hibridoma se cultivan luego en un medio adecuado y el sobrenadante se somete a escrutinio para anticuerpos monoclonales que tengan la especificidad deseada. Anticuerpos monoclonales Fab pueden producirse en *E. coli* por métodos recombinantes conocidos por los expertos en la técnica. Véase, *v.g.*, Huse, *Science* 246: 1275 (1989).

Anticuerpos específicos para el polipéptido diana pueden obtenerse también por métodos de presentación de fago conocidos en la técnica.

Pueden utilizarse diversos inmunoensayos para el escrutinio a fin de identificar anticuerpos que tengan la especificidad deseada para los polipéptidos de esta invención. En la técnica se conocen numerosos protocolos para fijación competitiva o ensayos inmunoradiométricos que utilizan anticuerpos policlonales o monoclonales con especificidad establecida. Tales inmunoensayos implican típicamente la medida de formación de complejo entre un antígeno y su anticuerpo específico (*v.g.*, formación de complejo antígeno/anticuerpo). Puede utilizarse un inmunoensayo de dos sitios de base monoclonal que utiliza anticuerpos monoclonales reactivos para dos epítopos no interferentes en los polipéptidos o péptidos de esta invención al igual que un ensayo de fijación competitiva.

Los anticuerpos pueden estar conjugados a un soporte sólido (*v.g.*, cuentas, placas, portaobjetos o pocillos formados a partir de materiales tales como látex o poliestireno) conforme a técnicas conocidas. Los anticuerpos pueden estar conjugados análogamente a grupos detectables tales como radiomarcadores (*v.g.*, ³⁵S, ¹²⁵I, ¹³¹I), marcadores enzimáticos (*v.g.*, peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina), y marcadores de fluorescencia (*v.g.*, fluoresceína) conforme a técnicas conocidas. La determinación de la formación de un complejo anticuerpo/antígeno en los métodos de esta invención puede hacerse por detección de, por ejemplo, precipitación, aglutinación, floculación, radioactividad, desarrollo o cambio de color, fluorescencia, luminiscencia, etc., como es bien conocido en la técnica.

En una realización, el inhibidor de la proteína PLUNC es un aptámero que reconoce específicamente la proteína PLUNC, *v.g.*, el sitio activo de la proteína PLUNC. Recientemente, han aparecido pequeños RNAs monocatenarios estructurados, conocidos también como aptámeros de RNA como alternativas viables a la terapia con moléculas pequeñas y basada en anticuerpos (Que-Gewirth *et al.*, *Gene Ther.*, 14: 283 (2007); Ireson *et al.*, *Mol. Cancer Ther.*, 5: 2957 (2006)). Los aptámeros de RNA se fijan específicamente a proteínas diana con alta afinidad, son muy estables, carecen de inmunogenicidad, y provocan respuestas biológicas. Los aptámeros se desarrollan por medio de un método de selección iterativa denominado SELEX (evolución sistemática de ligandos por enriquecimiento exponencial) para reconocer específicamente y fijarse fuertemente a sus dianas por medio de estructuras tridimensionales complementarias bien definidas.

Los aptámeros de RNA representan una clase singular emergente de agentes terapéuticos (Que-Gewirth *et al.*, *Gene Ther.*, 14: 283 (2007); Ireson *et al.*, *Mol. Cancer Ther.*, 5: 2957 (2006)). Se trata de oligonucleótidos de RNA monocatenarios relativamente cortos (12-30 nucleótidos) que asumen una forma tridimensional estable que se fija fuerte y específicamente a dianas proteínicas seleccionadas para provocar una respuesta biológica. En contraste con los oligonucleótidos antisentido, los aptámeros de RNA pueden direccionarse eficazmente a dianas extracelulares. Al

igual que los anticuerpos, los aptámeros poseen afinidades de fijación en el intervalo nanomolar bajo a picomolar. Además, los aptámeros son termoestables, carecen de inmunogenicidad, y poseen variabilidad interlotes mínima. Las modificaciones químicas, tales como sustituciones con amino o flúor en la posición 2' de las pirimidinas, pueden reducir la degradación por las nucleasas. La biodistribución y el aclaramiento de los aptámeros pueden alterarse también por adición química de restos tales como polietilenglicol y colesterol. Adicionalmente, SELEX hace posible la selección de bibliotecas constituidas por hasta 10^{15} ligandos para generar ligandos oligonucleotídicos de alta afinidad para dianas bioquímicas purificadas.

En otra realización, el inhibidor de la proteína PLUNC es un inhibidor basado en ácido nucleico, *v.g.*, un siRNA, oligonucleótido antisentido, ribozima, etc.

La expresión "secuencia nucleotídica antisentido" u "oligonucleótido antisentido" como se utiliza en esta memoria, se refiere a una secuencia de nucleótidos que es complementaria a una secuencia especificada de DNA o RNA. Oligonucleótidos y ácidos nucleicos antisentido que expresan la misma pueden producirse conforme a técnicas convencionales. Véase, *v.g.*, Patente U. S. No. 5,023, 243 otorgada a Tullis; Patente U. S. No. 5, 149,797 otorgada a Pederson *et al.* La secuencia de nucleótido antisentido puede ser complementaria a la secuencia nucleotídica entera que codifica el polipéptido o una porción del mismo de al menos 10, 20, 40, 50, 75, 100, 150, 200, 300, ó 500 bases contiguas y reducirá el nivel de producción de polipéptidos.

Los expertos en la técnica apreciarán que no es necesario que la secuencia nucleotídica antisentido sea totalmente complementaria a la secuencia diana, con tal que el grado de semejanza de secuencia sea suficiente para que la secuencia nucleotídica antisentido se hibride a su diana y reduzca la producción del polipéptido. Como se conoce en la técnica, se requiere generalmente mayor grado de semejanza de secuencia para secuencias nucleotídicas antisentido cortas, en tanto que se tolerará un mayor grado de bases apareadas incorrectamente en el caso de secuencias nucleotídicas antisentido más largas.

Por ejemplo, la hibridación de tales secuencias nucleotídicas puede llevarse a cabo en condiciones de severidad reducida, severidad media o incluso en condiciones severas (*v.g.*, condiciones representadas por una severidad de lavado con formamida al 35-40% con 5x solución de Denhardt, 0,5% SDS y 1x SSPE at 37°C; condiciones representadas por una severidad de lavado con formamida al 40-45% con 5x solución de Denhardt, 0,5% SDS, y 1x SSPE a 42°C; y/o condiciones representadas por una severidad de lavado con formamida al 50% con 5x solución de Denhardt, 0,5% SDS y 1x SSPE a 42°C, respectivamente) a las secuencias nucleotídicas descritas específicamente en esta memoria. Véase, *v.g.*, Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual 2ª Ed. (Cold Spring Harbor, NY, 1989).

En otras realizaciones, las secuencias nucleotídicas antisentido de la invención tienen al menos aproximadamente 70%, 80%, 90%, 95%, 97%, 98% o mayor semejanza de secuencia con el complemento de las secuencias codificantes descritas específicamente en esta memoria, y reducirán el nivel de producción de polipéptido.

La longitud de la secuencia nucleotídica antisentido (es decir, el número de nucleótidos que contiene) no es crítica con tal que la misma se fije selectivamente en la localización propuesta y reduzca la transcripción y/o traducción de la secuencia diana, y puede determinarse conforme a procedimientos rutinarios. En general, la secuencia nucleotídica antisentido tendrá una longitud de aproximadamente 8, 10 ó 12 nucleótidos hasta aproximadamente 20, 30, 50, 75 ó 100 nucleótidos, o longitud mayor.

Una secuencia nucleotídica antisentido puede construirse utilizando reacciones de síntesis química y ligación enzimática por procedimientos conocidos en la técnica. Por ejemplo, una secuencia nucleotídica antisentido puede sintetizarse químicamente utilizando nucleótidos existentes naturalmente o diversos nucleótidos modificados diseñados para aumentar la estabilidad biológica de las moléculas o para aumentar la estabilidad física del dúplex formado entre las secuencias nucleotídicas de sentido y antisentido, pudiendo utilizarse *v.g.*, derivados fosforotioato y nucleótidos sustituidos con acridina. Ejemplos de nucleótidos modificados que pueden utilizarse para generar la secuencia nucleotídica antisentido incluyen 5-fluorouracilo, 5-bromouracilo, 5-clorouracilo, 5-yodouracilo, hipoxantina, xantina, 4-acetilcitosina, 5-(carboxihidroxilmetil)-uracilo, 5-carboximetilaminometil-2-tiouridina, 5-carboximetilaminometiluracilo, dihidouracilo, beta-D-galactosilqueosina, inosina, N6-isopenteniladenina, 1-metilguanina, 1-metilinosina, 2,2-dimetilguanina, 2-metiladenina, 2-metilguanina, 3-metilcitosina, 5-metilcitosina, N6-adenina, 7-metilguanina, 5-metilaminometiluracilo, 5-metoxiaminometil-2-tiouracilo, beta-D-manosilqueosina, 5'-metoxi-carboximetiluracilo, 5-metoxiuracilo, 2-metil-N6-isopenteniladenina, ácido uracil-5-acético (v), wibutoxosina, pseudouracilo, queosina, 2-tiocitosina, 5-metil-2-tiouracilo, 2-tiouracilo, 4-tiouracilo, 5-metiluracilo, éster metílico del ácido uracil-5-oxiacético, ácido uracil-5-oxiacético (v), 5-metil-2-tiouracilo, 3-(3-amino-3-N-2-carboxipropil)-uracilo, (acp3)w, y 2,6-diaminopurina. Alternativamente, la secuencia nucleotídica antisentido puede producirse utilizando un vector de expresión en el cual se ha clonado un ácido nucleico en una orientación antisentido (es decir, el RNA transcrito a partir del ácido nucleico insertado tendrá orientación antisentido respecto a un ácido nucleico diana de interés).

Las secuencias nucleotídicas antisentido de la invención incluyen adicionalmente secuencias nucleotídicas en las cuales al menos uno, o la totalidad, de los residuos fosfato que constituyen los puentes internucleotídicos son fosfatos modificados, tales como metil-fosfonatos, metil-fosfonotioatos, fosforomorfolidatos, fosforopiperazidatos y

- fosforamidatos. Por ejemplo, uno de cada dos residuos fosfato que constituyen puentes internucleotídicos puede estar modificado como se ha descrito. En otro ejemplo no limitante, la secuencia nucleotídica antisentido es una secuencia nucleotídica en la cual uno, o la totalidad, de los nucleótidos contienen un resto alquilo inferior 2' (v.g., alquilo C₁-C₄ lineal o ramificado, saturado o insaturado, tal como metilo, etilo, etenilo, propilo, 1-propenilo, 2-propenilo, e isopropilo).
- 5 Por ejemplo, uno de cada dos nucleótidos puede estar modificado como se ha descrito. Véase también, Furdon *et al.*, *Nucleic Acids Res*, 17: 9193 (1989); Agrawal *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 1401 (1990); Baker *et al.*, *Nucleic Acids Res*, 18: 3537 (1990); Sproat *et al.*, *Nucleic Acids Res*, 17: 3373 (1989); Walder y Walder, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 5011 (1988).
- 10 Pueden emplearse también métodos de triple hélice de apareamiento de bases para inhibir las proteínas PLUNC. Se cree que el apareamiento de triple hélice opera por inhibición de la capacidad de la doble hélice para abrirse lo bastante para la fijación de polimerasas, factores de transcripción, o moléculas reguladoras. Avances terapéuticos recientes que utilizan DNA triplex han sido descritos en la bibliografía (v.g., Gee K., (1994) En: Huber *et al.*, *Molecular and Immunologic Approaches*, Futura Publishing Co., Mt. Kisco, NY).
- 15 El RNA de interferencia pequeño (si)RNA, conocido también como moléculas de interferencia de RNA (RNAi), proporciona otro enfoque para modulación de la expresión de las proteínas PLUNC. siRNA es un mecanismo de silenciamiento de genes después de la transcripción en el cual se introduce RNA bicatenario (dsRNA) correspondiente a una secuencia codificante de interés en una célula o un organismo, dando como resultado la degradación del mRNA correspondiente. El mecanismo por el cual siRNA lleva a cabo la silenciamiento de genes ha sido revisado en Sharp *et al.*, *Genes Dev*, 15: 485 (2001); y Hammond *et al.*, *Nature Rev. Gen.*, 2: 110 (2001)). El efecto del siRNA persiste durante múltiples divisiones celulares antes que se recupere la expresión génica. El siRNA es por tanto un método poderoso para producir bloqueos o "desactivaciones" direccionados al nivel del RNA. El siRNA ha dado resultados exitosos en células humanas, con inclusión de células embrionarias de riñón humano y células HeLa (véase, v.g., Elbashir *et al.*, *Nature* 411: 494 (2001)). En una realización, puede inducirse silenciamiento en células de mamífero por refuerzo de la expresión endógena de horquillas de RNA (véase Paddison *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 1443 (2002)). En otra realización, la transfección de dsRNA pequeño (21-23 nt) inhibe específicamente la expresión de ácido nucleico (revisado en Caplen, *Trends Biotechnol.*, 20: 49 (2002)).
- 20
- 25
- 30 La tecnología de siRNA utiliza métodos estándar de biología molecular. Puede producirse por métodos estándar dsRNA correspondiente a la totalidad o una parte de una secuencia codificante diana a desactivar, v.g., por transcripción simultánea de ambas cadenas de un DNA molde (correspondiente a la secuencia diana) con RNA polimerasa T7. Kits para la producción de dsRNA para uso en siRNA están disponibles comercialmente, v.g., de New England Biolabs, Inc. Métodos de transfección de dsRNA o plásmidos producidos por ingeniería genética para producir
- 35 dsRNA son rutinarios en la técnica.
- MicroRNA (miRNA), moléculas de RNA monocatenario de aproximadamente 21-23 nucleótidos de longitud, pueden utilizarse de manera análoga al siRNA para modular la expresión génica (véase la Patente U. S. No. 7,217,807).
- 40 Efectos de silenciamiento similares a los producidos por siRNA ha sido consignados en células de mamífero con transfección de un constructo híbrido mRNA-cDNA (Lin *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 281: 639 (2001)), proporcionando otra estrategia adicional para silenciamiento de una secuencia codificante de interés.
- 45 La expresión de proteínas PLUNC puede inhibirse también utilizando ribozimas. Las ribozimas son moléculas de RNA que escinden los ácidos nucleicos de una manera específica del sitio. Las ribozimas tienen dominios catalíticos específicos que poseen actividad de endonucleasa (Kim *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 8788 (1987); Gerlach *et al.*, *Nature* 328: 802 (1987); Forster y Symons, *Cell* 49: 211 (1987)). Por ejemplo, un gran número de ribozimas aceleran reacciones de transferencia de fosfoésteres con alto grado de especificidad, escindiendo a menudo solamente uno de varios fosfoésteres en un sustrato oligonucleotídico (Michel y Westhof, *J. Mol. Biol.*, 216: 585 (1990); Reinhold-Hurek y Shub, *Nature* 357: 173 (1992)). Esta especificidad se ha atribuido al requisito de que el sustrato se fija por interacciones específicas de apareamiento de bases a la secuencia guía interna ("IGS") de la ribozima antes de reacción química.
- 50
- 55 La catálisis por ribozimas ha sido observada fundamentalmente como parte de reacciones escisión/ligación específicas de la secuencia que implican ácidos nucleicos (Joyce, *Nature* 338: 217 (1989)). Por ejemplo, la Patente U. S. No. 5,354,855 consigna que ciertas ribozimas pueden actuar como endonucleasas con una especificidad de secuencia mayor que la de ribonucleasas conocidas y que se aproxima a la de las enzimas de restricción. Así, la inhibición de la expresión génica mediada por ribozimas específicas de secuencia puede ser particularmente adecuada para aplicaciones terapéuticas (Scanlon *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 10591 (1991); Sarver *et al.*, *Science* 247: 1222 (1990); Sioud *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 223: 831 (1992)).
- 60
- 65 En otra realización, el inhibidor de proteínas PLUNC es un mimético (v.g. un peptidomimético) del sitio de fijación de canal de sodio reconocido por una proteína PLUNC. El término "mimético" se refiere a un compuesto que tiene al menos 50% de al menos una actividad biológica de una proteína PLUNC (v.g., fijación de canales de sodio), v.g., al menos 60%, 70%, 80%, ó 90% de la actividad biológica. El término "mimético" como se utiliza en esta memoria tiene por objeto ser interpretado ampliamente y abarca moléculas orgánicas e inorgánicas. Compuestos orgánicos incluyen,

pero sin carácter limitante, moléculas pequeñas, polipéptidos, lípidos, carbohidratos, coenzimas, aptámeros, y moléculas de ácido nucleico (v.g., vectores de suministro de genes, oligonucleótidos antisentido, siRNA, todos ellos como se han descrito anteriormente). El mimético puede ser también un compuesto que se identifica por cualquiera de los métodos de escrutinio descritos más adelante).

5 Los compuestos peptidomiméticos se diseñan basándose en las secuencias de aminoácidos de los fragmentos funcionales del polipéptido. Los compuestos peptidomiméticos son compuestos sintéticos que tienen una conformación tridimensional (es decir, un "resto peptídico") que es sustancialmente igual a la conformación tridimensional de un péptido seleccionado. El resto peptídico proporciona al compuesto peptidomimético la capacidad de mejorar la angiogénesis de una manera cualitativamente idéntica a la del fragmento funcional del que se derivó el peptidomimético. Los compuestos peptidomiméticos pueden tener características adicionales que mejoran su utilidad terapéutica, tales como permeabilidad celular incrementada y semivida biológica prolongada.

15 Los peptidomiméticos tienen típicamente una cadena principal que es parcial o completamente no peptídica, pero con grupos laterales que son idénticos a los grupos laterales de los residuos de aminoácido que existen en el péptido en el que se basa el peptidomimético. Se conocen en la técnica varios tipos de enlaces químicos, v.g., enlaces éster, tioéster, tioamida, retroamida, carbono A reducido, dimetileno y cetometileno, que son sustitutos generalmente útiles para los enlaces peptídicos en la construcción de peptidomiméticos resistentes a las proteasas.

20 Otro aspecto de la invención se refiere a un método de aumento de la absorción de sodio a través de un canal de sodio, que comprende inhibir la fijación de una proteína PLUNC al canal de sodio, activando con ello el canal de sodio.

25 Un aspecto adicional de la invención se refiere a un método de disminución del volumen de revestimiento de fluido de una superficie mucosa epitelial, que comprende inhibir la fijación de una proteína PLUNC a un canal de sodio presente en la superficie mucosa epitelial, activando con ello el canal de sodio.

30 Un aspecto adicional de la invención se refiere a un método de aumento del nivel de un canal de sodio presente en la superficie de una célula, que comprende inhibir la fijación de una proteína PLUNC al canal de sodio presente en la superficie de la célula.

35 Otro aspecto de la invención se refiere a un método de tratamiento de un trastorno sensible a la activación de la absorción de sodio en un individuo que se encuentra en necesidad de ello, que comprende inhibir la actividad de una proteína PLUNC en el individuo. En una realización, el trastorno es un trastorno del pulmón (v.g., edema pulmonar), un trastorno gastrointestinal, un trastorno renal, o un trastorno cardiovascular.

40 Un aspecto adicional de la invención se refiere a un método de regulación del balance de sales, volumen de sangre, presión sanguínea, y/o motilidad del colon en un individuo que se encuentra en necesidad de ello, que comprende inhibir la actividad de una proteína PLUNC en el individuo.

45 Un aspecto adicional de la invención se refiere al método de mejora del sentido del gusto en un individuo, que comprende inhibir la actividad de una proteína PLUNC en el individuo

IV. Polipéptidos, Polinucleótidos, y Miméticos

45 Un tercer aspecto de la invención se refiere a productos que pueden utilizarse para realizar los métodos descritos en esta memoria. Así, un aspecto de la invención se refiere a un polipéptido constituido esencialmente por el dominio de fijación de canales de sodio de una proteína PLUNC. El dominio de fijación de canales de sodio es el fragmento mínimo de la proteína PLUNC requerido para tener sustancialmente la misma actividad de fijación al canal de sodio que la proteína PLUNC de longitud total. La expresión "sustancialmente la misma actividad de fijación" se refiere a una actividad que es al menos aproximadamente 50% de la actividad de fijación de la proteína de longitud total, v.g., al menos aproximadamente 60%, 70%, 80%, ó 90% de la actividad de fijación. En una realización, la proteína PLUNC es una proteína PLUNC humana. En otra realización, la proteína PLUNC es SPLUNC1 o SPLUNC2. En ciertas realizaciones, el fragmento comprende, está constituido esencialmente por, o consiste en la secuencia de aminoácidos que comienza inmediatamente en el terminal C del péptido señal o comienza dentro de 1, 2, 3, 4, ó 5 aminoácidos del término C del péptido señal y continúa a lo largo de aproximadamente 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, ó 30 o más aminoácidos o cualquier intervalo dentro de éstos. En una realización, el fragmento comprende, está constituido esencialmente por, o consiste en una secuencia desde aproximadamente el residuo 20 a aproximadamente el residuo 41 de SPLUNC1 humana (SEQ ID NO: 1), v.g., aproximadamente el residuo 22 a aproximadamente el residuo 39, o la secuencia correspondiente (v.g., los aproximadamente 20 aminoácidos inmediatamente después del péptido señal) de otra proteína PLUNC. En otras realizaciones, el fragmento comprende, está constituido esencialmente por o consiste en una secuencia que comienza desde el aminoácido 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, ó 30 y termina con el aminoácido 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, ó 45 de SEQ ID NO: 1. En una realización, el canal de sodio es ENaC, v.g., ENaC humano. En otra realización, el canal de sodio es uno que es similar en secuencia y/o estructura a ENaC.

65

- 5 En una realización, el fragmento funcional comprende, está constituido esencialmente por, o consiste en la secuencia de aminoácidos GGLPVPLDQTLPLNVNPA (SEQ ID NO: 11), correspondiente a los aminoácidos 22-39 de SPLUNC1 humana, o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70% de identidad de secuencia con ella, *v.g.*, al menos 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, ó 99% de identidad de secuencia con ella. En otra realización, el fragmento funcional comprende, está constituido esencialmente por, o consiste en la secuencia parcial de aminoácidos LPVPLDQT (SEQ ID NO: 14). Se ha demostrado que cada uno de estos residuos de aminoácido es importante para la actividad inhibitoria de ENaC.
- 10 En otro aspecto, la invención se refiere a una proteína PLUNC en la cual la secuencia de aminoácidos de tipo salvaje ha sido modificada (*v.g.*, con inserciones, deleciones, sustituciones, o cualquier combinación de las mismas). En ciertas realizaciones, la proteína PLUNC modificada exhibe una modulación de una o más bioactividades de la proteína PLUNC, *v.g.*, una disminución en la sensibilidad al pH. En otras realizaciones, no más de 20 aminoácidos de la secuencia de PLUNC existente naturalmente están modificados (insertados, deleccionados o sustituidos), *v.g.*, no más de 15, 10, 9, 8, 7, 6, ó 5 aminoácidos.
- 15 En ciertas realizaciones, la proteína PLUNC de la presente invención comprende una secuencia de aminoácidos modificada que reduce o elimina la desactivación de las proteínas PLUNC a pHs ácidos. En una realización, una región bisagra sensible al pH está modificada para prevenir un cambio conformacional de la proteína PLUNC a pHs ácidos. En una realización, uno o más aminoácidos en la región bisagra están sustituidos, *v.g.*, con alanina. En otra realización, la totalidad de los aminoácidos en la región bisagra están sustituidos, *v.g.*, con alanina. En realizaciones particulares, la región bisagra sensible al pH comprende, está constituida esencialmente por, o consiste en los residuos de aminoácidos K94, N103, N104, K138, Q140, N142, y D193 de SEQ ID NO: un y uno cualquiera o más de estos residuos puede estar modificado. En ciertas realizaciones, 1, 2, 3, 4, 5, 6, ó 7 de estos residuos están sustituidos con otro aminoácido, *v.g.*, alanina.
- 20 Un aspecto adicional de la invención se refiere a un polinucleótido que codifica un polipéptido constituido esencialmente por el dominio de fijación del canal de sodio de una proteína PLUNC. Otro aspecto de la invención se refiere a un polinucleótido que codifica una proteína PLUNC modificada de la invención.
- 25 Otro aspecto de la invención se refiere a un vector que comprende el polinucleótido de la invención.
- 30 Un aspecto adicional de la invención se refiere a una célula que comprende el polinucleótido y/o vector de la invención. En una realización, la célula es una célula aislada, *v.g.*, una célula primaria o línea de células cultivada. En otra realización, la célula aislada forma parte de un cultivo de células epiteliales, *v.g.*, un revestimiento epitelial natural o artificial, *v.g.*, un cultivo de células en un dispositivo (tal como una cámara Ussing) en el cual características tales como flujo iónico y/o potencial pueden medirse a través del revestimiento, un tejido aislado, o cultivo de tejido. En una realización adicional, que no forma parte de la invención aquí reivindicada, la célula puede estar presente en un animal, *v.g.*, un animal que es un modelo de enfermedad o un individuo que se encuentra en necesidad de tratamiento.
- 35 Un aspecto adicional de la invención se refiere a un compuesto que mimetiza el dominio de fijación del canal de sodio de una proteína PLUNC y se fija a un canal de sodio, *v.g.*, se fija a β -ENaC, en donde la escisión del canal de sodio por una proteasa se inhibe cuando está fijado al compuesto. En una realización, el compuesto es un peptidomimético. El término "compuesto" como se utiliza en esta memoria tiene por objeto ser interpretado ampliamente y abarca moléculas orgánicas e inorgánicas. Compuestos orgánicos incluyen, pero sin carácter limitante, moléculas pequeñas, polipéptidos, lípidos, carbohidratos, coenzimas, aptámeros, y moléculas de ácido nucleico (*v.g.*, vectores de suministro de genes, oligonucleótidos antisentido, siRNA, todos ellos como se ha descrito anteriormente). El compuesto puede ser adicionalmente un compuesto que es identificado por cualquiera de los métodos de escrutinio descritos más adelante.
- 40 Los compuestos de la presente invención pueden suministrarse opcionalmente junto con otros agentes terapéuticos. Los agentes terapéuticos adicionales pueden suministrarse conjuntamente con los compuestos de la invención. Como se utiliza en esta memoria, el término "conjuntamente" significa suficientemente próximo en el tiempo para producir un efecto combinado (es decir, conjuntamente puede ser simultáneamente, o puede tratarse de dos o más sucesos que ocurren dentro de un período de tiempo corto antes o después unos de otros).
- 45 Otro aspecto de la invención se refiere a un polipéptido constituido esencialmente por un dominio de fijación de una proteína PLUNC de un canal de sodio. Como se utiliza en esta memoria, un dominio de fijación de una proteína PLUNC de un canal de sodio es la porción mínima de la secuencia de aminoácidos del canal de sodio necesaria para fijarse a una proteína PLUNC. En una realización, el dominio de fijación de la proteína PLUNC es la porción extracelular del canal de sodio.
- 50 Un aspecto adicional de la invención se refiere a un polinucleótido que codifica un polipéptido constituido esencialmente por el dominio de fijación de la proteína PLUNC de un canal de sodio.
- 55 Otro aspecto de la invención se refiere a un vector que comprende el polinucleótido de la invención.
- 60
- 65

Un aspecto adicional de la invención se refiere a una célula que comprende el polinucleótido y/o vector de la invención. En una realización, la célula es una célula aislada, *v.g.*, una célula primaria o línea de células cultivada. En otra realización, la célula aislada forma parte de un cultivo de células epiteliales, *v.g.*, un revestimiento epitelial natural o artificial, *v.g.*, un cultivo de células en un dispositivo (tal como una cámara Ussing) en el cual pueden medirse características tales como flujo iónico y/o potencial a través del revestimiento. En una realización adicional, que no forma parte de la invención aquí reivindicada, la célula puede estar presente en un animal, *v.g.*, un animal que es un modelo de enfermedad o un individuo que se encuentra en necesidad de tratamiento.

Un aspecto adicional de la invención se refiere a un compuesto que mimetiza el dominio de fijación de la proteína PLUNC de un canal de sodio y se fija a una proteína PLUNC, en donde la fijación de la proteína PLUNC al canal de sodio se inhibe cuando está fijada al compuesto. En una realización, el compuesto es un peptidomimético.

Otro aspecto de la invención se refiere a un kit que comprende el polipéptido, polinucleótido, vector, célula, peptidomimético, o compuesto de la invención y es útil para la realización de los métodos de la invención. El kit puede comprender adicionalmente reactivos adicionales para la realización de los métodos (*v.g.*, tampones, recipientes) así como instrucciones.

V. Diagnóstico y Monitorización de Trastornos Sensibles a la Modulación de la Absorción de Sodio

La identificación de la interacción entre proteínas PLUNC y canales de sodio proporciona dianas que pueden ser utilizadas para la detección y diagnóstico de trastornos sensibles a la modulación de la absorción de sodio, no formando parte dicha utilización de la invención aquí reivindicada.

Un aspecto de la invención se refiere a métodos de detección de trastornos sensibles a la modulación de la absorción de sodio en un individuo, que comprenden obtener una muestra del individuo y determinar la expresión y/o actividad de una o más proteínas PLUNC o un fragmento de las mismas en la muestra, en donde un aumento o disminución en la expresión y/o actividad con relación al nivel de expresión y/o actividad en una muestra de control es indicativo de un trastorno sensible a la modulación de la absorción de sodio y que puede tratarse por modulación de las proteínas PLUNC. En una realización, la muestra es de un tejido enfermo tal como tejido de pulmón, riñón o intestinal. En otra realización, el tejido no es tejido enfermo.

En este aspecto, puede determinarse la expresión y/o actividad de más de una proteína PLUNC, *v.g.*, 2, 3, 4, o más proteínas. En una realización, dicha una o más proteínas se selecciona del grupo constituido por SPLUNC1 y SPLUNC2. La muestra de tejido puede obtenerse por cualquier método conocido en la técnica, tal como cirugía, biopsia, lavado, aspiración, etc. La muestra puede ser un fluido corporal, *v.g.*, sangre, suero, plasma, saliva, orina, fluido cerebroespinal, transpiración, etc. La muestra de control puede formarse a partir de una porción normal (es decir, no enferma) del mismo tejido o tipo de célula en el individuo, de un tejido o tipo de célula diferente en el individuo, de un individuo emparejado, o puede ser un estándar derivado de la media de medidas tomadas de una población de individuos.

En una realización, la determinación de la expresión y/o actividad de una o más proteínas PLUNC comprende determinar el nivel de un ácido nucleico que codifica dicha una o más proteínas. La determinación del nivel de un ácido nucleico puede realizarse por cualquier medio conocido en la técnica y como se describe en esta memoria, tal como transferencias Northern, transferencias puntuales, PCR, RT-PCR, PCR cuantitativa, análisis de secuencia, análisis de microrredes de genes, hibridación in situ, y detección de un gen informador.

En otra realización, la determinación de la expresión y/o actividad de una o más proteínas PLUNC comprende determinar el nivel de dicha una o más proteínas o un fragmento funcional de la misma. La determinación del nivel de una proteína puede realizarse por cualquier medio conocido en la técnica y como se describe en esta memoria, tal como transferencias western, inmunotransferencias, inmunoprecipitación, inmunohistoquímica, inmunofluorescencia, ensayos de inmunosorbente unido a enzima, y radioinmunoensayos.

En una realización adicional, la determinación de la expresión y/o actividad de una o más proteínas PLUNC comprende determinar la actividad de dicho uno o más polipéptidos o un fragmento funcional del mismo. La actividad puede ser cualquier actividad asociada con la proteína, incluyendo, sin limitación, la actividad de fijación de canales de sodio, inhibición de la activación de canales de sodio, y capacidad para reducir el número de canales de sodio en la superficie de una célula.

VI. Ensayos de escrutinio y modelos animales

La identificación de la fijación e interacciones reguladoras entre proteínas PLUNC y canales de sodio proporciona dianas que pueden utilizarse para el escrutinio de agentes que modulan la fijación y absorción de sodio, así como modelos para estudio del proceso de la regulación de canales de sodio y regulación de fluidos *in vitro* o en animales.

Un aspecto de la invención se refiere a métodos de identificación de un compuesto que inhibe la fijación de proteínas PLUNC a canales de sodio o mimetiza la fijación de proteínas PLUNC a canales de sodio, que comprenden determinar

la fijación de proteínas PLUNC a canales de sodio y/o la actividad de canales de sodio en presencia y ausencia de un compuesto de test, y seleccionar un compuesto que aumenta o disminuye la fijación de proteínas PLUNC a canales de sodio y/o la activación de canales de sodio con relación al nivel en ausencia del compuesto.

5 En este aspecto, el ensayo puede ser un ensayo basado en células o exento de células. En una realización, la célula puede ser una célula primaria, *v.g.*, una célula epitelial. En otra realización, la célula pertenece a una línea de células, *v.g.*, una línea de células epiteliales. La célula puede ponerse en contacto con el compuesto *in vitro* (*v.g.*, en una cápsula de cultivo) o en un animal (*v.g.*, un animal transgénico o un animal modelo). En una realización, el aumento del o disminución detectado en la fijación y/o actividad es estadísticamente significativo, *v.g.*, al menos $p < 0,05$, *v.g.*, $p < 0,01$, $0,005$, ó $0,001$. En otra realización, el aumento o disminución detectado es al menos aproximadamente 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% o más, con relación a la cantidad en ausencia del compuesto de test.

15 En un ensayo de escrutinio puede detectarse cualquier punto final deseado, *v.g.*, fijación al polipéptido, gen o RNA, modulación de la actividad del polipéptido, modulación de mecanismos regulados por sodio, y/o interferencia con la fijación por un regulador conocido de un polinucleótido o polipéptido. Métodos de detección de las actividades anteriores se conocen la técnica e incluyen los métodos descritos en esta memoria.

20 Cualquier compuesto de interés puede escrutarse conforme a la presente invención. Compuestos de test adecuados incluyen moléculas orgánicas e inorgánicas. Moléculas orgánicas adecuadas pueden incluir, pero sin carácter limitante, moléculas pequeñas (compuestos de peso molecular inferior a aproximadamente 1000 Daltons), polipéptidos (con inclusión de enzimas, anticuerpos, y fragmentos Fab'), carbohidratos, lípidos, coenzimas, y moléculas de ácido nucleico (con inclusión de DNA, RNA, y compuestos quiméricos y análogos de los mismos) y nucleótidos y análogos de nucleótidos.

25 Adicionalmente, los métodos de la invención pueden practicarse para escrutar una biblioteca de compuestos, *v.g.*, una biblioteca de moléculas pequeñas, una biblioteca combinatoria de compuestos químicos, una biblioteca de polipéptidos, una biblioteca de cDNA, una biblioteca de ácidos nucleicos antisentido, y análogas, o una colección ordenada de compuestos tales como redes de polipéptidos y ácidos nucleicos.

30 En una realización representativa, la invención proporciona métodos de escrutinio de compuestos de test para identificar un compuesto de test que se fija a una proteína PLUNC o un canal de sodio. Los compuestos que se identifican como capaces de fijarse a la proteína pueden someterse a escrutinio ulterior (*v.g.*, en cuanto a modulación de la absorción de sodio) utilizando los métodos descritos en esta memoria u otras técnicas adecuadas.

35 Se proporcionan también métodos de escrutinio de compuestos para identificar aquéllos que modulan la actividad de una proteína PLUNC o canal de sodio. El término "modular" tiene por objeto referirse a compuestos que mejoran (*v.g.*, aumentan) o inhiben (*v.g.*, reducen) la actividad de la proteína (o fragmento funcional). Por ejemplo, puede evaluarse la interacción del polipéptido o fragmento funcional con una pareja de fijación. Como otra alternativa, pueden utilizarse métodos físicos, tales como NMR, para evaluar una función biológica. La actividad de la proteína PLUNC o canal de sodio puede evaluarse por cualquier método conocido en la técnica, con inclusión de los métodos descritos en esta memoria.

45 Los compuestos que se identifican como moduladores de actividad pueden escrutarse opcionalmente luego utilizando los métodos descritos en esta memoria (*v.g.*, para fijación a la proteína la PLUNC o canal de sodio o fragmento funcional del mismo, polinucleótido o RNA, etc.). El compuesto puede interactuar directamente con el polipéptido o fragmento funcional, polinucleótido o mRNA y modular con ello su actividad. Alternativamente, el compuesto puede interactuar con cualquier otro polipéptido, ácido nucleico u otra molécula con tal que la interacción dé como resultado una modulación de la actividad del polipéptido o fragmento funcional.

50 El ensayo de escrutinio puede ser un ensayo basado en células o exento de células. Adicionalmente, la proteína PLUNC o canal de sodio (o fragmento funcional del mismo) o polinucleótido puede encontrarse libre en solución, fijada a un soporte sólido, expresada en una superficie celular, o localizada en el interior de una célula.

55 Con respecto a los ensayos de fijación exentos de células, los compuestos de test pueden sintetizarse o fijarse de otro modo a un sustrato sólido, tal como alfileres de plástico, portaobjetos de vidrio, pocillos de plástico, y análogos. Por ejemplo, los compuestos de test pueden estar inmovilizados utilizando conjugación de biotina y estreptavidina por métodos bien conocidos en la técnica. Los compuestos de test se ponen en contacto con el polipéptido o fragmento funcional del mismo y se lavan. El polipéptido combinado puede detectarse utilizando métodos estándar en la técnica (*v.g.*, por marcación radiactiva o fluorescencia del polipéptido o fragmento funcional, por métodos ELISA, y análogos).

60 Alternativamente, la diana puede inmovilizarse en un sustrato sólido y los compuestos de test ponerse en contacto con el polipéptido o fragmento funcional fijado del mismo. La identificación de aquellos compuestos de test que se fijan a y/o modulan la proteína PLUNC o canal de sodio o fragmento funcional puede realizarse con técnicas de rutina. Por ejemplo, los compuestos de test pueden inmovilizarse utilizando conjugación de biotina y estreptavidina por métodos bien conocidos en la técnica. Como otro ejemplo ilustrativo, anticuerpos reactivos con el polipéptido o fragmento

funcional pueden fijarse a los pocillos de la placa, y el polipéptido puede atraparse en los pocillos por conjugación del anticuerpo. Preparaciones de compuestos de test pueden incubarse en los pocillos de presentación del polipéptido (o fragmento funcional) y la cantidad de complejo atrapada en el pocillo puede cuantificarse.

5 En otra realización representativa, puede proporcionarse una proteína de fusión que comprende un dominio que facilita la fijación del polipéptido a una matriz. Por ejemplo, pueden adsorberse proteínas de fusión glutatión-S-transferasa sobre cuentas de glutatión-Sepharosa (Sigma Chemicals, St. Louis, MO) o placas de microtitulación derivatizadas con glutatión, que se combinan luego con lisados celulares (*v.g.*, marcados con ³⁵S) y el compuesto de test, y la mixtura se incuba en condiciones que conducen a formación de complejos (*v.g.*, en condiciones fisiológicas de sales y pH).
10 Después de la incubación, se lavan las cuentas para separar cualquier marcador no fijado, y la matriz se inmoviliza y el radiomarcador se detecta directamente, o en el sobrenadante después de la disociación de los complejos. Alternativamente, los complejos pueden disociarse de la matriz, separarse por SDS-PAGE, y el nivel de proteína PLUNC o canal de sodio o fragmento funcional del mismo encontrado en la fracción de cuentas puede cuantificarse a partir del gel utilizando técnicas estándar de electroforesis.

15 Otra técnica para escrutinio de compuestos proporciona escrutinio de compuestos de alta capacidad que tienen afinidad de fijación adecuada para el polipéptido de interés, como se describe en la Solicitud PCT publicada WO 84/03564. En este método, se sintetizan un gran número de compuestos de test diferentes pequeños sobre un sustrato sólido, tal como alfileres de plástico o cualquier otra superficie. Los compuestos de test se hacen reaccionar con la proteína PLUNC o el canal de sodio o fragmento funcional del mismo y se lavan. El polipéptido fijado se detecta luego por métodos bien conocidos en la técnica. El polipéptido purificado o un fragmento funcional puede aplicarse también en forma de capa sobre placas para uso en las técnicas de escrutinio de fármacos arriba mencionadas. Alternativamente, pueden utilizarse anticuerpos no neutralizantes para capturar el péptido inmovilizarlo sobre un soporte sólido.

20 Con respecto a los ensayos basados en células, puede utilizarse cualquier célula adecuada, con inclusión de bacterias, levaduras, células de insecto (*v.g.*, con un sistema de expresión de baculovirus), células de ave, células de mamífero, o células vegetales. En realizaciones ilustrativas, el ensayo se lleva a cabo en una línea de células que expresa naturalmente el polinucleótido o produce el polipéptido, *v.g.*, células epiteliales. Adicionalmente, en otras realizaciones, es deseable utilizar células no transformadas (*v.g.*, células primarias) dado que la transformación puede alterar la función del polipéptido.

25 El ensayo de escrutinio puede utilizarse para detectar compuestos que se fijan a o modulan la actividad de la proteína PLUNC nativa o canal de sodio (*v.g.*, polipéptido que es producido normalmente por la célula). Alternativamente, la célula puede modificarse para expresar (*v.g.*, sobreexpresar) un polipéptido recombinante o fragmento funcional del mismo. Conforme a esta realización, la célula puede transformarse transitoria o establemente con un polinucleótido que codifica la proteína PLUNC o canal de sodio o fragmento funcional, y puede transformarse establemente, por ejemplo, por integración estable en el genoma del organismo o por expresión de un episoma mantenido establemente (*v.g.*, episomas derivados del virus Epstein-Barr). En otra realización, un polinucleótido que codifica una molécula informadora puede enlazarse a un elemento regulador del polinucleótido que codifica una proteína PLUNC o canal de sodio y utilizarse para identificar compuestos que modulan la expresión del polipéptido.

30 En un ensayo basado en células, el compuesto a escrutar puede interactuar directamente con la proteína PLUNC o el canal de sodio o fragmento funcional del mismo (es decir, fijarse a él) y modular la actividad del mismo. Alternativamente, el compuesto puede ser uno que modula la actividad del polipéptido (o la actividad de un fragmento funcional) al nivel del ácido nucleico. Para ilustración, el compuesto puede modular la transcripción del gen (o transgén), modular la acumulación de mRNA (*v.g.*, por afectar a la velocidad de transcripción y/o renovación del mRNA), y/o modular la velocidad y/o cantidad de traducción del transcrito de mRNA.

35 Como un tipo adicional de ensayo de fijación basado en células, la proteína PLUNC o canal de sodio o fragmento funcional del mismo puede utilizarse como una "proteína cebo" en un ensayo de 2 híbridos o 3 híbridos (*véase, v.g.*, Patente U. S. No. 5,283,317; Zervos *et al.*, *Cell* 72: 223 (1993); Madura *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 268: 12046 (1993); Bartel *et al.*, *Biotechniques* 14: 920 (1993); Iwabuchi *et al.*, *Oncogene* 8: 1693 (1993); y la publicación PCT WO94/10300), para identificar otros polipéptidos que se fijan a o interactúan con el polipéptido de la invención o fragmento funcional del mismo.

40 El sistema de dos híbridos está basado en la naturaleza modular de la mayoría de los factores de transcripción, que consisten en dominios de fijación y activación de DNA separables. De manera resumida, el ensayo utiliza dos constructos de DNA diferentes. En un constructo, el polinucleótido que codifica la proteína PLUNC o canal de sodio o fragmento funcional del mismo se fusiona a un ácido nucleico que codifica el dominio de fijación de DNA de un factor de transcripción conocido (*v.g.*, GAL-4). En el otro constructo, una secuencia de DNA, opcionalmente de una biblioteca de secuencias de DNA, que codifica una proteína no identificada ("presa" o "muestra") se fusiona a un ácido nucleico que codifica el dominio de activación del factor de transcripción conocido. Si las proteínas "cebo" y "presa" son capaces de interactuar *in vivo*, formando un complejo, los dominios de fijación y activación del DNA del factor de transcripción se ponen en proximidad estrecha. Esta proximidad permite la transcripción de una secuencia informadora (*v.g.*, LacZ), que está enlazada operativamente a un sitio de regulación de la transcripción sensible al factor de transcripción. La

expresión del informador puede detectarse y pueden aislarse colonias de células que contienen el factor de transcripción funcional y utilizarse para obtener el ácido nucleico codificante del polipéptido que exhibía fijación a la proteína PLUNC o canal de sodio o fragmento funcional.

5 Los ensayos de escrutinio pueden realizarse también en animales *in vivo*. Así, como otro aspecto adicional, la invención proporciona un animal no humano transgénico que comprende un polinucleótido aislado que codifica una proteína PLUNC o canal de sodio o fragmento funcional del mismo, que puede producirse conforme a métodos bien conocidos en la técnica. El animal no humano transgénico puede ser de cualquier especie, con inclusión de aves y mamíferos no humanos. Conforme a este aspecto de la invención, mamíferos no humanos adecuados incluyen ratones, ratas, conejos, cobayos, cabras, ovejas, cerdos, y ganado vacuno. Aves adecuadas incluyen pollos, patos, gansos, codornices, pavos, y faisanes.

15 El polinucleótido codificante del polipéptido o fragmento funcional puede incorporarse de manera estable en células en el interior del animal transgénico (típicamente, por integración estable en el genoma o por constructos episómicos mantenidos de manera estable). No es necesario que todas las células contengan el transgén, y el animal puede ser una quimera de células modificadas y no modificadas, con tal que un número suficiente de células comprendan y expresen el polinucleótido codificante del polipéptido o fragmento funcional de tal modo que el animal sea una herramienta de escrutinio útil.

20 Métodos ilustrativos de utilización de los animales no humanos transgénicos de la invención para escrutinio *in vivo* de compuestos que modulan la regulación de sodio, y/o la actividad de una proteína PLUNC o canal de sodio comprenden administrar un compuesto de test a un animal no humano transgénico (*v.g.*, un mamífero tal como un ratón) que comprende un polinucleótido aislado que codifica una proteína PLUNC o canal de sodio o fragmento funcional del mismo incorporado de manera estable en el genoma y detectar si el compuesto de test modula la regulación de sodio y/o la actividad del polipéptido (o la actividad de un fragmento funcional). En la técnica se conoce el modo de medir estas respuestas *in vivo*.

30 Métodos de producción de animales transgénicos se conocen en la técnica. Pueden introducirse constructos de DNA o RNA en la línea germinal de un ave o mamífero para producir un animal transgénico. Por ejemplo, una o varias copias del constructo pueden incorporarse en el genoma de un embrión por técnicas transgénicas estándar.

35 En una realización ilustrativa, se produce un animal no humano transgénico por introducción de un transgén en la línea germinal del animal no humano. Los transgenes pueden introducirse en células diana embrionarias en diversas etapas del desarrollo. Se utilizan métodos diferentes dependiendo de la etapa de desarrollo de la célula diana embrionaria. La línea o líneas específicas de cualquier animal utilizado debería(n), si es posible, seleccionarse en cuanto a buen estado general de salud, buenos rendimientos del embrión, buena visibilidad pronuclear en el embrión, y buena capacidad reproductiva.

40 La introducción del transgén en el embrión puede realizarse por cualquiera de una diversidad de medios conocidos en la técnica tales como microinyección, electroporación, lipofección, o un vector viral. Por ejemplo, el transgén puede introducirse en un mamífero por microinyección del constructo en los pronúcleos del o de los huevos de mamífero fertilizados para conseguir que una o más copias del constructo se retengan en las células del o de los mamíferos en desarrollo. Después de la introducción del constructo transgénico en el huevo fertilizado, el huevo puede incubarse *in vitro* durante cantidades de tiempo variables, o reimplantarse en el hospedador sustitutivo, o ambas cosas. Un método común consiste en incubar los embriones *in vitro* durante aproximadamente 1-7 días, dependiendo de la especie, y reimplantarlos luego en el hospedador sustitutivo.

50 La progenie de los embriones manipulados transgénicamente puede ensayarse respecto a la presencia del constructo por análisis mediante transferencia Southern de un segmento de tejido. Un embrión que tenga una o más copias del constructo exógeno clonado integrada establemente en el genoma puede utilizarse para establecer una línea de animales transgénicos permanente.

55 Los animales alterados transgénicamente pueden ensayarse después de su nacimiento en cuanto a la incorporación del constructo en el genoma de la descendencia. Esto puede hacerse por hibridación de una sonda correspondiente a la secuencia de polinucleótidos que codifica el polipéptido o un segmento del mismo sobre material cromosómico de la progenie. Los descendientes encontrados que contienen al menos una copia del constructo en su genoma se desarrollan hasta la madurez.

60 Métodos de producción de aves transgénicas se conocen también en la técnica, véase, *v.g.*, la Patente U. S. No. 5,162,215.

65 En realizaciones particulares, para crear un animal modelo en el cual se ha reducido la actividad o expresión de una proteína PLUNC o canal de sodio, es deseable desactivar, reemplazar o bloquear el gen endógeno que codifica el polipéptido por recombinación homóloga con un transgén utilizando células madre embrionarias. En este contexto, debe entenderse que un transgén se refiere a ácido nucleico heterólogo que, después de inserción en o adyacente al gen da como resultado una disminución o bloqueo de la expresión del gen o cantidad o actividad del polipéptido.

Un bloqueo de un gen significa una alteración en la secuencia de un gen que da como resultado una disminución de la función del gen, preferiblemente tal que la expresión del gen o la cantidad o actividad del polipéptido es indetectable o insignificante. Bloqueos como se utilizan en esta memoria incluyen también bloqueos condicionales, donde la alteración del gen puede ocurrir después de, por ejemplo, exposición del animal a una sustancia que promueve la alteración del gen (v.g., tetraciclina o ecdisona), introducción de una enzima que promueve la recombinación en un sitio del gen (v.g., Cre en un sistema Cre-lox), u otro método para dirigir la alteración del gen post-natalmente. Animales bloqueados pueden prepararse utilizando métodos conocidos por los expertos en la técnica. Véase, por ejemplo, Hogan, *et al.* (1986) *Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.

Un constructo bloqueado es una secuencia de ácido nucleico, tal como un constructo de DNA o RNA que, cuando se introduce en una célula, da como resultado la supresión (parcial o completa) de la expresión de un polipéptido codificado por DNA endógeno en la célula. Un constructo bloqueado como se utiliza en esta memoria puede incluir un constructo que contiene un primer fragmento del extremo 5' del gen codificante de una proteína PLUNC o canal de sodio, un segundo fragmento del extremo 3' del gen y un fragmento de DNA que codifica un marcador seleccionable posicionado entre los fragmentos primero y segundo. Los expertos en la técnica deberían entender que pueden utilizarse cualesquiera fragmentos 5' y 3' adecuados de un gen con tal que la expresión del gen correspondiente esté parcial o completamente suprimida por la inserción del transgén. Marcadores seleccionables adecuados incluyen, pero sin carácter limitante, neomicina, puromicina e higromicina. Adicionalmente, el constructo puede contener un marcador, tal como toxina A de la difteria o timidina-quinasa, para aumentar la frecuencia de obtención de células direccionadas correctamente. Vectores adecuados incluyen, pero sin carácter limitante, pBLUESCRIPT, pBR322, y pGEM7.

Alternativamente, un constructo bloqueado puede contener moléculas de RNA tales como RNA antisentido, siRNA, y análogos para reducir la expresión de un gen codificante de una proteína PLUNC o canal de sodio. Típicamente, para expresión estable la molécula de RNA se pone bajo el control de un promotor. El promotor puede regularse, si deficiencias en la proteína de interés pueden conducir a un fenotipo letal, o el promotor puede dirigir la expresión constitutiva de la molécula de RNA de tal manera que el gen de interés está silenciado en todas las condiciones de crecimiento. Si bien puede no ser necesaria recombinación homóloga entre el constructo bloqueado y el gen de interés cuando se utiliza una molécula de RNA para disminuir la expresión génica, puede ser ventajoso direccionar el constructo bloqueado a una localización particular en el genoma del organismo hospedador a fin de que no se generen fenotipos no deseados por inserción aleatoria del constructo bloqueado.

El constructo bloqueado puede incorporarse subsiguientemente en un vector viral o no viral para suministro al animal hospedador, o puede introducirse en células madre embrionarias (ES). Las células ES se seleccionan típicamente teniendo en cuenta su capacidad para integrarse en y formar parte de la línea germinal de un embrión en desarrollo a fin de producir la transmisión de la línea germinal del constructo bloqueado. Así, cualquier línea de células ES que pueda hacer esto es adecuada para uso en esta memoria. Líneas de células adecuadas que pueden utilizarse incluyen, pero sin carácter limitante, la línea de células ES129J o la línea de células ESJ1. Las células se cultivan y preparan para inserción de DNA utilizando métodos bien conocidos por los profesionales expertos (v.g., véase Robertson (1987) *En: Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach*, E. J. Robertson, ed. IRL Press, Washington, D. C.; Bradley *et al.*, *Curr. Topics Develop. Biol.*, 20: 357 (1986); Hogan *et al.*, (1986) *Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.).

La inserción del constructo bloqueado en las células ES puede realizarse utilizando una diversidad de métodos bien conocidos en la técnica, que incluyen, por ejemplo, electroporación, microinyección, y tratamiento con fosfato de calcio. Para inserción de la secuencia de DNA o RNA, los ácidos nucleicos del constructo bloqueado se añaden a las células ES en condiciones apropiadas para el método inserción elegido. Si las células van a someterse a electroporación, las células ES y los ácidos nucleicos del constructo se exponen a un pulso eléctrico utilizando una máquina de electroporación (electroporador) y siguiendo las directrices del fabricante para la utilización. Después de la electroporación, las células pueden recuperarse en condiciones de incubación adecuadas. Las células se someten luego a escrutinio en cuanto a la presencia del constructo bloqueado.

Cada constructo bloqueado a introducir en la célula se linealiza primero típicamente si el constructo bloqueado se ha insertado en un vector. La linealización se realiza por digestión del constructo bloqueado con una endonucleasa de restricción adecuada seleccionada para cortar únicamente el interior de la secuencia del vector y no en el interior de la secuencia del constructo bloqueado.

El escrutinio para células que contengan el constructo bloqueado (recombinantes homólogos) puede hacerse utilizando una diversidad de métodos. Por ejemplo, como se describe en esta memoria, las células pueden procesarse en caso necesario para hacer que el DNA esté disponible en ellas para hibridación con una sonda de ácido nucleico diseñada para hibridarse únicamente a células que contengan el constructo. Por ejemplo, puede sondarse DNA celular con DNA marcado con ³²P que está localizado fuera del fragmento de direccionamiento. Esta técnica puede utilizarse para identificar aquellas células con integración apropiada del constructo bloqueado. El DNA puede extraerse de las células utilizando métodos estándar (véase, v.g., Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* 2ª Ed.

(Cold Spring Harbor, NY, 1989)). El DNA puede analizarse luego por transferencia Southern con una sonda o sondas diseñadas para hibridarse en un patrón específico al DNA genómico digerido con una o más enzimas de restricción particulares.

5 Una vez que se han identificado las células ES apropiadas, se introducen las mismas en un embrión utilizando métodos estándar. Dichas células pueden introducirse utilizando microinyección, por ejemplo. Los embriones en el estado de desarrollo apropiado para que tenga lugar la integración de la célula ES se obtienen, por ejemplo, por perfusión del útero de hembras preñadas. Por ejemplo, pueden obtenerse embriones de ratón a los 3-4 días de desarrollo e inyectarse con células ES utilizando una micropipeta. Después de la introducción de las células ES en el embrión, se introduce el embrión en el útero de un ratón hembra pseudopreñado. La etapa de la pseudopreñez se selecciona para aumentar la probabilidad de implantación con éxito. En los ratones, son apropiadas hembras pseudopreñadas de 2-3 días.

15 La transmisión de la línea germinal del constructo bloqueado puede determinarse utilizando métodos estándar. Los descendientes resultantes de la implantación de embriones que contienen las células ES arriba descritas se someten a escrutinio respecto a la presencia de la alteración deseada (*v.g.*, bloqueo de la proteína PLUNC). Esto puede hacerse, por ejemplo, por obtención de DNA de la descendencia (*v.g.*, DNA de cola) para evaluar el constructo bloqueado, utilizando métodos conocidos (*v.g.*, análisis Southern, análisis por transferencia de puntos, análisis PCR). Véase, por ejemplo, Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual 2^a Ed. (Cold Spring Harbor, NY, 1989).
20 Los descendientes identificados como quimeras pueden cruzarse unos con otros para producir animales homocigóticos bloqueados.

A menudo se utilizan ratones como modelos animales debido a que son fáciles de alojar, relativamente baratos, y fáciles de reproducir. Sin embargo, pueden producirse también otros animales bloqueados conforme a la presente invención tales como, pero sin carácter limitante, monos, ganado vacuno, ovejas, cerdos, cabras, caballos, perros, gatos, cobayos, conejos y ratas. Conforme a ello, pueden seleccionarse vectores y promotores apropiados bien conocidos en la técnica sin utilizarse para generar un animal transgénico deficiente en la expresión de una proteína PLUNC o canal de sodio.

30 En otra realización, pueden crearse modelos animales utilizando animales que no son transgénicos.

VII. Composiciones farmacéuticas

35 Como un aspecto adicional, la invención proporciona formulaciones farmacéuticas y métodos de administración de las mismas para conseguir cualquiera de los efectos terapéuticos (*v.g.*, modulación de la absorción de sodio) expuestos anteriormente. La formulación farmacéutica puede comprender cualquiera de los reactivos expuestos anteriormente en un vehículo farmacéuticamente aceptable, *v.g.*, un polinucleótido codificante de una proteína PLUNC o canal de sodio o un fragmento del mismo, una proteína PLUNC o canal de sodio o fragmento del mismo, un anticuerpo contra la proteína PLUNC, un oligonucleótido antisentido, una molécula de siRNA, una ribozima, un aptámero, un peptidomimético, una molécula pequeña, o cualquier otro compuesto que modula la actividad de una proteína PLUNC o canal de sodio, con inclusión de compuestos identificados por los métodos de escrutinio descritos en esta memoria.

45 Por "farmacéuticamente aceptable" se entiende un material que no es indeseable biológicamente o de ningún otro modo, es decir, que el material puede administrarse a un individuo sin causar ningún efecto biológico indeseable tal como toxicidad.

Las formulaciones de la invención pueden comprender opcionalmente agentes medicinales, agentes farmacéuticos, vehículos, adyuvantes, agentes dispersantes, diluyentes, y análogos.

50 Los compuestos de la invención pueden formularse para administración en un vehículo farmacéutico conforme a técnicas conocidas. Véase, *v.g.*, Remington, *The Science and Practice of Pharmacy* (9^a Ed, 1995). En la fabricación de una formulación farmacéutica conforme a la invención, el compuesto (con inclusión de las sales fisiológicamente aceptables del mismo) se mezcla típicamente con, *inter alia*, un vehículo aceptable. El vehículo puede ser un sólido o un líquido, o ambos, y preferiblemente se formula con el compuesto como una formulación de dosis unitaria, por ejemplo, una tableta, que puede contener desde 0,01 o 0,5% a 95% o 99% en peso del compuesto. En las formulaciones de la invención pueden incorporarse uno o más compuestos, que pueden prepararse por cualquiera de las técnicas de farmacia bien conocidas.

60 Un aspecto adicional de la invención es un método de tratamiento de individuos *in vivo*, que comprende administrar a un individuo una composición farmacéutica que comprende un compuesto de la invención en un vehículo farmacéuticamente aceptable, en donde la composición farmacéutica se administra en una cantidad terapéuticamente eficaz. La administración de los compuestos de la presente invención a un individuo humano o un animal que se encuentra en necesidad de ello puede hacerse por cualquier medio conocido en la técnica para administración de compuestos.

65

- Las formulaciones de la invención incluyen aquéllas que son adecuadas para administración oral, rectal, tópica, bucal (v.g., sublingual), vaginal, parenteral (v.g., subcutánea, intramuscular con inclusión de músculos esqueléticos, músculo cardiaco, músculo diafragma y músculos lisos, intradérmica, intravenosa, intraperitoneal), tópica (es decir, tanto en la piel como en superficies mucosas, con inclusión de superficies de las vías respiratorias), intranasal, transdérmica, intraarticular, intratecal, y por inhalación, administración al hígado por suministro intraportal, así como inyección directa en órganos (v.g., en el hígado, en el cerebro para suministro al sistema nervioso central, en el páncreas, o en un tumor o el tejido circundante de un tumor). La ruta más adecuada en cualquier caso dado dependerá de la naturaleza y gravedad de la afección que se esté tratando y de la naturaleza del compuesto particular que se utilice.
- 5
- 10 Para inyección, el vehículo será típicamente un líquido, tal como agua estéril exenta de pirógenos, solución salina tamponada con fosfato exenta de pirógenos, agua bacteriostática, o Cremophor EL[R] (BASF, Parsippany, N. J.). Para otros métodos de administración, el vehículo puede ser sólido o líquido.
- 15 Para administración oral, el compuesto puede administrarse en formas de dosificación sólidas, tales como cápsulas, tabletas, y polvos, o en formas de dosificación líquidas, tales como elixires, jarabes, y suspensiones. Los compuestos pueden encapsularse en cápsulas de gelatina junto con ingredientes inactivos y vehículos pulverizados, tales como glucosa, lactosa, sacarosa, manitol, almidón, celulosa o derivados de celulosa, estearato de magnesio, ácido esteárico, sacarina sódica, talco, carbonato de magnesio y análogos. Ejemplos de ingredientes inactivos adicionales que pueden añadirse para proporcionar cualidades deseables de color, sabor, estabilidad, capacidad de tamponamiento, dispersión u otras características deseables conocidas son óxidos de hierro rojo, gel de sílice, lauril-sulfato de sodio, dióxido de titanio, tinta blanca comestible y análogos. Diluyentes similares pueden utilizarse para fabricar tabletas comprimidas. Tanto las tabletas como las cápsulas pueden fabricarse como productos de liberación sostenida a fin de proporcionar liberación continua de la medicación durante un periodo de horas. Las tabletas comprimidas pueden estar recubiertas de azúcar o recubiertas de película para enmascarar cualquier sabor desagradable y proteger la tableta de la atmósfera, o provistas de recubrimiento entérico para desintegración selectiva en el tracto gastrointestinal. Las formas de dosificación líquidas para administración oral pueden contener colorantes y saborizantes a fin de aumentar la aceptación por el paciente.
- 20
- 25
- 30 Formulaciones adecuadas para administración bucal (sublingual) incluyen rótulas que comprenden el compuesto en una base saborizada, usualmente sacarosa y goma arábiga o tragacanto; y pastillas que comprenden el compuesto en una base inerte tal como gelatina y glicerina o sacarosa y goma arábiga.
- 35 Las formulaciones de la presente invención adecuadas para administración parenteral comprenden soluciones del compuesto acuosas y no acuosas para inyección, preparaciones que son preferiblemente isotónicas con la sangre del receptor considerado. Estas preparaciones pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostáticos y solutos que hacen la formulación isotónica con la sangre del receptor considerado. Suspensiones estériles acuosas y no acuosas pueden incluir agentes de suspensión y agentes espesantes. Las formulaciones pueden presentarse en envases de dosis unitaria o multidosis, por ejemplo, ampollas y viales herméticamente cerrados, y pueden guardarse en condición deshidratada por congelación (liofilizada) requiriendo únicamente la adición del vehículo líquido estéril, por ejemplo, solución salina o agua para inyección inmediatamente antes después de ser utilizadas.
- 40
- 45 Soluciones y suspensiones de inyección extemporáneas pueden prepararse a partir de polvos estériles, gránulos y tabletas de la clase descrita anteriormente. Por ejemplo, en un aspecto de la presente invención, se proporciona una composición estéril estable inyectable que comprende un compuesto de la invención, en una forma de dosis unitaria en un envase herméticamente cerrado. El compuesto o sal se proporciona en la forma de un liofilizado que es susceptible de ser reconstituido con un vehículo farmacéuticamente aceptable adecuado para formar una composición líquida adecuada para inyección del mismo a un individuo. La forma de dosificación unitaria comprende por lo general desde aproximadamente 10 mg a aproximadamente 10 g del compuesto o sal. Cuando el compuesto o sal es sustancialmente insoluble en agua, puede emplearse una cantidad suficiente de agente emulsionante que es farmacéuticamente aceptable en cantidad suficiente para emulsionar el compuesto o sal en un vehículo acuoso. Un agente emulsionante útil de este tipo es fosfatidil-colina.
- 50
- 55 Las formulaciones adecuadas para administración rectal se presentan preferiblemente como supositorios de dosis unitaria. Éstos pueden prepararse por mezcla del compuesto con uno o más vehículos sólidos convencionales, por ejemplo, manteca de cacao, seguido por conformación de la mezcla resultante.
- 60 Las formulaciones adecuadas para aplicación tópica a la piel se presentan preferiblemente en forma de un ungüento, crema, loción, pasta, gel, spray, aerosol, o aceite. Vehículos que pueden utilizarse incluyen petrolatum, lanolina, polietilenglicoles, alcoholes, intensificadores transdérmicos, y combinaciones de dos o más de los mismos.
- 65 Formulaciones adecuadas para administración transdérmica pueden presentarse como parches discretos adaptados para permanecer en contacto íntimo con la epidermis del receptor durante un periodo de tiempo prolongado. Formulaciones adecuadas para administración transdérmica pueden suministrarse también por iontoforesis (véase, por ejemplo, Tyle, *Pharm. Res.* 3: 318 (1986)) y presentan típicamente la forma de una solución acuosa del compuesto opcionalmente tamponada. Formulaciones adecuadas comprenden citrato o tampón bis/tris (pH 6) o etanol/agua y contienen desde 0,1 a 0,2M del compuesto.

El compuesto puede formularse alternativamente para administración nasal o administrarse de otro modo a los pulmones de un individuo por cualquier medio adecuado, v.g., administrarse por suspensión en aerosol de partículas respirables que comprenden el compuesto, que es inhalada por el individuo. Las partículas respirables pueden ser líquidas o sólidas. El término "aerosol" incluye cualquier fase suspendida transportada por gas, que es susceptible de ser inhalada en los bronquiolos o conductos nasales. Específicamente, el aerosol incluye una suspensión de gotitas transportada por gas, como puede producirse en un inhalador o nebulizador dosis medidas, o en un pulverizador de nebulización. El aerosol incluye también una composición de polvo seco suspendida en aire u otro gas portador, que puede ser suministrada por insuflación desde un dispositivo inhalador, por ejemplo. Véase Ganderton & Jones, *Drug Deliver y to the Respirator y Tract*, Ellis Horwood (1987); Gonda (1990) *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems* 6: 273-313; y Raeburn *et al.*, *J. Pharmacol. Toxicol. Meth*, 27: 143 (1992). Aerosoles de partículas líquidas que comprenden el compuesto pueden producirse por cualquier medio adecuado, por ejemplo, con un nebulizador de aerosoles accionado por presión o un nebulizador ultrasónico, como es conocido por los expertos en la técnica. Véase, v.g., la Patente U. S. No. 4,501,729. Aerosoles de partículas sólidas que comprenden el compuesto pueden producirse análogamente por cualquier generador de aerosoles medicamentosos particulados sólidos, por métodos conocidos en la técnica farmacéutica.

Alternativamente, es posible administrar el compuesto de una manera local en lugar de sistémica, por ejemplo, en una formulación de tipo depósito o de liberación sostenida.

Adicionalmente, la presente invención proporciona formulaciones de liposomas de los compuestos descritos en esta memoria y sales de los mismos. La tecnología para formación de suspensiones liposómicas es bien conocida en la técnica. Cuando el compuesto o su sal es una sal soluble en agua, utilizando la tecnología convencional de liposomas, el mismo puede incorporarse en vesículas lipídicas. En tal caso, debido a la solubilidad en agua del compuesto o sal, dicho compuesto o sal será arrastrado sustancialmente en el centro hidrófilo o núcleo de los liposomas. La capa de lípido empleada puede ser de cualquier composición convencional y pueden contener colesterol o puede estar exenta de colesterol. Cuando el compuesto o sal de interés es insoluble en agua, empleando de nuevo la tecnología convencional de formación de liposomas, la sal puede ser arrastrada sustancialmente en la bicapa lipídica hidrófoba que forma la estructura del liposoma. En cualquier caso, los liposomas que se producen pueden ser de tamaño reducido, mediante el uso de técnicas estándar de sonicación y homogeneización.

Las formulaciones de liposomas que contienen los compuestos descritos en esta memoria o sus sales, pueden liofilizarse para producir un liofilizado que puede reconstituirse con un vehículo farmacéuticamente aceptable, tal como agua, para regenerar una suspensión de liposomas.

En el caso de compuestos insolubles en agua, puede prepararse una composición farmacéutica que contiene el compuesto insoluble en agua, tal como, por ejemplo, en una emulsión de base acuosa. En tal caso, la composición contendrá una cantidad suficiente de agente emulsionante farmacéuticamente aceptable para emulsionar la cantidad deseada del compuesto. Agentes emulsionantes particularmente útiles incluyen fosfatidil-colinas y lecitina.

En realizaciones particulares, el compuesto se administra al individuo en una cantidad terapéuticamente eficaz, tal como se ha definido anteriormente dicho término. Las dosis de compuestos farmacéuticamente activos pueden determinarse por métodos conocidos en la técnica, véase, v.g., *Remington's Pharmaceutical Sciences* (Mac Publishing Co., Easton, Pa). La dosis terapéuticamente eficaz de cualquier compuesto específico puede variar algo de un compuesto a otro, y de paciente a paciente, y dependerá del estado del paciente y la ruta de suministro. Como proposición general, una dosis de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 50 mg/kg tendrá eficacia terapéutica, calculándose todos los pesos basados en el peso del compuesto, incluyendo los casos en que se emplea una sal. Problemas de toxicidad al nivel mayor pueden restringir las dosis intravenosas a nivel más bajo tal como a aproximadamente 10 mg/kg, calculándose todos los pesos basados en el peso del compuesto, incluyendo los casos en que se emplea una sal. Para administración oral puede emplearse una dosis de aproximadamente 10 mg/kg a aproximadamente 50 mg/kg. Para inyección intramuscular puede emplearse típicamente una dosis de aproximadamente 0,5 mg/kg a 5 mg/kg. Dosis particulares son aproximadamente 1 $\mu\text{mol/kg}$ a 50 $\mu\text{mol/kg}$, y de modo más particular hasta aproximadamente 22 $\mu\text{mol/kg}$ y hasta 33 $\mu\text{mol/kg}$ del compuesto para administración intravenosa oral, respectivamente.

En realizaciones particulares de la invención, puede emplearse más de una administración (v.g., 2, 3, 4, o más administraciones) durante una diversidad de intervalos de tiempo (v.g., cada hora, cada día, cada semana, cada mes, etc.) para alcanzar efectos terapéuticos.

La presente invención encuentra uso en aplicaciones veterinarias y médicas. Individuos adecuados incluyen tanto aves como mamíferos, siendo preferidos los mamíferos. El término "ave" como se utiliza en esta memoria incluye, pero sin carácter limitante, pollos, patos, gansos, codornices, pavos, y faisanes. El término "mamífero" como se utiliza en esta memoria incluye, pero sin carácter limitante, humanos, bovinos, ovinos, cabríos, equinos, felinos, cánidos, lagomorfos, etc. Individuos humanos incluyen recién nacidos, niños pequeños, jóvenes, y adultos.

La presente invención se describe más particularmente en los ejemplos siguientes, que se proponen únicamente como ilustrativos, dado que serán evidentes para los expertos en la técnica numerosas modificaciones y variaciones de los mismos.

5

EJEMPLO 1

Métodos Experimentales

10 **Obtención de tejidos y cultivo de células:** Las células se cosecharon por digestión enzimática a partir de tejido bronquial humano como se ha descrito anteriormente conforme a un protocolo aprobado por la UNC School of Medicine IRB (Tarran *et al.*, *J. Gen. Physiol.*, 127: 591 (2006)). Se obtuvieron un exceso de pulmones de donantes humanos y pulmones receptores escindidos en el momento de trasplante de pulmón de porciones de bronquios del tallo principal o bronquios lumbares, y las células se recogieron por digestión enzimática. Todas las preparaciones se mantuvieron en una interfaz aire-líquido en un medio epitelial bronquial modificado y se utilizaron 2-5 semanas después de la siembra en inserciones T-Clear de 12 mm (Corning Costar) revestidas con colágeno VI de placenta humana (Sigma). Se utilizó solución salina tamponada con fosfato (PBS) para el lavado de las superficies mucosas de cultivo epitelial bronquial humano. Los HBECs se mantuvieron en una interfaz aire-líquido en un medio de cultivo epitelial bronquial modificado (BEGM) con 5%CO₂ a 37°C y se utilizaron 2-5 semanas después de la siembra en inserciones T-Clear de 12 mm (Corning Costar, Corning, NY, USA) (Randell, *Methods Mol. Biol.*, 742: 285 (2011)).

20 Se cultivaron células HEK293T en medio DMEM/F12 que contenía 10% FBS, 1x penicilina/estreptomicina, 0,2 µg/mL puromicina, y 0,1 mM higromicina a 37°C/5%CO₂ en placas de plástico de 6 pocillos. Las células se transfectaron conforme a las instrucciones del fabricante utilizando Lipofectamina 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Las células se transfectaron cuando se alcanzó 90-95% de confluencia con 0,5 µg de DNA plasmídico por constructo y por pocillo y se incubaron a 37°C/5%CO₂ durante una noche. Se utilizaron líneas de células CHO que expresaban establemente ASIC1a humano, ASIC2a humano y ASIC3 de rata en las medidas electrofisiológicas de ASICs (Poirot, *J. Biol. Chem.*, 279: 38448 (2004)).

30 **Identificación de SPLUNC1:** Se recogió líquido de la superficie de las vías respiratorias por lavado de cultivos epiteliales bronquiales humanos con 100 µl de PBS at 37°C durante 15 min. El lavado se centrifugó luego durante 5 min a 4000 rpm para separar las células muertas y los sobrenadantes se incubaron durante una noche en un rotor punta con punta a 4°C con cuentas tripsina-agarosa (Sigma) ± aprotinina (Sigma). Las cuentas se eluyeron utilizando 30 µl de tampón Laemmli, se hirvieron a 95°C durante 5 min, y se separaron por electroforesis en gel de dodecilsulfato de sodio-poliacrilamida (SDS-PAGE) al 15% por procedimientos estándar de la University of North Carolina-Duke Michael Hooker Proteomics Center (proteomics.unc.edu/protocol.shtml). Las bandas visibles se escindieron y se prepararon para análisis por espectrometría de masas por MALDI-MS/MS como se ha descrito anteriormente (Loiselle *et al.*, *J. Proteome Res.*, 4: 992 (2005)).

40 **Péptidos:** Los péptidos fueron sintetizados y purificados por la UNC Microprotein Sequencing and Peptide Synthesis Facility. La secuencia del péptido G22-A39 es: GGLPVPLDQTLPLNVNPA (SEQ ID NO: 11). Se obtuvo un péptido de control de G22-A39 por alfabetización de la secuencia, y se designó ABC. La secuencia de ABC es: ADGGLLLNNPPPPQTVV (SEQ ID NO: 13). Ambos péptidos se utilizaron con un término N libre o biotinilado en caso necesario. La biotinilación no tenía efecto alguno sobre la capacidad de los G22-A39's para inhibir ENaC (n=6).

45 **Estudios de microelectrodos.** Se colocó un electrodo monocilindro sensible a la diferencia de potencial en el líquido de la superficie de las vías respiratorias por medio de un micro manipulador y se utilizó junto con un macroelectrodo en la solución serosal para medir el voltaje trans-epitelial utilizando un voltímetro (World Precision Instruments). Se añadió tripsina (2 U/ml; Sigma) mucosalmente como un polvo seco en perfluorocarbono para ensayar los cambios en la regulación de ENaC como se ha descrito anteriormente (Tarran *et al.*, *J. Gen. Physiol.*, 127: 591 (2006)). La resistencia transepitelial se midió rutinariamente utilizando el sistema EVOM (WPI) como se ha descrito anteriormente (Tarran *et al.*, *J. Gen. Physiol.*, 127: 591 (2006)).

50 **Estudios de oocitos.** Se cosecharon oocitos de *Xenopus laevis* y se inyectaron como se ha descrito (Donaldson, *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 277: 8338 (2002)). Se inyectaron oocitos sanos liberados de folículo en la etapa V-VI con 0,3 ng de cRNA de cada subunidad de ENaC. Los oocitos inyectados se guardaron en solución salina de Barth modificada (en mM: 88 NaCl, 1 KCl, 2,4 NaHCO₃, 0,3 Ca(NO₃)₂, 0,41 CaCl₂, 0, 82 MgSO₄, y 15 HEPES, ajustado a pH 7,35 con Tris). Los oocitos se estudiaron 24 horas después de la inyección utilizando la técnica de pinza de voltaje de dos electrodos como se ha descrito anteriormente (Donaldson, *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 277: 8338 (2002)). Los oocitos se inmovilizaron a un potencial de retención de -60 mV. Se determinó el cambio en la corriente de las células enteras sensibles a amilorida como un indicador de la actividad de ENaC por sustracción del valor de corriente correspondiente medido en presencia de amilorida 10 µM del medido antes de la aplicación de amilorida. En caso apropiado, los oocitos se incubaron con G22-A39 o ABC durante una hora antes del registro. En algunos experimentos se utilizó β-ENaC^{S518C} que forma ENaCs que están bloqueados en una probabilidad abierta próxima a 1,0 por exposición al reactivo Sulphydral-reactive (bromuro de [2-(trimetilamonio)etil]metanotiosulfonato (MTSET). MTSET se añadió a una concentración de 1 mM al baño de oocitos como se ha descrito previamente (Snyder, *J. Clin. Invest.*, 105: 45 (2000)).

65

Transferencia western: El líquido de la superficie de las vías respiratorias recogido como se ha descrito arriba se dispuso también en cóctel inhibidor de proteasas (Roche) para transferencia western. La concentración de proteínas se determinó utilizando el Ensayo BCA (Pierce). Para obtener SPLUNC1 a partir de los oocitos de *Xenopus*, los oocitos se lisaron en tampón Laemmli o se muestreó directamente el medio de oocitos y se puso en tampón Laemmli. Las proteínas se resolvieron utilizando SDS-PAGE y se transfirieron a una membrana de poli(fluoruro de vinilideno) (PVDF). La membrana se sondó luego utilizando anticuerpos α Splunc1 o α V5 y un anticuerpo HRP anti-ratón de burro (R&D). Las transferencias se incubaron luego con reactivos ECL (Pierce).

Ensayo de Fijación: Células epiteliales nasales JME que no expresaban ENaC se infectaron establemente con un lentivirus que contenía yfp- α ENaC o vector vacío (control). Las células JME se incubaron con concentraciones variables de SPLUNC1 marcada con Rojo Texas durante 30 min seguido por 5 lavados con PBS. Pasado este tiempo, se adquirieron las imágenes con un microscopio Nikon Ti-S invertido y se cuantificaron para obtener la fijación específica e inespecífica utilizando Image J. Los datos se ajustaron luego con una gráfica de Hill para obtener el valor K_d .

Desactivación de SPLUNC1 inducida por shRNA: La estrategia empleada por los autores de la invención consistió en seleccionar secuencias shRNA de Dharmacon que estaban direccionadas eficazmente a SPLUNC1 utilizando siRNA transitorio en una línea de células epiteliales inmortalizadas de vías respiratorias humanas (designada AALEB) (Lundberg *et al.*, *Oncogene* 21: 4577 (2002)). Se generaron luego virus que codificaban el siRNA más eficaz. Las células de las vías respiratorias del paso-1 que sobrevivían a una semana de selección se tripsinizaron luego y se extendieron en placa sobre inserciones T-clear de 12 mm y se diferenciaron en condiciones de interfaz aire-líquido. En el momento de los ensayos funcionales, se midieron los niveles de proteína SPLUNC1 en el líquido de la superficie de las vías respiratorias por transferencia western para comprobar la desactivación estable. Como control se infectó por separado un adenovirus que expresaba shRNA anti-luciferasa.

Microscopía confocal: Para marcar el líquido de la superficie de las vías respiratorias, se añadió Ringer que contenía Rojo Texas-dextrano (mg/ml; Invitrogen) a superficies mucosas de cultivos epiteliales bronquiales humanos. Se añadió mucosalmente perfluorocarbono para prevenir la evaporación del líquido de la superficie de las vías respiratorias, y el cultivo se puso en una cámara que contenía 100 μ l de Ringer sobre la platina de un microscopio confocal Leica SP5 con un objetivo de inmersión en glicerol 63x. Se escanearon 5 puntos por cultivo y se determinó una altura media del líquido de la superficie de las vías respiratorias. Para la microscopía confocal, cultivos epiteliales bronquiales humanos se bañaron serosalmente en una solución Ringer modificada que contenía (mM): 116 NaCl, 10 NaHCO₃, 5,1 KCl, 1,2 CaCl₂, 1,2 MgCl₂, 20 TES, 10 glucosa, pH 7,4). Durante todo el tiempo restante, los cultivos epiteliales bronquiales humanos se mantuvieron en un medio de cultivo BEGM modificado que contenía 24 mM NaHCO₃ gasificado con 5%CO₂. El perfluorocarbono (FC-77) se obtuvo de 3M y no tenía efecto alguno sobre la altura de ASL, como se ha indicado anteriormente.

Cultivo de las células Flp-In HEK293 y purificación de la proteína SPLUNC1: Las células Flp-In HEK293 (Invitrogen) se transfectaron con vector pcDNA5/FRT/V5-his-TOPO/hSplunc1. Los clones que expresaban SPLUNC1 se seleccionaron utilizando higromicina, se aislaron, y se analizaron respecto a expresión. Los clones que expresaban establemente SPLUNC1 se cultivaron en matraces T75 en medio DMEMH que contenía Suero Bovino Fetal al 5% y a 37°C en 5%CO₂. SPLUNC1 marcada con His se purificó a partir del medio de cultivo por diálisis del medio en el Tampón de Fijación His-Select (50 mM fosfato de sodio, pH 8, 0,300 mM cloruro de sodio, 10 mM imidazol) durante una noche a 4°C, incubando el medio dializado con Matriz de Afinidad de Níquel His-Select (Sigma) durante 4 horas a 4°C en un rotor punta con punta en presencia de inhibidores de proteasas (Roche), se aplicó a una columna, y se lavó con 40 ml de Tampón de Fijación His-Select. Se eluyó luego SPLUNC1 de la matriz de afinidad de cobalto en fracciones de 0,5 ml con 600 mM imidazol en Tampón de Fijación His-Select. La proteína SPLUNC1 purificada se intercambió luego en Ringer. El medio cultivado de las células FlpIn HEK293 que carecían de SPLUNC1 se procesó de igual manera que el medio de las células FlpIn HEK293-SPLUNC1 y se utilizó como control para los experimentos en los que se añadió SPLUNC1 purificada.

Ensayo Fluorogénico: Para determinar si SPLUNC1 inhibía la actividad de tripsina, se ensayó la escisión del sustrato fluorogénico di-terc-butil-dicarbonato-Gln-Ala-Arg-7-metoxicumarin-4-il)acetilo (BGAR-MCA) en Ringer (Peptides Int.) excitado a 350 nm y se recogió la emisión a 460 nm en un formato lector de placas de 96 pocillos (Wallac 1420 VICTOR²). Para los ensayos exentos de células, las reacciones se llevaron a cabo en 50 μ l de Ringer en un formato de placa de 96 pocillos con 100 μ MBGAR-MCA. Para medir la actividad de proteasas endógenas en cultivos epiteliales bronquiales humanos se pusieron 30 μ l de Ringer con 100 μ MBGAR-MCA directamente sobre las superficies mucosas de cultivos epiteliales bronquiales humanos que habían crecido sobre inserciones T-clear de 12 mm y los cultivos se ensayaron en placas de 12 pocillos.

Co-Imunoprecipitación: Se inyectaron oocitos de *Xenopus* con subunidades marcadas en el término N con HA o en el término C con V5 (HA-NT/V5-CT) en combinación con subunidades $\alpha\beta$ ENaC de rata de tipo salvaje (WT) sin marcar (0,3 ng de cRNA de cada una) con o sin SPLUNC1 marcada con V5 y CAP2 (1 ng cRNA de cada uno). Después de 24 horas, se lisaron 40 huevos por cada condición experimental con tampón que contenía (en mM): 20 Tris, 50 NaCl, 50 NaF, 10 β -glicerofosfato, 5 Na₄P₂O₇ pirofosfato, 1 EDTA, pH 7,5 e inhibidores de proteasas (completos, Roche), aprotinina (Sigma). Los lisados de células se prepararon por paso de los huevos 2 veces a través de una

aguja 27G1/2 y centrifugación a 3,600 rpm durante 10 min a 4°C. Los sobrenadantes se transfirieron a tubos nuevos y las muestras se centrifugaron a 14,000 rpm durante 20 min a 4°C. Se desecharon los sobrenadantes y los sedimentos se solubilizaron en (mM) 50 Tris, 100 NaCl, 0,1% Triton X-100, 0,1% NP-40, 20 NaF, 10 Na₄P₂O₇, 10 EDTA + cóctel inhibidor de proteasas (Sigma), pH 7,5. Las entradas totales se tomaron de muestras de células enteras que representaban 4% de la proteína total. Las proteínas solubilizadas se incubaron con 50 µl de proteína A y 5 µl de anticuerpo anti-HA (Covance) durante una noche mientras se volteaban en tambor a 4°C. Las muestras se lavaron 3 veces con (mM) 150 NaCl 50 Tampón Tris de pH 7,5. Se añadió tampón Laemmli y las muestras se cargaron en un gel de tris-glicina con gradiente de 15% después de incubación durante 10 min a 96°C. Las muestras se transfirieron a membranas PVDF y se llevó a cabo el análisis por transferencia western utilizando un anticuerpo monoclonal anti-V5 (Invitrogen). SPLUNC1 se fijaba a ENaC únicamente cuando se utilizaron ENaC y lisados SPLUNC1. Los lisados no inyectados y SPLUNC1 que carecían de ENaC eran ambos negativos para la co-inmunoprecipitación.

Generación de la línea de células que expresan yfp-αENaC y ensayo de fijación de SPLUNC1: Se ha demostrado anteriormente que el constructo yfp-αENaC funciona normalmente (Berdiev *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 282: 36481 (2007)) y se subclonó en un vector lentiviral (pQCXIN). Las células epiteliales basales JME expresan ENaCs funcionales (Tong *et al.*, *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.*, 287: L928 (2004)). Sin embargo, este atributo se pierde después de varios pasos. Así, células JM sometidas a pasos que ya no expresaban ENaC se infectaron establemente con un lentivirus que contenía yfp-αENaC o un vector vacío como control y la presencia o ausencia de αENaC se confirmó utilizando un anticuerpo construido en el laboratorio de los autores de la invención, que estaba dirigido contra αENaC (Fig. 8).

SPLUNC1 recombinante se marcó con Rojo Texas conforme a las instrucciones del fabricante (Pierce) marcado recientemente el día de cada experimento de fijación. Las células JME se extendieron en placas sobre inserciones de cultivo T-Clear de 12 mm (Corning Costar) y se cultivaron hasta confluencia. Los cultivos se lavaron luego 3 veces con PBS para eliminar los residuos celulares y se incubaron con concentraciones variables de Rojo Texas-SPLUNC1 durante 30 min en PBS⁺⁺ (con Ca²⁺ y Mg²⁺; volumen total 10 µl) seguido por 5 lavados con PBS. Pasado este tiempo se obtuvieron imágenes de yfp (excitación 514 nm) y fluorescencia de Rojo Texas (excitación 590 nm) bajo un objetivo de agua 60x en un microscopio invertido Nikon Ti-S equipado con una cámara Orca CCD (Hamamatsu) con ruedas de filtración cambiables (Ludl). La fluorescencia de fondo se sustrajo de todas las imágenes y la intensidad umbral media se cuantificó para obtener la fijación específica e inespecífica utilizando Image J.

PCR y secuencias iniciadoras: La PCR se llevó a cabo utilizando Amplitaq Gold Mastermix (ABI) e iniciadores específicos para SPLUNC1 a una concentración final de 200 nM. Los iniciadores utilizados fueron: directo: 5'-ctgtatggccaccgtctctat-3' (SEQ ID NO: 3) e inverso 5'-aggtggatcctctctctgctt-3' (SEQ ID NO: 4). La reacción se llevó a cabo conforme a las instrucciones del fabricante con un tiempo de extensión de 30 s para un Eppendorf MasterCycler. Se empleó agua como control negativo, y cDNA de SPLUNC1 como control positivo. Se preparó cDNA humano a partir de 200 ng de RNA utilizando Superscript II (Invitrogen), y se utilizó un µl para cada reacción. Se detectó un producto del tamaño apropiado de ~150 pb por electroforesis en gel.

Medidas electrofisiológicas de canales iónicos sensibles a los ácidos (ASICs): En estos experimentos se utilizaron líneas de células descritas anteriormente que expresaban ASIC1a humano, ASIC2a humano y ASIC3 de rata (Poirot, *J. Biol. Chem.*, 279: 38448 (2004)). Las medidas electrofisiológicas se realizaron con un amplificador parche-pinza EPC10 (HEKA Electronics, Lambrecht, Alemania) como se ha descrito anteriormente (Blanchard *et al.*, *Pflugers Arch.*, 461: 123 (2011)).

Ensayo pull-down de péptidos y transferencia western: Se transfectaron células HEK293T con subunidades ENaC humanas doblemente marcadas con epitopos HA y V5 en los términos N y C, respectivamente, en combinación con cDNA de la subunidad no marcada de tipo salvaje. Cuando se expresaron la totalidad de las 3 subunidades ENaC, se transfectaron 0,5 µg de cada subunidad por pocillo. Cuando se expresaron individualmente, se transfectaron 0,75 µg de la subunidad por pocillo. Las células transfectadas se lisaron 24 h más tarde utilizando tampón NP-40 una sola vez con inhibidor de proteasas completo exento de EDTA (Roche, Basilea, Suiza). El lisado se centrifugó a 16,300 x g durante 15 min a 4°C y se recogió el sobrenadante. La concentración de proteínas se determinó utilizando el ensayo BCA y se añadieron 500 µg de proteína más 0,25 mg de péptido y 100 µl de neutravidina a una columna rotativa que se hizo girar de un lado a otro a 4°C durante 24 h (todo ello de Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA). El flujo directo se recogió por centrifugación a 1000 x g durante 30 s. Las cuentas se lavaron luego 5 veces con tampón NP-40. La proteína fijada se eluyó por ebullición a 25°C durante 10 min en 75 µl de tampón de muestra NuPAGE 2x LDS con agente reductor de muestra 1x seguido por centrifugación a 16,300 x g durante 2 min. Las muestras se resolvieron en geles Bis-Tris 4-12% en MES y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa utilizando iBlot, con ajuste P3 durante 8 min (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). La membrana se sondó utilizando anticuerpo anti-V5 1: 1000 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) durante una noche a 4°C en gelatina de pescado al 3% en TBS-T. La transferencia se incubó luego durante una hora a la temperatura ambiente con un anticuerpo secundario IgG ECL anti-ratón de oveja y se detectó con el reactivo ECL (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) o por incubación con un anticuerpo secundario IRDye anti-ratón de cabra y se analizó por un sistema de imágenes infrarrojas Odyssey (LI-COR Biosciences, Lincoln, NE, USA).

Desglicosilación: Los ensayos pull-down de péptidos se realizaron como se ha descrito anteriormente. Las muestras se eluyeron por adición de 100 µl de citrato de sodio 0,1 M, pH 5,5, 0,1% SDS a las cuentas e incubación a 100°C durante 2 min, seguido por centrifugación a 16,300 x g durante 2 min. Las muestras se dividieron en partes iguales, y una mitad se trató con un µl de EndoH y se incubó a 37°C durante 2 min. Después de la incubación, todas las muestras se liofilizaron y se reconstituyeron luego en 30 µl de tampón de muestra LDS NuPAGE con agente reductor de muestra 1x (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Las transferencias western se completaron como se ha descrito arriba. Se añadió una concentración de 5 µg/ml de tunicamicina (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) al medio de transfección de las células, y las células se incubaron durante una noche a 37°C/5%CO₂. Al día siguiente, se siguió el protocolo para el ensayo pull-down de péptidos como se ha descrito arriba.

Medida de la altura de ASL: Para marcar ASL, se añadió PBS que contenía rodamina-dextrano de 10 kD (92-2 mg/mL; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) a superficies mucosas de HBEC como se ha descrito anteriormente (Tarran *et al.*, *Mol. Cell* 8: 149 (2001)). Una vez añadido, se añadieron péptidos con o sin 100 nM de elastasa de neutrófilos, un U/mL aprotinina, sobrenadante de neutrófilos activados (ANS) (Haynes *et al.*, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 294: H379 (2008)) o 10 µM sivelestat (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) a la superficie mucosa junto con el rodamina-dextrano. Se añadió bumetanida (100 µM) a la solución serosal.

Estudios *in vivo*: Para estudiar los efectos de los péptidos derivados de SPLUNC1 en el riñón *in vivo*, se anestesiaron ratones. Después de un periodo de aclaramiento para control basal de 45 min, se infundieron péptido de tipo S18 o amilorida por vía intravenosa durante 30 min y se registró la respuesta natriurética a lo largo de las 2-3 h subsiguientes.

Análisis estadísticos: Todos los datos se presentan como el valor medio ± SE para n experimentos. Se utilizaron cultivos de las vías respiratorias derivados de 3 o más donantes separados para cada estudio, y cada estudio de oocitos se repitió en 3 ocasiones separadas. Las diferencias entre los valores medios se ensayaron respecto a significación estadística utilizando tests t apareados o no apareados o su equivalente no paramétrico en caso apropiado al experimento. A partir de tales comparaciones, se juzgó que las diferencias que conducían a P ≤ 0,05 eran significativas. Todos los ensayos de fijación se ajustaron a la ecuación de Hill.

EJEMPLO 2

Identificación de SPLUNC1

Basándose en la capacidad de los cultivos epiteliales bronquiales humanos normales para regular la altura del líquido de la superficie de las vías respiratorias a 7 µm, que variaba paralelamente a una disminución en la actividad de ENaC sensible a la tripsina, se especuló que un inhibidor de proteasas solubles está presente en el líquido de la superficie de las vías respiratorias durante la homeostasis del volumen de líquido de las superficies de las vías respiratorias normales. Se buscaron posibles inhibidores de proteasas/ reguladores de ENaC por incubación de cuentas revestidas con tripsina con líquido de la superficie de las vías respiratorias y se realizó un análisis proteómico. Se recogió líquido de la superficie de las vías respiratorias por lavado de cultivos epiteliales bronquiales humanos con 100 µl de PBS a 37°C durante 15 min, se incubó durante una noche a 4°C con cuentas tripsina-agarosa ± aprotinina, se separó en un gel SDS-PAGE al 15% y se visualizó con un tinte de plata (Fig. 1). Se retiraron las bandas del gel para análisis por espectrometría de masas y las identidades de estas proteínas se exponen en la Tabla 2. Es digno de mención que SPLUNC1 era visible como una proteína de ~26 kD (banda 1) y como un fragmento de ~19 kD (banda 2) y su fijación a tripsina era superada por la adición del inhibidor de proteasas aprotinina (Fig. 1). El análisis por espectrometría de masas permitió a los autores identificar SPLUNC1 como una de las principales proteínas que se fijan a las cuentas de tripsina (Fig. 2A; Tabla 2). La presencia de SPLUNC1 se confirmó en el líquido de la superficie de las vías respiratorias por transferencia western (Fig. 2B).

Tabla 2

Banda No.	Nombre de la Proteína	No. de Acceso
1	SPLUNC1	AAF70860
2	SPLUNC1 AY513239	AAF70860 AAR89906
3	Precursor del Complemento C3	C3HU
4	Proteína Hipotética	Q8WVW5_HUMANA

Para estudiar mejor SPLUNC1, se transfectó establemente SPLUNC1 marcada con V5/6His en células HEK293 y se purificó la V5/6His-SPLUNC1 secretada del medio de HEK293 en una columna de níquel. Pudo detectarse SPLUNC1 recombinante (rSPLUNC1) utilizando el anticuerpo anti-V5 (Fig. 3) y una incubación breve (30 min) con tripsina dio como resultado la aparición de productos de escisión de rSPLUNC1 marcada en el terminal C con PBS V5, lo que indicaba que SPLUNC1 es un sustrato para serina-proteasas (Fig. 3). Para ensayar si SPLUNC1 era capaz de alterar el transporte de iones de las vías respiratorias, se midió luego el voltaje transepitelial en condiciones de película delgada en cultivos epiteliales bronquiales humanos ± rSPLUNC1 con el tiempo. Se había demostrado previamente

que el lavado de la superficie mucosa de cultivos epiteliales bronquiales humanos con PBS activa máximamente ENaC (Tarran *et al.*, *J. Gen. Physiol.*, 127: 591 (2006)) y separa también SPLUNC1 endógena (Fig. 3B). En estas condiciones, 20 μ l de Ringer que contenía 50 ng/ml de rSPLUNC1 reducían significativamente el voltaje transepitelial (Fig. 2C). En contraste, una fracción de medio HEK293 purificada exenta de SPLUNC1 carecía de efecto (Fig. 2C). Para confirmar que esta inhibición era debida a la regulación alterada de ENaC, se expusieron cultivos epiteliales bronquiales humanos a tripsina durante 30 min después de la exposición de rSPLUNC1 durante una hora. La tripsina carecía de efecto en los cultivos epiteliales bronquiales humanos de control, lo que sugería que ENaC se mantenía plenamente activo. Sin embargo, la exposición a tripsina mucosa aumentaba notablemente el voltaje transepitelial en el grupo expuesto a SPLUNC1, lo que sugería que ENaC había sido inhibido por rSPLUNC1 (Fig. 2C). La inhibición del voltaje transepitelial ocurría a velocidades idénticas después de la adición tanto de rSPLUNC1 como de aprotinina, y los efectos de estos compuestos no eran aditivos. Sin embargo, en ambos casos, estos efectos eran invertidos por la exposición a tripsina (Fig. 2D, 2 E). Tomados en su conjunto, estos datos sugieren (i) que ambas moléculas operaban por un mecanismo común y (ii) que este era un efecto específico de ENaC (Fig. 2D, 2 E). Adicionalmente, cuando se dejó que el líquido de la superficie de las vías respiratorias se acumulara en superficies de cultivos epiteliales bronquiales humanos durante 24 horas (es decir, los cultivos no se lavaron previamente con Ringer), el voltaje transepitelial era significativamente más bajo que en los cultivos lavados, y la adición de rSPLUNC1 carecía de efecto ulterior, lo que sugería que la acumulación espontánea de un inhibidor endógeno en el líquido de la superficie de las vías respiratorias reduce el voltaje transepitelial y que la inhibición máxima se alcanza en estado estacionario (Fig. 2 E).

Dado que SPLUNC1 se fija a tripsina (Fig. 3), se exploró la posibilidad de que SPLUNC1 se escinda proteolíticamente en el proceso. Se observaron a la vez un cambio de \sim 1 kD y un cambio de 10 kD en la movilidad de rSPLUNC1 marcada con V5 en el terminal C. La banda de \sim 16 kD corresponde probablemente a la segunda banda de SPLUNC1 detectada por espectrometría de masas (Fig. un y Tabla 2), lo que sugiere que SPLUNC1 endógena es escindida en el líquido de la superficie de las vías respiratorias.

EJEMPLO 3

SPLUNC1 Regula el Transporte de Iones

Para ensayar si los flujos pasivos se veían afectados por la exposición a SPLUNC1, se midieron los efectos de amilorida sobre el voltaje transepitelial frente a la resistencia eléctrica trans-epitelial \pm rSPLUNC1. La amilorida reducía el voltaje transepitelial un 54% ($n = 12$) y la adición de rSPLUNC1 a los mismos cultivos tratados con amilorida carecía de efecto ulterior ($n = 12$). En paralelo, tanto amilorida como rSPLUNC1 aumentaban la resistencia eléctrica transepitelial aproximadamente un 33% y, una vez más, los efectos no eran aditivos, lo que sugería que amilorida y SPLUNC1 actúan ambos sobre ENaC en la membrana apical y aumentan la resistencia de la membrana apical en los epitelios bronquiales humanos en lugar de afectar al transporte paracelular (Fig. 4).

Para investigar adicionalmente de qué modo regulaba SPLUNC1 el transporte iónico y ENaC en particular, se expresó $\alpha\beta\gamma$ ENaC en oocitos de *Xenopus laevis* y los oocitos se expusieron a rSPLUNC1 o se co-inyectó cRNA de SPLUNC1 en los oocitos con $\alpha\beta\gamma$ ENaC. Las corrientes de ENaC se redujeron aproximadamente un 70% cuando los oocitos se incubaron con rSPLUNC1 antes del registro (Fig. 5A). Debido a los mayores volúmenes requeridos para las incubaciones de oocitos, se añadió SPLUNC1 a una concentración 10 veces menor que en los cultivos epiteliales bronquiales humanos (5 ng/ml). Análogamente, la co-expresión de $\alpha\beta\gamma$ ENaC y SPLUNC1 dio también como resultado la inhibición de ENaC en aproximadamente 70% (Fig. 5A). SPLUNC1 no pudo detectarse en el medio de los oocitos inyectados con $\alpha\beta\gamma$ ENaC (Fig. 5B). En cambio, se detectaba fácilmente SPLUNC1 en el medio después de co-inyección de SPLUNC1 y cRNAs de $\alpha\beta\gamma$ ENaC (Fig. 5B). Dado que pudo detectarse SPLUNC1 en el medio de oocitos (Fig. 5), es probable que SPLUNC1 co-expresada fuera secretada por los oocitos e inhibiera ENaC externamente de una manera similar a rSPLUNC1.

Para ensayar si SPLUNC1 inhibía específicamente ENaC, se expusieron oocitos que expresaban CFTR a 5 ng/ml de rSPLUNC1 o se co-expresaron SPLUNC1 y CFTR. En ambos casos, se co-expresó CFTR con el receptor adrenérgico β_2 (β_2 AR) que puede ser estimulado con isoproterenol para aumentar cAMP y estimular CFTR (Uezono *et al.*, *Receptors Channels* 1: 233 (1993)). Después de exposición a 10 μ M isoproterenol, CFTR se activaba fuertemente, y al contrario del caso de ENaC, la exposición de rSPLUNC1 o inyección de cRNA de SPLUNC1 no tenía efecto inhibitorio alguno sobre la actividad de CFTR, lo que sugería que los efectos inhibidores de SPLUNC1 son específicos para ENaC (Fig. 5C).

EJEMPLO 4

SPLUNC1 Inhibe la Escisión de ENaC

Dado que SPLUNC1 se fijaba a las cuentas tripsina-agarosa (Fig. 1) y afectaba a la sensibilidad de ENaC a la tripsina (Fig. 2C), se ensayó a continuación si SPLUNC1 podría alterar la actividad de las serina-proteasas. A pesar de que rSPLUNC1 era capaz de inhibir ENaC aproximadamente un 70% tanto en epitelios bronquiales humanos como en oocitos (Figs. un y 2), 50 ng/ml de rSPLUNC1 tenían sólo un efecto modesto (\sim 10%) sobre la capacidad de 1,0 ó 0,3

U/ml de tripsina para escindir un sustrato fluorogénico (di-terc-butil-dicarbonato-Gln-Ala-Arg-7-metoxicumarin-4-il)acetilo; BGAR-MCA), al contrario que 2 U/ml de aprotinina que inhibían la actividad de tripsina aproximadamente un 100% (Fig. 6A). Los epitelios de las vías respiratorias expresan serina-proteasas, y la adición mucosa de solución de Ringer que contenía BGAR-MCA a cultivos epiteliales bronquiales humanos daba como resultado una escisión espontánea de BGAR-MCA con el tiempo, que era inhibida por la adición de aprotinina, confirmando que las serina-proteasas son realmente activas en la superficie mucosa de los epitelios de las vías respiratorias (Fig. 6B). rSPLUNC1 no tenía efecto significativo alguno sobre la escisión de BGAR-MCA en las superficies mucosas de los epitelios bronquiales humanos lo que sugería que SPLUNC1 no inhibe ENaC por inhibición de la actividad de serina-proteasas (Fig. 6B).

La escisión proteolítica de las subunidades α y γ es necesaria para la activación de ENaC (Mueller *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 282: 33475 (2007); Adebamiro *et al.*, *J. Gen. Physiol.*, 130: 611 (2007)), y dado que CAP2 se expresa fuertemente en los cultivos epiteliales bronquiales humanos (Tarran *et al.*, *J. Gen. Physiol.*, 127: 591 (2006)), se ensayó si SPLUNC1 podría alterar la escisión de α y γ ENaC por CAP2. Debido a la escasez relativa de rSPLUNC1 purificada, se eligió co-expresar SPLUNC1 y ENaC en lugar de utilizar rSPLUNC1 para estudios subsiguientes de oocitos, dado que SPLUNC1 es secretada en cantidades suficientes por los oocitos para inhibir ENaC (Fig. 5). Cuando se co-expresaron $\alpha\beta\gamma$ ENaC y CAP2 en oocitos, se detectaron a la vez subunidades ENaC de longitud total y fragmentos α y γ escindidos con un anticuerpo V5 (Fig. 7A, 7B). Sin embargo, en presencia de SPLUNC1, únicamente pudieron observarse subunidades α y γ ENaC de longitud total, lo que sugería que SPLUNC1 protege ENaC contra la escisión proteolítica a pesar de que SPLUNC1 no posee actividad intrínseca anti-proteasas apreciable (Fig. 7A, 7B). Dado que la sonda se realizó con un anticuerpo V5, SPLUNC, que está marcada también con V5, era visible como una banda de 26 kD. Sin embargo, SPLUNC1 pudo diferenciarse entre los fragmentos de escisión de ENaC basándose en su tamaño y posición en el gel (Fig. 7A, 7B). Para confirmar que SPLUNC1 prevenía la activación funcional de ENaC por CAPs, se co-expresaron ENaC \pm SPLUNC1 con Prostatina (CAP1) y CAP2 las cuales están presentes ambas en las vías respiratorias. Como se ha descrito anteriormente, ambas CAPs aumentaban significativamente las corrientes basales de ENaC (Vuagniaux *et al.*, *J. Gen. Physiol.*, 120: 191 (2002)). Sin embargo, la capacidad de ambas proteasas para activar ENaC era reducida significativamente por SPLUNC1 (Fig. 7C). Análogamente, la exposición a tripsina aumentaba también la actividad de ENaC, y esta estimulación era atenuada por SPLUNC1 (Fig. 7D). El mutante de ENaC $\alpha_{R205, 231K}$, β , γ_{R138K} insensible a furina era inhibido también por SPLUNC1, lo que sugería que este efecto no está mediado por convertasas tales como furina (Hughey *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 279: 18111 (2004)) (Fig. 7E).

EJEMPLO 5

SPLUNC1 se Fija a ENaC

Dado que SPLUNC1 prevenía la escisión y activación de ENaC, pero no parecía ser un inhibidor de serina-proteasas del mismo modo que aprotinina, se formuló la hipótesis de que SPLUNC1 podría fijarse específicamente a ENaC para protegerlo contra la proteólisis. Para ensayar esta hipótesis, se utilizó una línea de células de las vías respiratorias (células JME) que se habían sometido extensamente a pasos y no expresaban ENaC, las cuales se utilizaron para medir la fijación inespecífica después de infección con un lentivirus que contenía un vector vacío. Para medir la fijación específica, se infectaron luego estas células con un lentivirus que contenía α ENaC marcado con yfp, dado que se ha demostrado anteriormente que la subunidad α ENaC sola forma canales de Na^+ funcionales, aunque con una conductancia significativamente menor (Kizer *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U SA* 94: 1013 (1997); McDonald *et al.*, *Am. J. Physiol.*, 268: C1157 (1995)). La expresión estable de α ENaC se confirmó por transferencia western (Fig. 8). Para ensayar cualitativamente la relación entre la expresión de yfp- α ENaC y la fijación de SPLUNC1, se extendieron en placa células JME sobre portaobjetos de vidrio y se incubaron estas células con concentraciones variables de rSPLUNC1 marcada con rojo Texas. Como se puede ver en Fig. 9A, Rojo Texas-rSPLUNC1 e yfp- α ENaC están colocalizados claramente, mientras que la fijación de rSPLUNC1 a las células JME infectadas con el vector de lentivirus solo era reducida y más difusa (Fig. 9A). Para abordar cuantitativamente este problema, se polarizaron luego estas células sobre filtros durante 7 días. Estas células polarizadas se incubaron luego con concentraciones variables de rojo Texas rSPLUNC1 durante 30 min, seguido por 5 lavados con PBS. La isoterma de fijación subsiguiente muestra una diferencia clara entre la fijación inespecífica (transfectada con vector vacío), que no era saturada y la fijación específica (yfp- α ENaC), que era significativamente mayor y saturable (Fig. 9B). Utilizando este gráfico, se calculó que el valor K_d era 55 ng/ml (Fig. 9B). Así pues, si SPLUNC1 es realmente un sensor de volumen en las vías respiratorias, estos datos sugieren que la misma será capaz de cambiar la actividad de ENaC a lo largo de un intervalo estrecho de concentraciones.

Los oocitos de *Xenopus* son autofluorescentes, haciendo difícil este tipo de fluorescencia el ensayo de fijación. Para ensayar si SPLUNC1 podría fijarse también a subunidades ENaC en los oocitos de *Xenopus*, se co-expresaron subunidades $\alpha\beta\gamma$ ENaC marcadas con HA en el término N y marcadas con V5 en el término C (HA-NT/V5-CT) en combinación con unidades de tipo salvaje (WT) sin marcar y SPLUNC1 marcada con V5 (por ejemplo, α -HA-NT/V5-CT, β , γ -ENaC \pm SPLUNC1-V5) y se inmunoprecipitó ENaC utilizando anticuerpos monoclonales anti-HA. Se sondó luego con respecto a SPLUNC1 marcada con V5 y se encontró que SPLUNC1 se fijaba a la totalidad de las 3 subunidades ENaC (Fig. 10). Así pues, se propone que SPLUNC1, en lugar de ser un inhibidor de proteasas, protege α y γ ENaC contra la escisión por las serina-proteasas, escindiéndose quizás ella misma en el proceso.

Se ha mostrado previamente que los cultivos epiteliales bronquiales humanos absorben rápidamente el exceso de líquido de la superficie de las vías respiratorias, después de lo cual se ralentiza la absorción y se mantiene una altura del líquido de la superficie de las vías respiratorias en estado estacionario de ~7 μm (Tarran *et al.*, (*J. Biol. Chem.*, 280: 35751 (2005)). Para averiguar si se requería SPLUNC1 endógena como parte de este mecanismo homeostático, se desactivó SPLUNC1 utilizando dos secuencias diferentes de shRNA anti-SPLUNC1 incorporadas en retrovirus que se utilizaron para infectar cultivos epiteliales bronquiales humanos. Los shRNAs tenían las secuencias siguientes.

shRNA No. 1 Sentido	AUAAAGUCCUGCCUGAGUUUU (SEQ ID NO: 5)
shRNA No. 1 Anti-sentido	5' PAACUCAGGCAGGACUUUAUUU (SEQ ID NO: 6)
shRNA No. 2 Sentido	GCAGGAAGCUUGACAAAUGUU (SEQ ID NO: 7)
shRNA No. 2 Anti-sentido	5' PCAUUUGUCAAGCUUCCUGCUU (SEQ ID NO: 8)

La desactivación con éxito se confirmó por qPCR y transferencia western (Figs. 5A, B) y dado que no se detectó diferencia alguna en la desactivación entre cada secuencia, se agruparon los resultados subsiguientes. Los cultivos epiteliales bronquiales humanos infectados con un shRNA de control (anti-luciferasa), absorbían rápidamente una solución de test de 20 μl de Ringer hasta que se alcanzaba una altura del líquido de la superficie de las vías respiratorias de 7 μm , después de cuyo tiempo se ralentizaba la absorción y la altura del líquido de la superficie de las vías respiratorias se mantenía en 7 μm como se ha descrito anteriormente para los cultivos epiteliales bronquiales humanos no infectados (Fig. 11C, 11 D) (Tarran *et al.*, *J. Gen. Physiol.*, 127: 591 (2006); Tarran *et al.*, (*J. Biol. Chem.*, 280: 35751 (2005)). Esta regulación era paralela a una disminución en el voltaje transepitelial que podía restablecerse por exposición mucosa a tripsina (Fig. 11E). Es importante, que los cultivos que carecían de SPLUNC1 no lograban regular la altura del líquido de la superficie de las vías respiratorias con el tiempo y exhibían absorción de líquido de la superficie de las vías respiratorias aumentada durante la fase inicial, seguido por un fallo en el mantenimiento de la altura del líquido de la superficie de las vías respiratorias en estado estacionario a 7 μm (Fig. 11C, 11 D). Adicionalmente, el voltaje transepitelial no disminuía en los cultivos epiteliales bronquiales humanos que carecían de SPLUNC1 y se mantenía a la vez elevado e insensible a la tripsina, lo que sugería que ENaC se mantenía totalmente activado. La regulación tanto de la altura del líquido de la superficie de las vías respiratorias como del voltaje transepitelial se restablecía por la adición de 50 ng/ml de rSPLUNC1 al líquido de la superficie de las vías respiratorias (Fig. 11C-11 E), lo que sugería que SPLUNC1 actúa realmente como una molécula informadora en el líquido de la superficie de las vías respiratorias que regula la actividad de ENaC para mantener un control apropiado del volumen de líquido de la superficie de las vías respiratorias.

Los autores de la invención sugieren que SPLUNC1 se fija específicamente a un dominio extracelular de ENaC, impidiendo que el canal sea escindido y activado por las serina-proteasas. Se ha propuesto que los bucles extracelulares de ENaC juegan cierto papel en la selección del canal, y se ha consignado que las subunidades α y γ de ENaC contienen segmentos inhibidores cortos que se separan durante la escisión proteolítica para activar el canal (Carattino *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 283: 25290 (2008); Carattino *et al.*, *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, 294: F47 (2008)). Es probable que las subunidades ENaC que han sido escindidas y a por serina-proteasas extracelulares son probablemente insensibles a SPLUNC1. Sin embargo, a medida que se insertan nuevos ENaCs en la membrana plasmática, SPLUNC1 se fija a ellos, impidiendo su escisión y dando como resultado una disminución en las corrientes mediadas por ENaC. El comienzo de la inhibición (30-60 min; Figs. 2C, 2D) es comparable a las velocidades de inhibición por aprotinina en los cultivos epiteliales bronquiales humanos (Bridges *et al.*, *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.*, 281: L16 (2001); Donaldson *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 277: 8338 (2002)) y es consistente con este modelo. Si bien el modelo de escisión está aceptado generalmente, es posible también que proteínas que se fijan a los bucles extracelulares de ENaC podrían inducir cambios de conformación suficientes para modular la actividad del canal. Si bien la cinética lenta de la inhibición con SPLUNC1 es la más compatible con la hipótesis de escisión (Fig. 2), no puede excluirse sin embargo formalmente la posibilidad de que SPLUNC1 pueda fijarse a ENaC y, o bien inducir un cambio de conformación en los bucles extracelulares y/o el poro para bloquear el canal o bloquear directamente el poro del canal propiamente dicho. Adicionalmente, en este estudio no se diferenciaba entre los posibles efectos de SPLUNC1 sobre el número de canales ENaC frente a su probabilidad abierta. Dado que tanto las corrientes ENaC basales como las activadas por proteasas se redujeron en presencia de SPLUNC1, el aumento relativo de las corrientes basales a las activadas por proteasas es similar \pm SPLUNC1 (Fig. 7). Así pues, no puede excluirse la posibilidad de que SPLUNC1 reduzca el número de canales ENaC en la membrana plasmática. Si éste fuera el caso, entonces el conjunto de ENaC superficiales disponibles para ser escindidos se reduciría, lo cual podría explicar tanto la reducción en la escisión de ENaC como las corrientes activadas por proteasas en presencia de SPLUNC1.

Además de expresarse en las vías respiratorias, ENaC se expresa también en células epiteliales sensibles a aldosterona en el colon y el riñón, donde aquél juega un papel importante en el control del balance de sodio, volumen de sangre, y presión sanguínea (Kunzelmann *et al.*, *Physiol. Rev.* 82: 245 (2002); Rossier *et al.*, *Annu. Rev. Physiol.*, 64: 877 (2002)). En el colon, el flujo primario se mueve en la dirección de absorción. Sin embargo, el transporte iónico puede cambiar desde ser absorbente a ser secretor, a fin de regular el balance de sales (Charney *et al.*, *Am. J. Physiol.*, 247: G1 (1984); Gart *et al.*, *Physiol. Rev.* 77: 359 (1997)). En el riñón, ENaC es el paso limitante de la velocidad para la reabsorción de sales en el conducto colector (20) y la aldosterona induce un cambio en el peso molecular de γ ENaC

desde 85 kD a \approx 75 kD, consistente con el pinzamiento proteolítico fisiológico del bucle extracelular (Masilamani *et al.*, *J. Clin. Invest.*, 104: R19 (1999)). Como sugiere su acrónimo, se pensaba que la expresión de los miembros de la familia del clon epitelial del paladar, pulmón y nasal (PLUNC) se limitaba a unos pocos tejidos específicos (Bingle *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta* 1493: 363 (2000)). Se llevó a cabo un PCR para determinar si SPLUNC1 se expresaba también en otros tejidos que expresan ENaC. Resultó interesante que SPLUNC1 se expresaba fuertemente en el riñón y el colon, pero no se expresaba en el estómago (Fig. 2c), lo que sugería que SPLUNC1 se expresa en otros tejidos que expresan ENaC más allá de los epitelios pulmón/paladar y nasal. Así pues, la expresión de SPLUNC1 en estos tejidos podría añadir potencialmente una capa adicional de regulación para modular adicionalmente la actividad de ENaC y la absorción de sales.

La expresión de SPLUNC1 está incrementada en los pulmones con fibrosis quística, especialmente en el epitelio de la superficie de las vías respiratorias proximales y distales (Bingle *et al.*, *Respir. Res.*, 8: 79 (2007)) y esta sobreexpresión puede ser debida a la inflamación incrementada observada en los pulmones CF (Chmiel *et al.*, *Respir. Res.*, 4: 8 (2003)). Sin embargo, los pulmones con fibrosis quística están tipificados por hiperabsorción de Na^+ y deshidratación del moco (Boucher, *Pflugers Arch.*, 445: 495 (2003)), por lo que es improbable que SPLUNC1 ejerza cualquier efecto inhibitorio significativo sobre ENaC en estas condiciones. Adicionalmente, se ha demostrado con anterioridad que los cultivos epiteliales bronquiales con fibrosis quística no reducen la actividad de ENaC con el tiempo (Tarran *et al.*, *J. Gen. Physiol.*, 127: 591 (2006); Tarran *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 280: 35751 (2005)). La expresión de CFTR no es necesaria para que SPLUNC1 inhiba ENaC, como se demostró en los estudios de oocitos realizados por los autores de la invención, lo que sugiere que esta incapacidad de SPLUNC1 para regular ENaC no es una propiedad innata de las vías respiratorias de la fibrosis quística (Fig. 5A). Sin embargo, las serina-proteasas que activan ENaC están sobreexpresadas en los epitelios de las vías respiratorias de la fibrosis quística (Myerburg *et al.*, *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.*, 294: L932 (2008)), y la elastasa de los neutrófilos, que activa también ENaC, está incrementada en las vías respiratorias de la fibrosis quística (Birrer *et al.*, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 150: 207 (1994); Caldwell *et al.*, *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.*, 288: L813 (2005); Konstan *et al.*, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 150: 448 (1994)). Así pues, es posible que la sobreexpresión excesiva de las proteasas observada en las vías respiratorias de la fibrosis quística (Myerburg *et al.*, *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.*, 294: L932 (2008)) interfiera con la regulación normal de ENaC por SPLUNC1 y otros reguladores potenciales de ENaC y desplace con ello el balance de anti-proteasas y menos actividad de ENaC a un estado repleto de proteasas con más actividad de ENaC, arrollando la capacidad de SPLUNC1 para desactivar ENaC y contribuyendo al empobrecimiento del volumen de líquido de la superficie de las vías respiratorias de la fibrosis quística.

En resumen, SPLUNC1 ha sido identificada como una nueva proteína extracelular inhibitoria de ENaC que está presente en el líquido de la superficie de las vías respiratorias. En las vías respiratorias normales, SPLUNC1 se expresa fuertemente en las glándulas submucosas con expresión moderada en el epitelio superficial de las vías respiratorias proximales y con poca expresión en las vías respiratorias distales (Bingle *et al.*, *Respir. Res.*, 8: 79 (2007)). Así pues, los autores de la invención proponen que SPLUNC1 es secretada por las glándulas y el epitelio superficial donde la misma sirve como molécula informadora cuya dilución o concentración puede ajustar la actividad de ENaC para regular la hidratación de las vías respiratorias y el aclaramiento del moco. Dado que SPLUNC1 es secretada por las vías respiratorias proximales, se sugiere que esta regulación tiene lugar fundamentalmente en las vías respiratorias proximales, con poco efecto en las vías respiratorias distales.

EJEMPLO 6

SPLUNC2 Inhibe EnaC

Se expresaron SPLUNC1, SPLUNC2, o LPLUNC1 en oocitos de *Xenopus* como se describe en el Ejemplo 3. Se midió el efecto de SPLUNC1, SPLUNC2, y LPLUNC1 sobre corrientes sensibles a amilorida (Fig. 13). La corriente se presenta con relación a la corriente sensible a amilorida a partir de oocitos que expresan α , β , γ ENaC (CTRL, barra blanca, $n = 18$). Los oocitos que co-expresaban SPLUNC1 acusaban una reducción aproximada de 70% en la corriente de ENaC ($p < 0,0001$; $n = 22$). Los que co-expresaban SPLUNC2 ($n = 22$) exhibían significación límite (es decir, no significativa con ANOVA y significativa ($p = 0,045$) con un test t no apareado). Los oocitos que co-expresaban LPLUNC1 ($n = 17$) no acusaban reducción alguna significativa de la corriente ENaC en este sistema. El * denota diferencia de $p < 0,05$ comparada con los oocitos de control que expresaban α , β , γ ENaC.

EJEMPLO 7

La Reducción Inhibe la Actividad de SPLUNC1

El efecto de los agentes reductores sobre la actividad de SPLUNC1 se ensayó en cultivos epiteliales bronquiales humanos (Fig. 14). Los cultivos se prelavaron para separar SPLUNC1 endógena y se midió el PD basal (control, ctrl), se añadieron luego 50 ng/ml de SPLUNC1 recombinante o SPLUNC1 recombinante que se había reducido con DTT, y se midió de nuevo el PD sobre los mismos cultivos 45 min más tarde. El pretratamiento con DTT anulaba la actividad de SPLUNC1. El análisis por transferencia western en condiciones no desnaturizantes indicaba que SPLUNC1 reducida (es decir, tratado con DTT) migra a lo largo del gel a una velocidad diferente que SPLUNC1 no desnaturizada (Fig. 15).

EJEMPLO 8

SPLUNC1 Puede Reducir el Número de Canales ENaC

Se ensayó el efecto de SPLUNC1 sobre el número de canales ENaC en la membrana plasmática por expresión de SPLUNC1 y α ENaC en oocitos de *Xenopus*. Después de biotilación de la superficie de α ENaC, se preparó un lisado total y el lisado de 3-4 huevos se separó en un gel al 10%. Fig. 16A muestra que el ENaC de la membrana plasmática disminuye después de coexpresión con SPLUNC1 en los oocitos. La adición de MTSET a ENaC que contiene el mutante β S518C aumenta P_o de ENaC a 1,0 cuando se coexpresa en oocitos, pero la corriente global se reduce todavía por expresión de SPLUNC1, lo que sugiere que ENaC se ha internalizado (Fig. 16B).

EJEMPLO 9

Identificación del Sitio Activo de SPLUNC1

ENaC SPLUNC1 es una proteína de 256 aminoácidos que contiene una secuencia señal N-terminal que hace posible que la proteína se secrete extracelularmente. Un modelo predicho de SPLUNC1 se muestra en Fig. 17. La región N-terminal que incluye el sitio inhibidor de ENaC (resaltada en gris) no tiene estructura predicha alguna. Se prepararon mutantes de truncación C-terminal de SPLUNC1 y se examinaron respecto a la capacidad para inhibir los canales ENaC en oocitos de *Xenopus*. Las proteínas mutantes se muestran en Fig. 18A. Se indican la secuencia del péptido señal N-terminal (aminoácidos 1-19) y el sitio activo supuesto (aminoácidos 22-39). Cada mutante se ensayó en el ensayo de inhibición de la corriente de oocitos descrito en el Ejemplo 3. La actividad de los mutantes de truncación se muestra en Fig. 18B. Se observó una inhibición significativa (todas ellas $p < 0,0001$) de ENaC con las proteínas de longitud total, 60%, 30%, y 15%. Sin embargo, la delección de 89% o 98% de SPLUNC1 evitaba su inhibición de ENaC. Dado que los aminoácidos 1-19 de SPLUNC1 son una secuencia señal que hace posible la secreción de la proteína, esto deja un péptido inhibidor predicho de aproximadamente 20 aminoácidos (residuos 20-41) como el sitio activo probable para SPLUNC1. Es notable que todos los truncados se secretaban al medio extracelular, como se comprobó por transferencia western, lo que es consistente con la hipótesis de que SPLUNC1 actúa extracelularmente.

Se preparó un péptido de 18 aminoácidos que abarcaba la porción del término N de SPLUNC1, designado S18 (SEQ ID NO: 11). Cuando se puso en la solución de baño durante 1 hora, este péptido inhibía ENaC en el mismo grado que la proteína de longitud total, lo que sugería que se había identificado el sitio activo de SPLUNC1 (Fig. 18C). Es interesante observar que los aminoácidos 22-39 de SPLUNC1 comparten ~40% de homología con los fragmentos inhibidores de ENaC que son escindidos por escisión proteolítica y se sabe que inhiben ENaC (Fig. 19). Sin embargo, dado que SPLUNC1 actúa por reducción del número de canales ENaC en la membrana plasmática, mientras que las subunidades α 26 y γ 43 de ENaC actúan por reducción de la probabilidad abierta de ENaC, su mecanismo de acción parece diferir acusadamente.

SPLUNC1 puede ser co-inmunoprecipitado con α , β , o γ ENaC. Sin embargo, cuando se inmunoprecipitan α , β , o γ ENaC, las otras dos subunidades sufren también pull-down como parte de un complejo. A fin de definir mejor cuáles son las subunidades que interactúan con SPLUNC1, se expresó cada subunidad individualmente y se realizó un pull-down con S18 biotilado. Este péptido se fija exclusivamente a β ENaC sin fijación detectable alguna a α o γ ENaC (Fig. 20).

EJEMPLO 10

Caracterización de S18

Dado que ENaC está regulado por fijación de NEDD4-2 a su término C, lo cual conduce a ubiquitinación de su término N e internalización, los autores proponen que S18 causa un cambio de conformación en ENaC, conduciendo a ubiquitinación incrementada seguida por internalización (Fig. 21A). Como primer paso hacia la comprensión del mecanismo de acción de SPLUNC1, se llevó a cabo FRET sobre ENaCs marcados fluorescentemente. La FRET entre α ENaC-eGFP y β ENaC-mCherry disminuía significativamente después de una hora de exposición a S18, indicando que la fijación de S18 extracelular inducía un cambio de orientación entre los términos C de α y β ENaC, potencialmente por un mecanismo alostérico (Figs. 21A y 21B). Además, β ENaC-eGFP se internaliza después de fijación de S18 (Fig. 21C), lo cual es consistente con los datos de los autores referentes a biotilación superficial a partir de oocitos.

Se añadió S18 10 μ M a la superficie apical de CF HBECs para ensayar si este péptido era capaz de inhibir ENaC y la hiper-absorción de volumen de CF ASL. S18 bloqueaba significativamente la absorción de ASL y reducía el PD sensible a amilorida a lo largo de 24 horas (Figs. 22A y 22B), sugiriendo que este péptido inhibía ENaC. Se realizó luego una respuesta completa a la dosis para S18 midiendo la altura de ASL en CF HBECs 8 horas después de la adición de S18 (Fig. 22C). La Cl_{50} era 0,6 μ M. El inhibidor de las serina-proteasas aprotinina reduce también la hiperabsorción de CF ASL, pero no impedía que la elastasa de los neutrófilos activara ENaC (Fig. 22D). Es importante que S18 impedía también la hiperabsorción de CF ASL en presencia de elastasa de neutrófilos (Fig. 22D), y en presencia de sobrenadante de neutrófilos activados, que tiene actividad alta de elastasa y catepsina. Estos datos

sugieren que S18 es todavía funcional en presencia de proteasas y puede ser útil en la amortiguación de la hiperabsorción de Na⁺ en los pulmones con CF, que exhiben usualmente niveles mayores de actividad proteolítica.

El análisis estructural preliminar no detectaba restos estructurales conocidos en la región S18 de SPLUNC1. En concordancia con ello, no se encontró tampoco estructura alguna en el péptido S18 por diroísmo circular. Es posible que esta sea una región de SPLUNC1 intrínsecamente desordenada. Tales proteínas desordenadas intrínsecamente (IDPs), en las que la falta de orden es un parte esencial de su función, han sido descritas sólo en la última década. Las IDPs asumen frecuentemente una conformación temporal después de fijación a su proteína diana, y pueden perder esta estructura una vez terminada la fijación. Para ensayar la robustez de S18, se calentó el péptido a 67°C durante 30 min y se expusieron luego cultivos de SF al péptido calentado. Como puede verse, esta maniobra no tuvo efecto alguno sobre la capacidad de S18 para inhibir la absorción de CF ASL, incluso en presencia de elastasa de neutrófilos (Fig. 23).

De acuerdo con investigadores anteriores, se encontró que el pH de NL ASL era ~pH 7, mientras que el pH de CF ASL era ácido (Fig. 23). Dado que el regulador de conductancia transmembranal de la fibrosis quística (CFTR) no es necesario para que SPLUNC1 inhiba ENaC en los oocitos (Fig. 21B), se formuló la hipótesis de que SPLUNC1 no consigue funcionar a pH ácido en CF HBECs. Para ensayar esta hipótesis, se midió el efecto de la adición de SPLUNC1 recombinante a NL y CF HBECs que carecían de SPLUNC1 endógena a pH diferente. Para aumentar el pH de CF ASL se utilizó una solución isotónica de Ringer modificada en la cual se cambió NaCl 50 mM por POPSO 100 mM (la osmolaridad se mantuvo a 300 mOsm), un tampón biológico con un pKa de 7,8. Los CF HBECs acidifican el ASL de modo increíblemente rápido (20 µl de Ringer estándar de pH 7,4 añadidos apicalmente se encuentran a pH6 en el transcurso de una hora). Por ello, se eligió POPSO, dado que su pKa de 7, 8 ayudaba a mantener ASL a pH >7 durante 3 horas, un marco de tiempo adecuado para medir los cambios en las velocidades de absorción de ASL.

En los NL HBECs que carecían de SPLUNC1, la adición de SPLUNC1 recombinante en Ringer estándar era suficiente para restablecer la regulación de volumen de ASL (Fig. 24A). Sin embargo, la desactivación de SPLUNC1 no tenía efecto alguno en los CF HBECs (Fig. 24B).

Se añadió el POPSO-Ringer a las superficies apicales de NL y CF HBECs y se midió la altura de ASL 3 horas más tarde. En estas condiciones, POPSO no tenía efecto alguno sobre la altura de NL ASL (Fig. 24A). En cambio, la altura de CF ASL aumentaba significativamente (Fig. 24B). Es interesante que la desactivación estable de SPLUNC1 anulaba los efectos de POPSO en CF HBECs y se requería la adición tanto de POPSO como de SPLUNC1 recombinante para restablecer la homeostasis de volumen de CF ASL (Fig. 24B). Se obtuvieron resultados similares cuando se elevó el pH de CF ASL con bicarbonato y con HEPES, aunque con una duración de acción más corta.

La SPLUNC1 utilizada en Fig. 24 se purificó a partir de células BHK. Sin embargo, se purificó también SPLUNC1 a partir de *E. coli* (Fig. 25A). En cultivos apareados, medidos al mismo tiempo, S18, pero no SPLUNC1, inhibía la absorción de CF ASL (Fig. 25B). Estos datos sugieren que la SPLUNC1 purificada es funcional y sigue siendo sensible al pH. Para investigar directamente los efectos del pH de SPLUNC1 frente a S18 sobre ENaC, se expusieron oocitos de *Xenopus* a SPLUNC1 recombinante frente a S18 y se midió la corriente sensible a amilorida a pH 6 y 7,4. El cambio de pH no tenía efecto directo alguno sobre la actividad de ENaC. Sin embargo, los efectos inhibidores de SPLUNC1, pero no de S18, se anulaban a pH6 (Fig. 25C), lo que es consistente con los datos de ASL presentados en Fig. 25B.

Basándose en la sensibilidad al pH de SPLUNC1, pero no de S18 (Fig. 25B y 25C), los autores de esta invención formularon la hipótesis de que SPLUNC1 sufre un cambio de conformación, y se fija a sí misma a pH6. Para ensayar esto, se expuso SPLUNC1 a elastasa de neutrófilos a pH 6 frente a 7,4 (Fig. 26). Esta maniobra tuvo un efecto modesto sobre la actividad de la elastasa de los neutrófilos, como se midió por escisión de un sustrato fluorógeno (Fig. 26A). En contraste, SPLUNC1 era resistente a la escisión por la elastasa de los neutrófilos a pH 6 (Fig. 26B). Esto es consistente con la hipótesis de los autores de la invención de que SPLUNC1 se expone menos a pH bajo.

EJEMPLO 11

SPLUNC1 Mutante Activo en las Vías Respiratorias CF

Dado que S18 inhibe todavía ENaC a pH6, se formuló la hipótesis de que otros dominios de SPLUNC1 contribuyen a su sensibilidad al pH. El modelo de los autores predice que SPLUNC1 tiene una región bisagra sensible al pH que hace posible que el término N se pliegue a pH ácido y secuestre S18 en una bolsa de fijación (bisagra de pH representada en negro en Fig. 17). Para ensayar esta hipótesis, se produjo y se purificó una SPLUNC1 mutante en la cual todos los aminoácidos del dominio bisagra habían mutado a alaninas. Las mutaciones incluían K94A, N103A, N104A, K138A, Q140A, N142A, y D193A. Este mutante inhibía significativamente la absorción de ASL en cultivos CF, al contrario que SPLUNC1 tipo salvaje, que se ensayó conjuntamente (Fig. 27).

EJEMPLO 12

El péptido S18 no afecta a la función de los canales ASIC1a, 2a y 3

Se midieron corrientes de células enteras a partir de células CHO que expresaban establemente subunidades de canales iónicos sensibles a los ácidos (ASIC), seleccionados por voltaje a -60 mV. Las estimuciones tenían una duración de 5 s y se realizaron cada 45 s. A) En Fig. 28A se muestra un experimento típico con una célula que expresa ASIC1a. Las células se estimularon 3 veces con pH 6,6 (ASIC1a y -3) o pH4 (ASIC 2 a). Entre las estimuciones, las células se devolvieron a una solución de acondicionamiento a pH 7,4 durante 40 s para permitir la recuperación de la desactivación. La solución de acondicionamiento se cambió luego a una solución de pH 7,4 que contenía S18 10 μ M. Se realizaron 3 estimuciones en presencia de S18 10 μ M antes de la retirada del péptido por lavado. Las amplitudes de corriente de los experimentos arriba descritos se normalizaron al primer valor de control y se representaron gráficamente en función del tiempo (Fig. 28B). Se añadió S18 a T = 0 s. ASIC1a = ■, ASIC2a = ●, ASIC3 = ▲, n total = 3. Las células se incubaron durante 40 s en una solución de acondicionamiento de pH 7,1 (ASIC1a y -3) o 5,6 (ASIC2a), y se activaron luego utilizando un estímulo ácido (pH 5 para ASIC1a y -3, y pH4 para ASIC2a) (Fig. 28C). Los experimentos se realizaron con o sin S18 10 μ M en la solución de acondicionamiento. Las amplitudes de corriente medidas durante el estímulo ácido se normalizaron a la amplitud de control obtenida con una solución de acondicionamiento de pH 7,4. Barras abiertas = control, barras cerradas = S18, n total = 3-4. Las células que expresaban ASIC1a se estimularon 3 veces con un estímulo de pH 6, 6 antes de añadir 40 μ g/ml de tripsina a la solución de pH 7,4 (Fig. 28D). Se realizaron estimuciones cada 45 s. El protocolo se realizó con o sin S18 10 μ M en todas las soluciones. La corriente media se representa gráficamente en función del tiempo. Se añadió tripsina a T = 0 s. Control = o, S18 = ■, n total = 3-5. Dado que los ASICs son una subfamilia de la superfamilia de canales iónicos ENaC/Deg, estos resultados demuestran la especificidad de S18 para ENaCs.

EJEMPLO 13

S18 interacciona específicamente con la subunidad β -ENaC

Fig. 29A muestra una transferencia western típica del ensayo pull-down del péptido $\alpha\beta\gamma$ -ENaC transfectado triplemente. El ensayo pull-down se realizó con una subunidad marcada con V5 y dos subunidades sin marcar como se designan. Fig. 29B muestra una transferencia western típica del ensayo pull-down del péptido S18 de subunidades ENaC expresadas individualmente. IN = entrada, PD = elución pull-down. Fig. 29C muestra una transferencia western típica que representa el ensayo pull-down realizado con S18 o ADG. No se observó cantidad alguna de β -ENaC en la elución con el péptido ADG, confirmando que el β -ENaC observado procede de interacción específica con el S18, n = 3.

EJEMPLO 14

La interacción β -ENaC/S18 es dependiente de la glicosilación

Fig. 30A muestra una transferencia western típica del ensayo pull-down del péptido $\alpha\beta\gamma$ -ENaC con la subunidad β -ENaC marcada con V5 y subunidades α y γ -ENaC sin marcar. Se realizó el ensayo pull-down y la elución se trató con EndoH. Fig. 30B muestra una transferencia western típica del único ensayo pull-down con el péptido β -ENaC solamente con la subunidad β -ENaC marcada con V5. Se realizó el ensayo pull-down y la elución se trató con EndoH. PD = elución pull-down, PD+E = elución pull-down con tratamiento de EndoH. Fig. 30C muestra una transferencia western típica del ensayo pull-down de β -ENaC tratado sólo con tunicamicina. IN(T) = entrada de muestra tratada con tunicamicina, PD(T) = elución pull-down de la muestra tratada con tunicamicina, n = 3. Estos datos muestran que la interacción entre S18 y la subunidad β -ENaC es dependiente de la glicosilación.

EJEMPLO 15

Resultados de escaneo de alanina para S18

Se midió la altura de ASL 6 horas después de la exposición a vehículo, péptido de control, S18 o S18 con residuos específicos mutados a alanina como se reseña en Fig. 31. La línea de trazos muestra la altura de vehículo y péptido de control (es decir sin efecto alguno sobre la altura de ASL). NB, G1, G2 y A18 no estaban mutados. El recuadro rojo muestra la región de S18 que parece ser crítica para la inhibición de ENaC. * $p < 0,05$ frente al control. n total = 6.

EJEMPLO 16

S18 induce natriuresis cuando se añade sistémicamente a ratones

Se midió la producción urinaria de Na^+ en ratones inconscientes (Fig. 32). Se añadieron amilorida (38 nmol/gBW/h; ■) y S18 (250 nmol/gBW/h; ▲) durante el período de infusión, y se midió la excreción de Na^+ en la orina (U_{NaV}) a lo largo de todo el ensayo. Estos datos muestran que S18 induce natriuresis cuando se administra a los animales.

Lo que antecede es ilustrativo de la presente invención, y no debe interpretarse como limitante de la misma. La invención se define por las reivindicaciones siguientes, debiendo incluirse en ella los equivalentes de las reivindicaciones.

LISTA DE SECUENCIAS

<110> University of North Carolina at Chapel Hill
 Tarran, Robert
 Stutts, Monroe
 Donaldson, Scott

<120> REGULACIÓN DE CANALES DE SODIO POR PROTEÍNAS PLUNC

<130> 5470-527W02

<150> US 61/536,647

<151> 2011-09-20

<160> 14

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 256

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Phe Gln Thr Gly Gly Leu Ile Val Phe Tyr Gly Leu Leu Ala Gln
 1 5 10 15

Thr Met Ala Gln Phe Gly Gly Leu Pro Val Pro Leu Asp Gln Thr Leu
 20 25 30

Pro Leu Asn Val Asn Pro Ala Leu Pro Leu Ser Pro Thr Gly Leu Ala
 35 40 45

Gly Ser Leu Thr Asn Ala Leu Ser Asn Gly Leu Leu Ser Gly Gly Leu
 50 55 60

Leu Gly Ile Leu Glu Asn Leu Pro Leu Leu Asp Ile Leu Lys Pro Gly
 65 70 75 80

Gly Gly Thr Ser Gly Gly Leu Leu Gly Gly Leu Leu Gly Lys Val Thr
 85 90 95

Ser Val Ile Pro Gly Leu Asn Asn Ile Ile Asp Ile Lys Val Thr Asp
 100 105 110

Pro Gln Leu Leu Glu Leu Gly Leu Val Gln Ser Pro Asp Gly His Arg
 115 120 125

Leu Tyr Val Thr Ile Pro Leu Gly Ile Lys Leu Gln Val Asn Thr Pro
 130 135 140

Leu Val Gly Ala Ser Leu Leu Arg Leu Ala Val Lys Leu Asp Ile Thr
 145 150 155 160

ES 2 716 723 T3

Ala Glu Ile Leu Ala Val Arg Asp Lys Gln Glu Arg Ile His Leu Val
165 170 175

Leu Gly Asp Cys Thr His Ser Pro Gly Ser Leu Gln Ile Ser Leu Leu
180 185 190

Asp Gly Leu Gly Pro Leu Pro Ile Gln Gly Leu Leu Asp Ser Leu Thr
195 200 205

Gly Ile Leu Asn Lys Val Leu Pro Glu Leu Val Gln Gly Asn Val Cys
210 215 220

Pro Leu Val Asn Glu Val Leu Arg Gly Leu Asp Ile Thr Leu Val His
225 230 235 240

Asp Ile Val Asn Met Leu Ile His Gly Leu Gln Phe Val Ile Lys Val
245 250 255

<210> 2
<211> 249
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Leu Gln Leu Trp Lys Leu Val Leu Leu Cys Gly Val Leu Thr Gly
1 5 10 15

Thr Ser Glu Ser Leu Leu Asp Asn Leu Gly Asn Asp Leu Ser Asn Val
20 25 30

Val Asp Lys Leu Glu Pro Val Leu His Glu Gly Leu Glu Thr Val Asp
35 40 45

Asn Thr Leu Lys Gly Ile Leu Glu Lys Leu Lys Val Asp Leu Gly Val
50 55 60

Leu Gln Lys Ser Ser Ala Trp Gln Leu Ala Lys Gln Lys Ala Gln Glu
65 70 75 80

Ala Glu Lys Leu Leu Asn Asn Val Ile Ser Lys Leu Leu Pro Thr Asn
85 90 95

Thr Asp Ile Phe Gly Leu Lys Ile Ser Asn Ser Leu Ile Leu Asp Val
100 105 110

Lys Ala Glu Pro Ile Asp Asp Gly Lys Gly Leu Asn Leu Ser Phe Pro
115 120 125

ES 2 716 723 T3

Val Thr Ala Asn Val Thr Val Ala Gly Pro Ile Ile Gly Gln Ile Ile
 130 135 140

Asn Leu Lys Ala Ser Leu Asp Leu Leu Thr Ala Val Thr Ile Glu Thr
 145 150 155 160

Asp Pro Gln Thr His Gln Pro Val Ala Val Leu Gly Glu Cys Ala Ser
 165 170 175

Asp Pro Thr Ser Ile Ser Leu Ser Leu Leu Asp Lys His Ser Gln Ile
 180 185 190

Ile Asn Lys Phe Val Asn Ser Val Ile Asn Thr Leu Lys Ser Thr Val
 195 200 205

Ser Ser Leu Leu Gln Lys Glu Ile Cys Pro Leu Ile Arg Ile Phe Ile
 210 215 220

His Ser Leu Asp Val Asn Val Ile Gln Gln Val Val Asp Asn Pro Gln
 225 230 235 240

His Lys Thr Gln Leu Gln Thr Leu Ile
 245

<210> 3
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Iniciador PCR

<400> 3
 ctgatggcca ccgtcctat

19

<210> 4
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Iniciador PCR

<400> 4
 aggtggatcc tctcctgctt

20

<210> 5
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial

```

<220>
<223> Secuencia de shRNA anti-SPLUNC1

<400> 5
a metaaaguuccu gccugaguuu u 21

<210> 6
<211> 21
<212> RNA
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia de shRNA anti-SPLUNC1

<400> 6
aacucaggca ggacuuuuuu u 21

<210> 7
<211> 21
<212> RNA
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia de shRNA anti-SPLUNC1

<400> 7
gcaggaagcu ugacaaaugu u 21

<210> 8
<211> 21
<212> RNA
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia de shRNA anti-SPLUNC1

<400> 8
cauuuguc aa gcuuccugcu u 21

<210> 9
<211> 19
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CARACTERÍSTICA MIXTA
<222> (1)..(19)
<223> Aminoácidos 4-22 de la subunidad alfa 26 de ENaC

<400> 9

Gly Ala Leu Pro His Pro Leu Gln Arg Leu Arg Thr Pro Pro Pro Pro
1 5 10 15

Asn Pro Ala

```

ES 2 716 723 T3

<210> 10
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CARACTERÍSTICA MIXTA
 <222> (1)..(14)
 <223> Aminoácidos 11-24 de la subunidad gamma 43 de ENaC

<400> 10

Gly Thr Pro Pro Arg Phe Leu Asn Leu Ile Pro Leu Leu Val
 1 5 10

<210> 11
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 11

Gly Gly Leu Pro Val Pro Leu Asp Gln Thr Leu Pro Leu Asn Val Asn
 1 5 10 15

Pro Ala

<210> 12
 <211> 72
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 12

Gly Gly Leu Pro Val Pro Leu Asp Gln Thr Leu Pro Leu Asn Val Asn
 1 5 10 15

Pro Ala Leu Pro Leu Ser Pro Thr Gly Leu Ala Gly Ser Leu Thr Asn
 20 25 30

Ala Leu Ser Asn Gly Leu Leu Ser Gly Gly Leu Leu Gly Ile Leu Glu
 35 40 45

Asn Leu Pro Leu Leu Asp Ile Leu Lys Pro Gly Gly Gly Thr Ser Gly
 50 55 60

Gly Leu Leu Gly Gly Leu Leu Gly
 65 70

<210> 13
 <211> 18
 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia de control del péptido

<400> 13

Ala Asp Gly Gly Leu Leu Leu Leu Asn Asn Pro Pro Pro Pro Gln Thr
1 5 10 15

Val Val

<210> 14

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 14

Leu Pro Val Pro Leu Asp Gln Thr
1 5

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un polipéptido constituido por la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14 y opcionalmente un total de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, o 9 aminoácidos adicionales, en donde el polipéptido se fija a un canal de sodio.
2. El polipéptido de la reivindicación 1, en donde el polipéptido que está constituido por la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14.
- 10 3. Un polinucleótido que codifica el polipéptido de un cualquiera de las reivindicaciones 1-2.
4. Un vector que comprende el polinucleótido de la reivindicación 3.
- 15 5. Una célula que comprende el polinucleótido de la reivindicación 3 o el vector de la reivindicación 4.
6. Un kit que comprende el polipéptido, polinucleótido, vector, o célula de un cualquiera de las reivindicaciones 1-5.
- 20 7. Un método *in vitro* de inhibición de la activación de un canal de sodio o inhibición de la absorción de sodio por un canal de sodio, que comprende poner en contacto un canal de sodio con el polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1-2.
8. El método de la reivindicación 7, en donde el canal de sodio está presente en una célula aislada.
- 25 9. El método de la reivindicación 7, en donde la puesta en contacto del canal de sodio con un polipéptido comprende suministrar el polipéptido a una célula que comprende el canal de sodio.
10. El método de la reivindicación 7, en donde la puesta en contacto el canal de sodio con un polipéptido comprende suministrar un polinucleótido que codifica el polipéptido a una célula que comprende el canal de sodio.
- 30 11. El polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1-2 para uso en un método de tratamiento de un trastorno sensible a la inhibición de la absorción de sodio a través de una superficie mucosa epitelial en un individuo que se encuentra en necesidad de ello, que comprende suministrar al individuo una cantidad terapéuticamente eficaz del polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1-2.
- 35 12. El polipéptido para uso en un método conforme a la reivindicación 11, en donde dicho trastorno es un trastorno pulmonar, trastorno gastrointestinal, o trastorno renal.
- 40 13. El polipéptido para uso en un método conforme a la reivindicación 12, en donde dicho trastorno pulmonar es fibrosis quística, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, bronquitis aguda o crónica, o asma.
14. Una composición farmacéutica que comprende el polipéptido, polinucleótido, vector, o célula de una cualquiera de reivindicaciones 1-6 y un vehículo.

FIG. 1

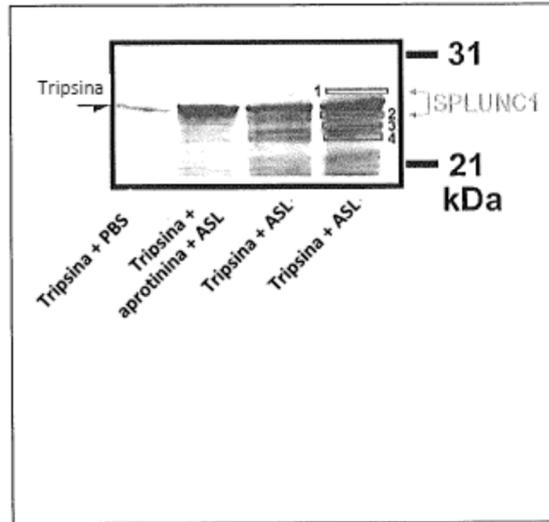


FIG. 3

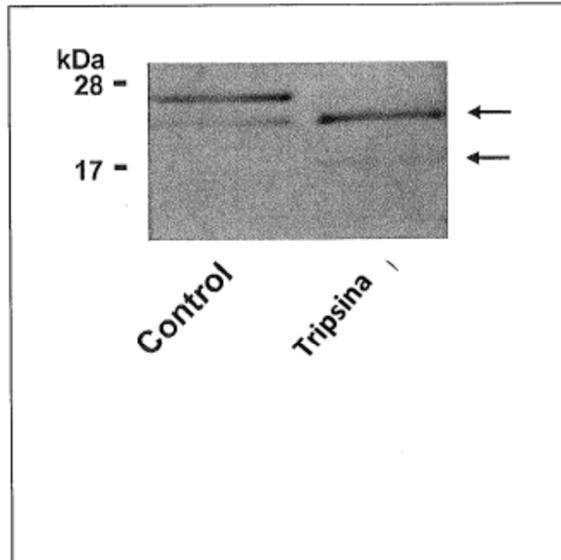


FIG. 2

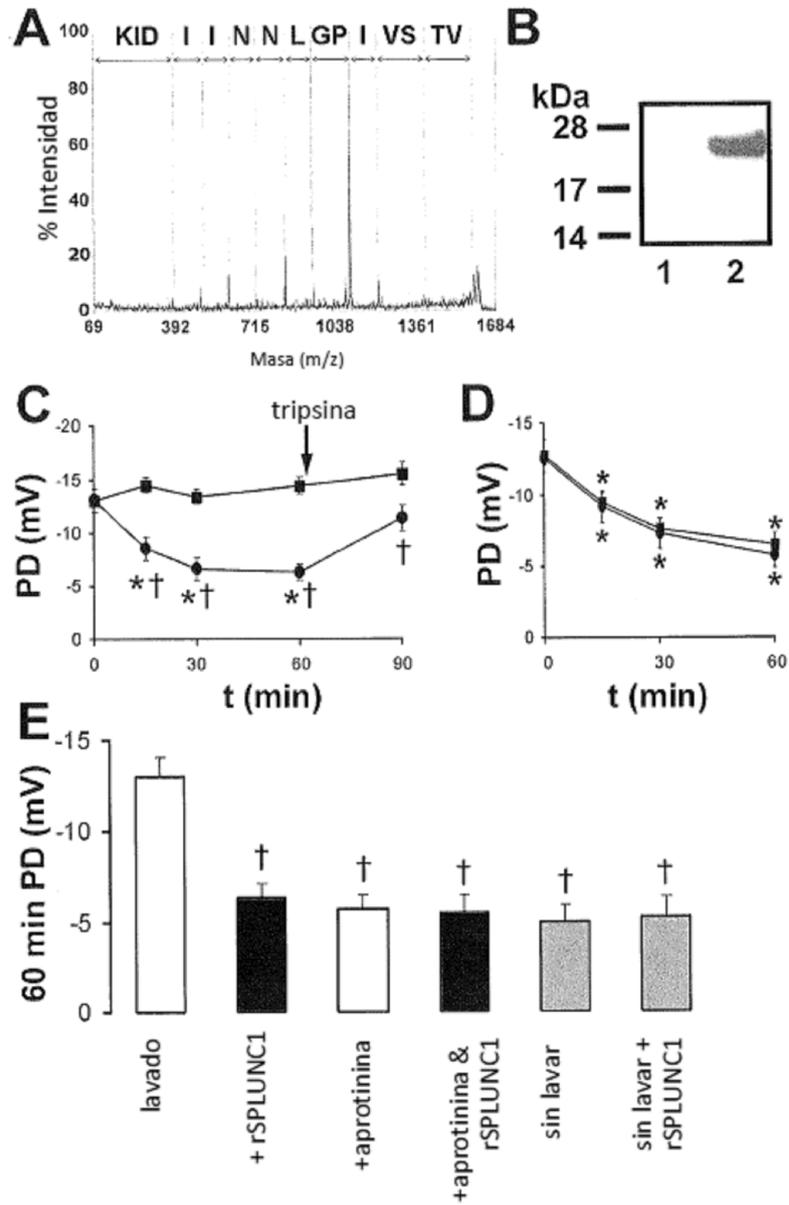


FIG. 4

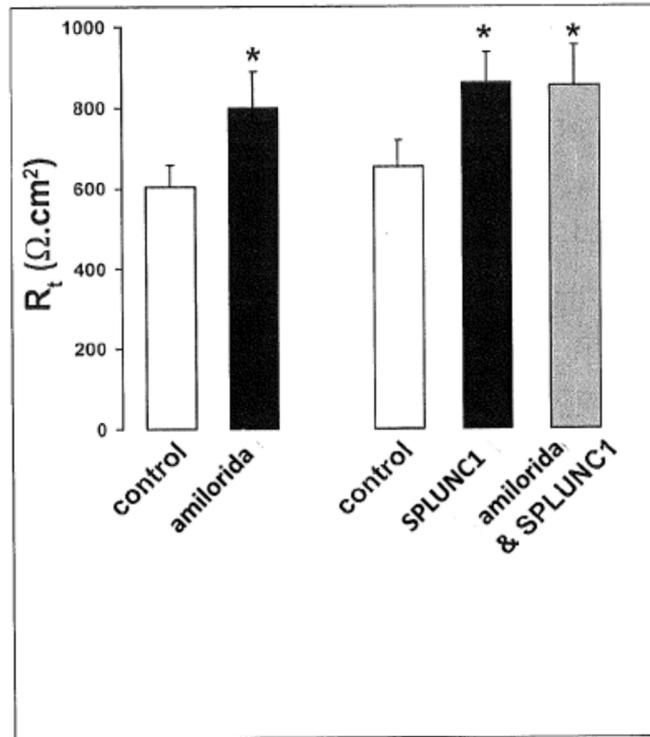


FIG. 6

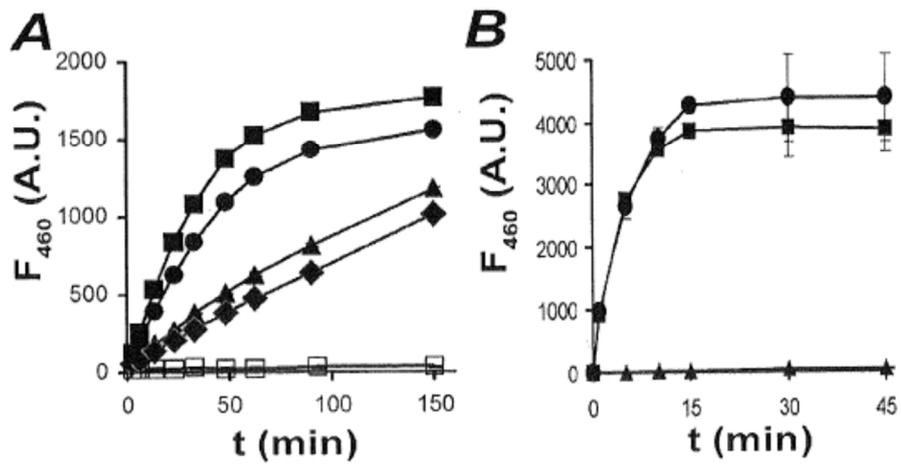


FIG. 5

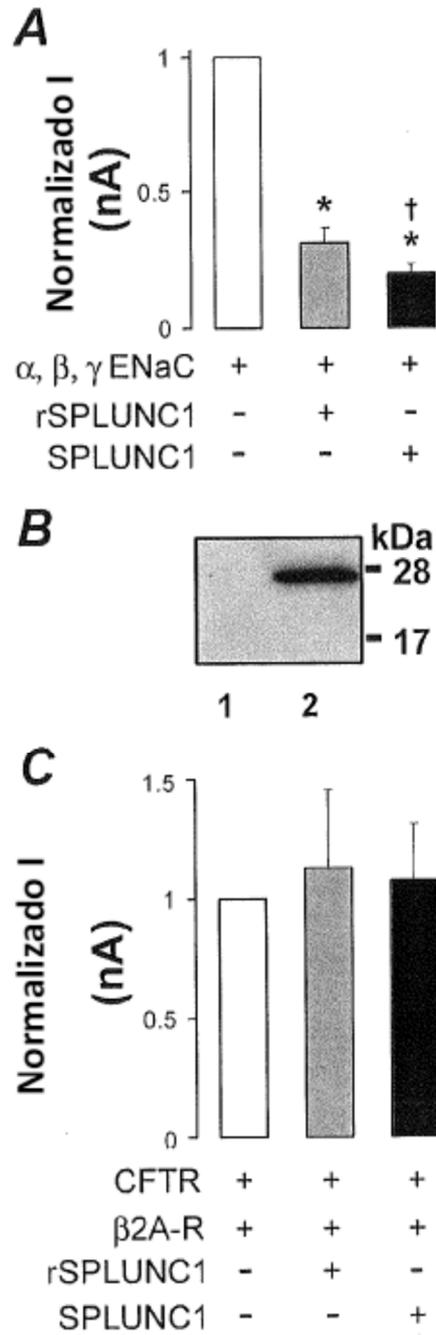


FIG. 7

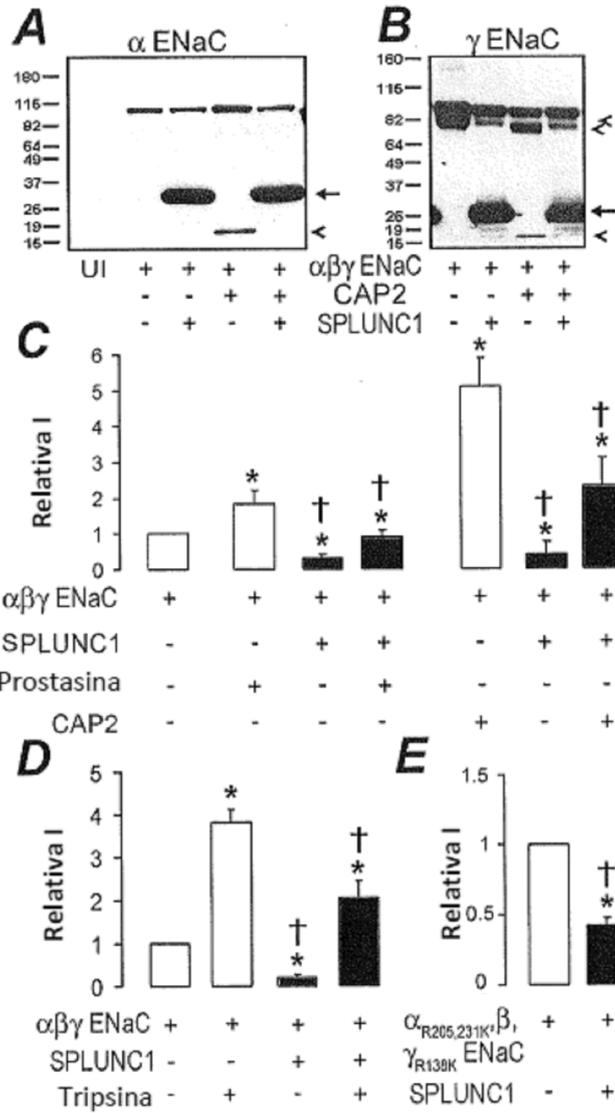


FIG. 8

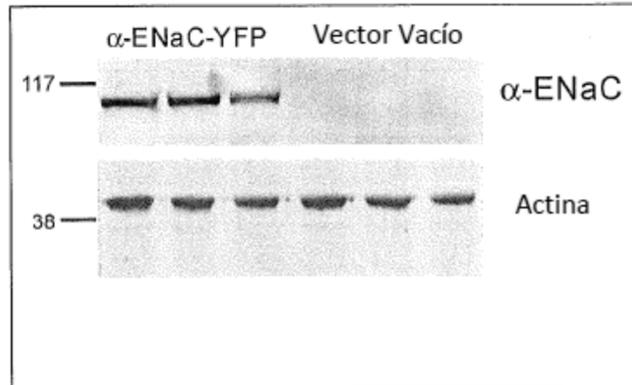


FIG. 9

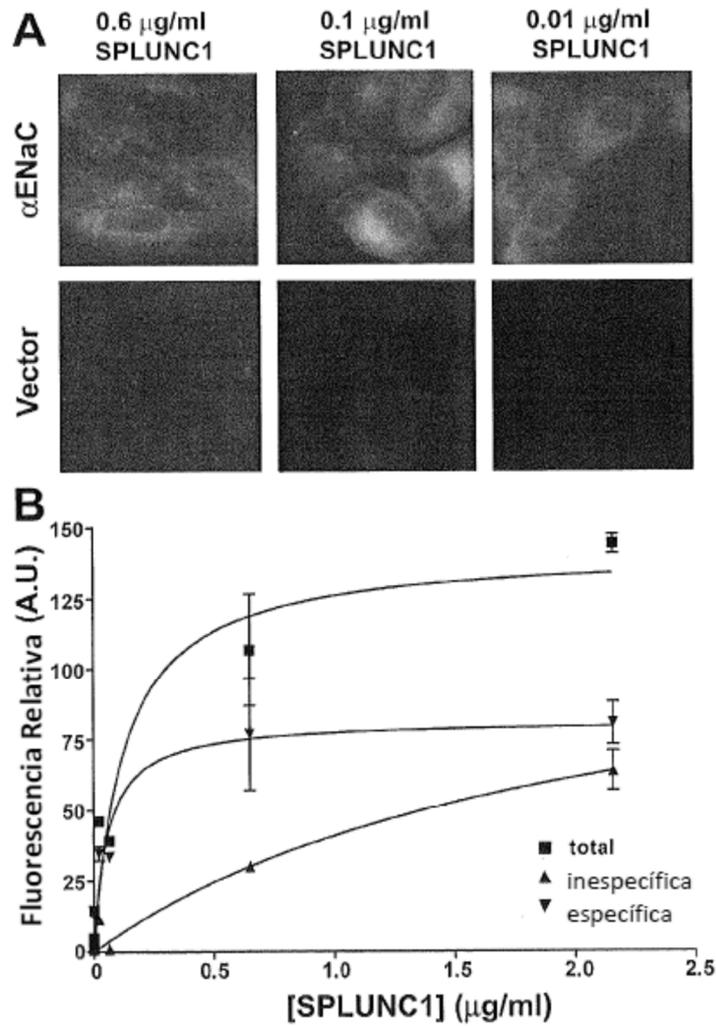


FIG. 10

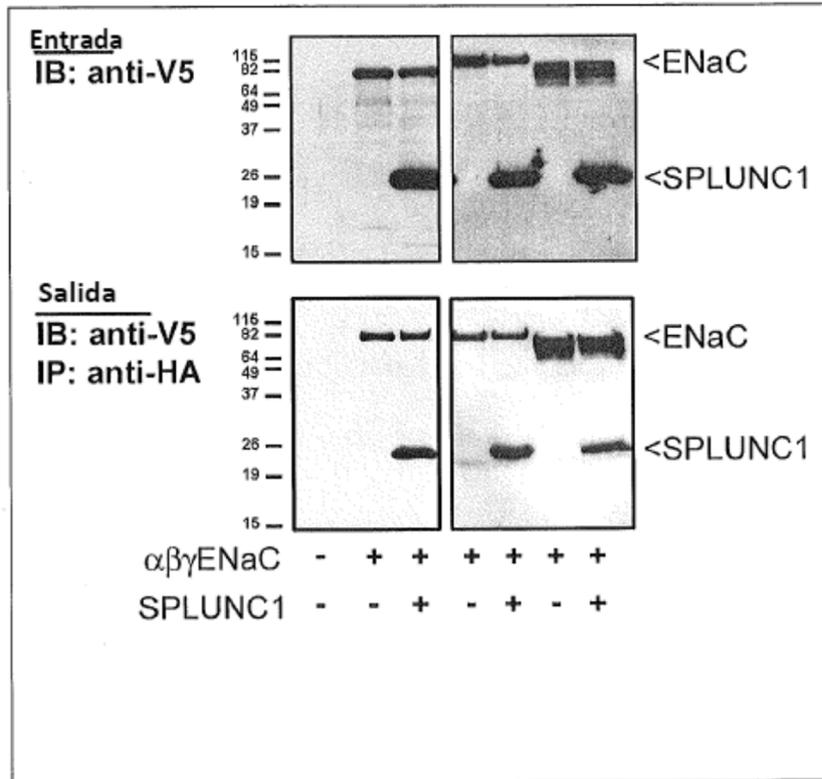


FIG. 11

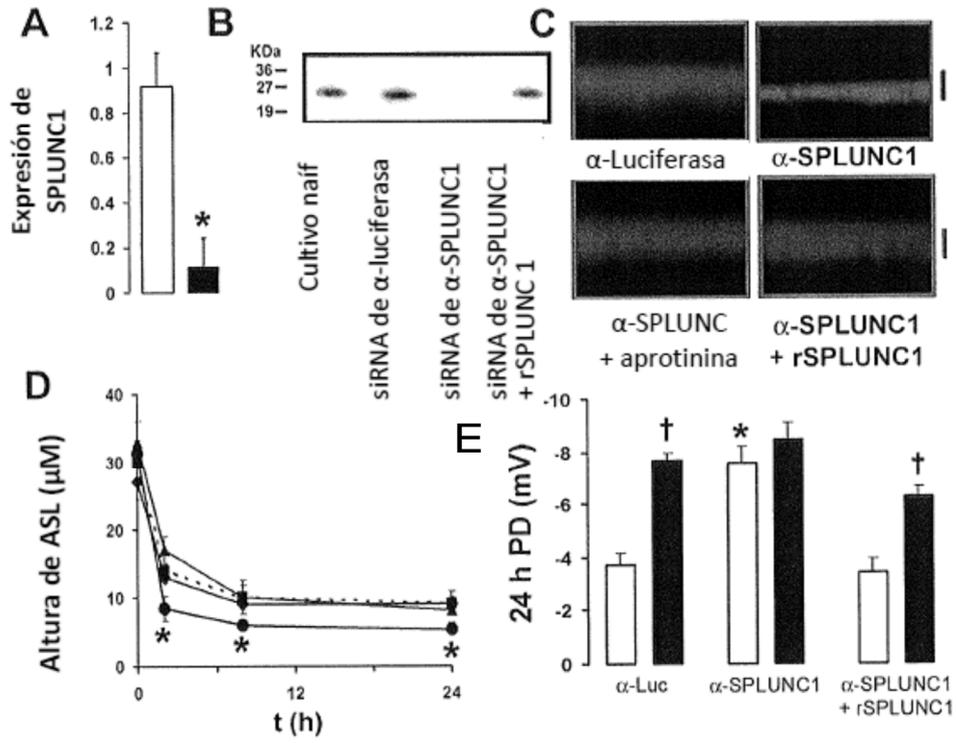


FIG. 12

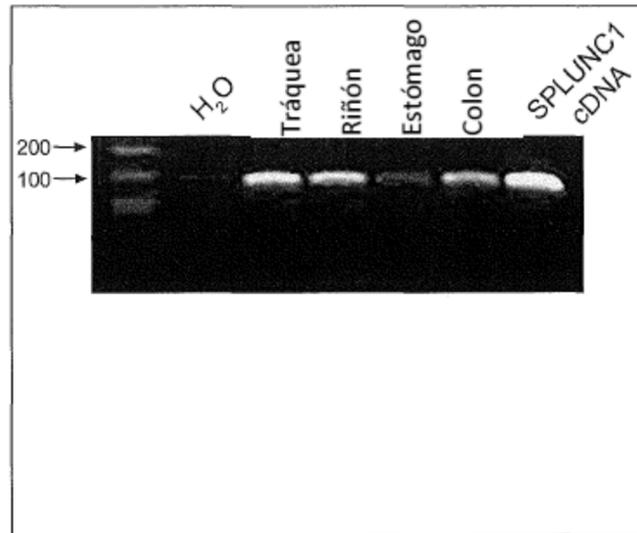


FIG. 13

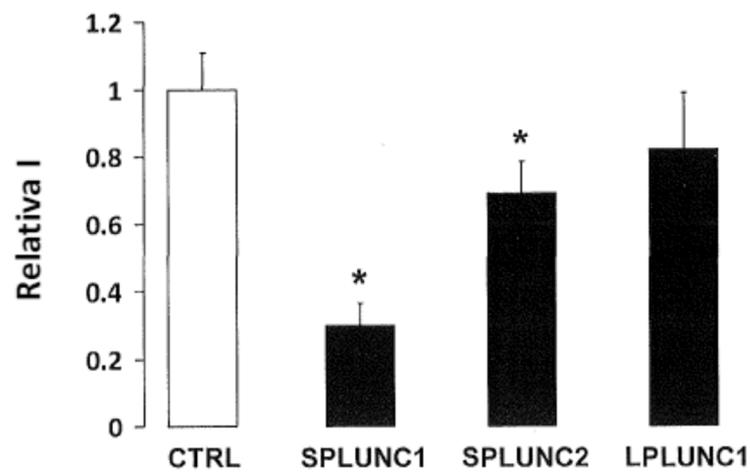


FIG. 14

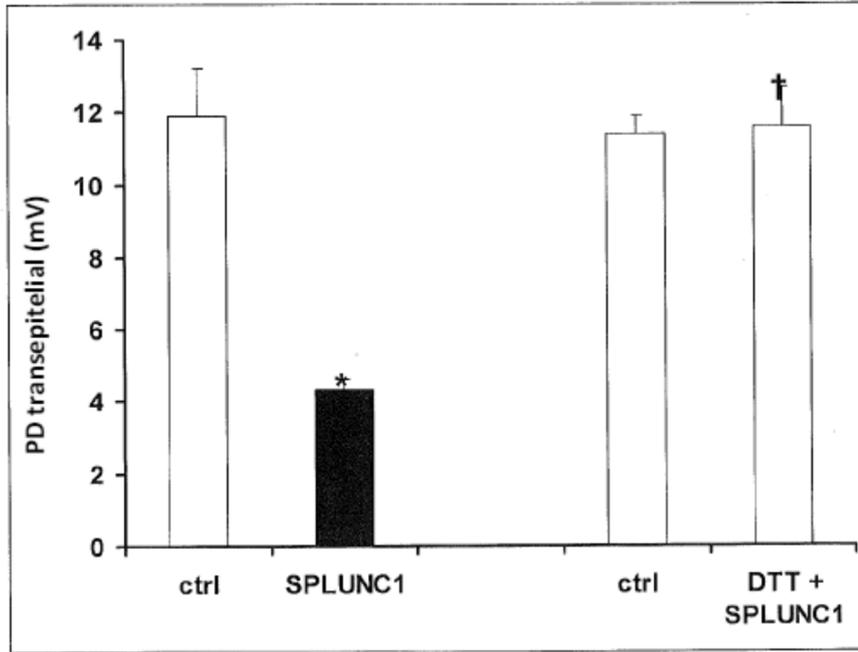


FIG. 15

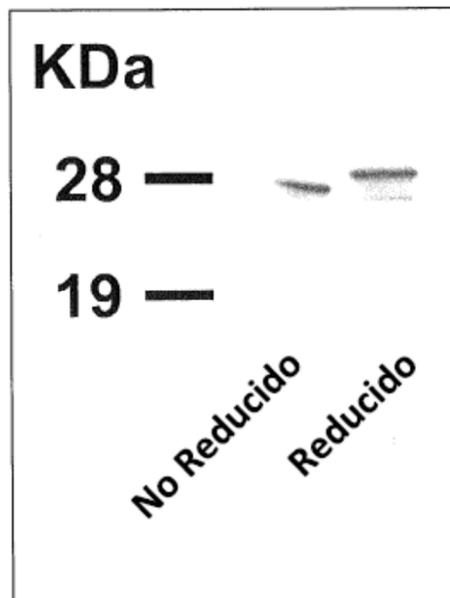


FIG. 16

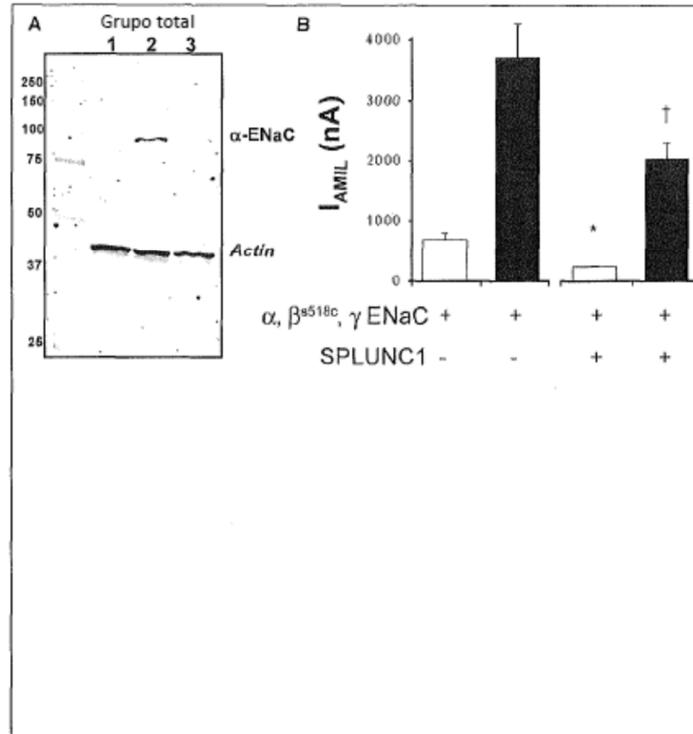


FIG. 17

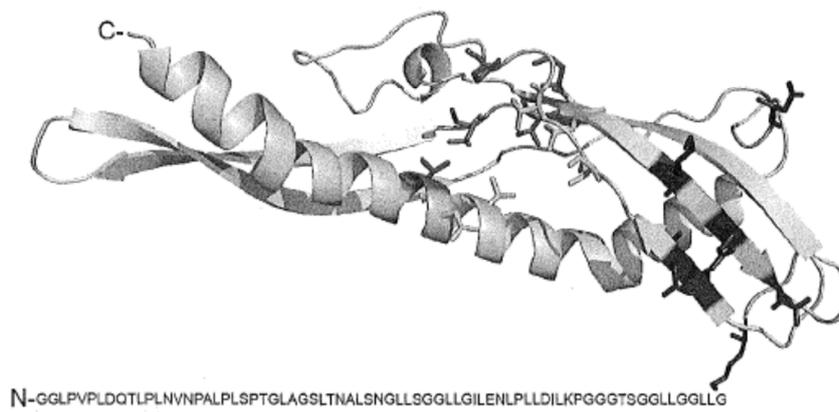


FIG. 18

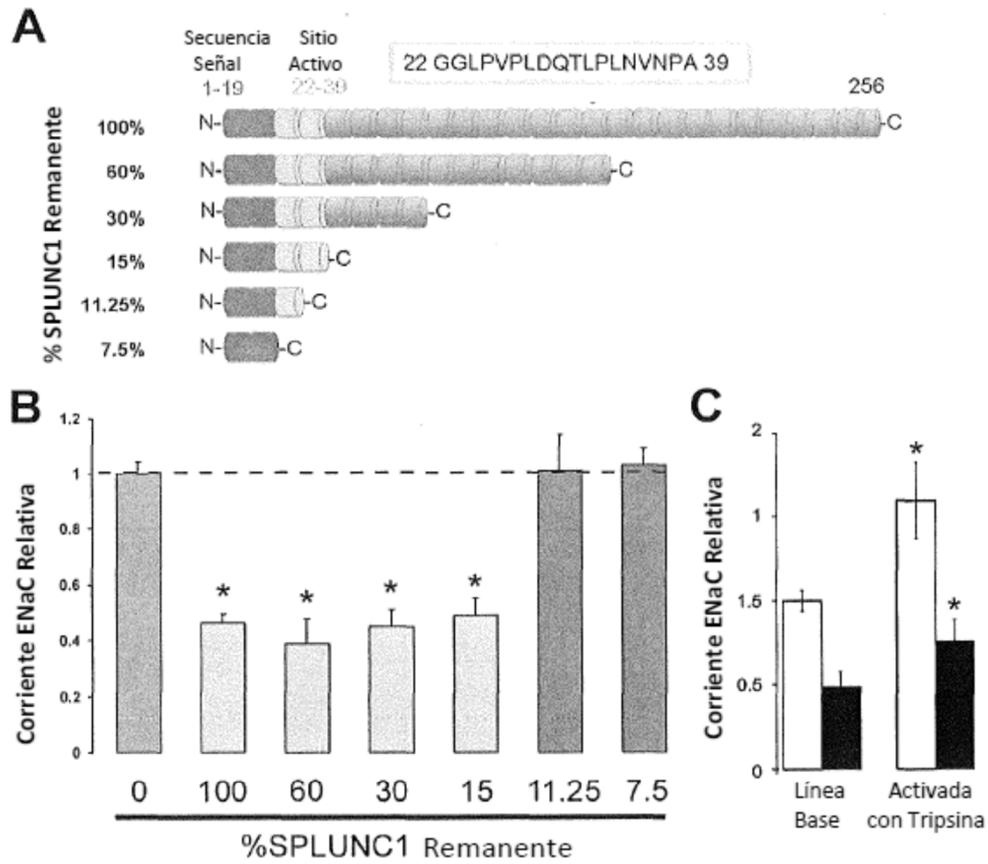


FIG. 19

A26	4	GALPHPL-QRLRTPPPP---NPA	22
		G LP PL Q L P NPA	
SPLUNC1	22	GGLPVPLDQTL-----PLNVNPA	39
		G P + PL V	
γ43	11	GTPPRFLNLI-----PLLV	24

FIG. 20

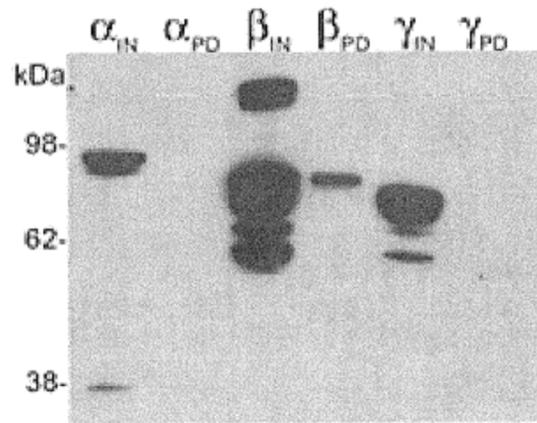


FIG. 21

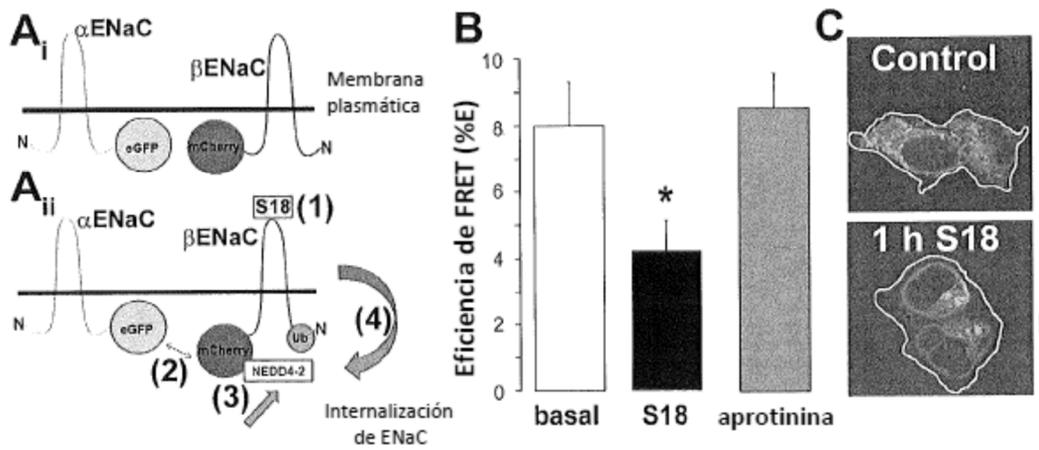


FIG. 22

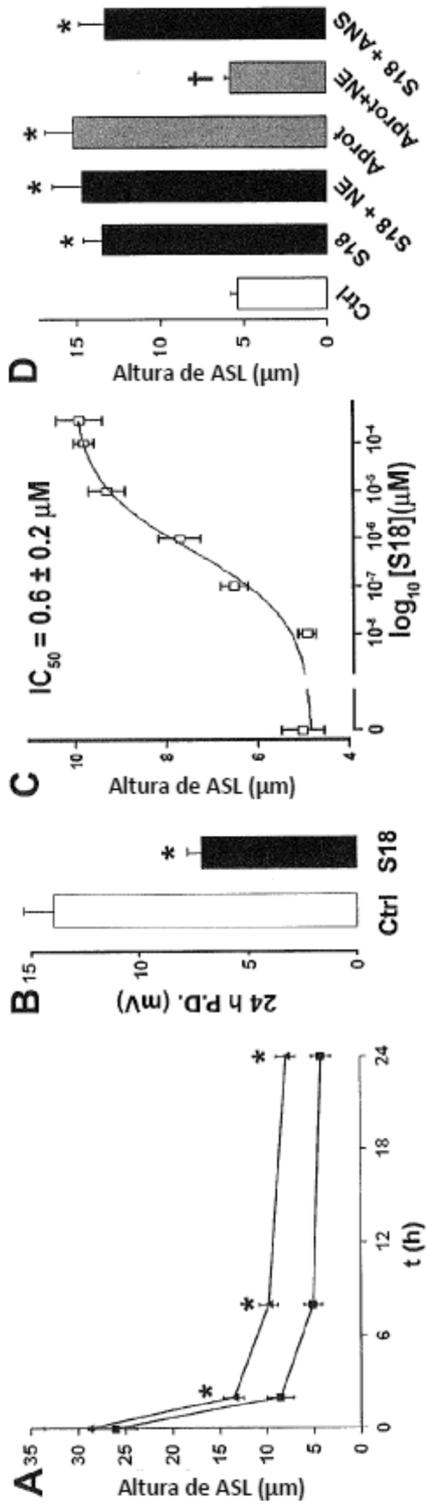


FIG. 23

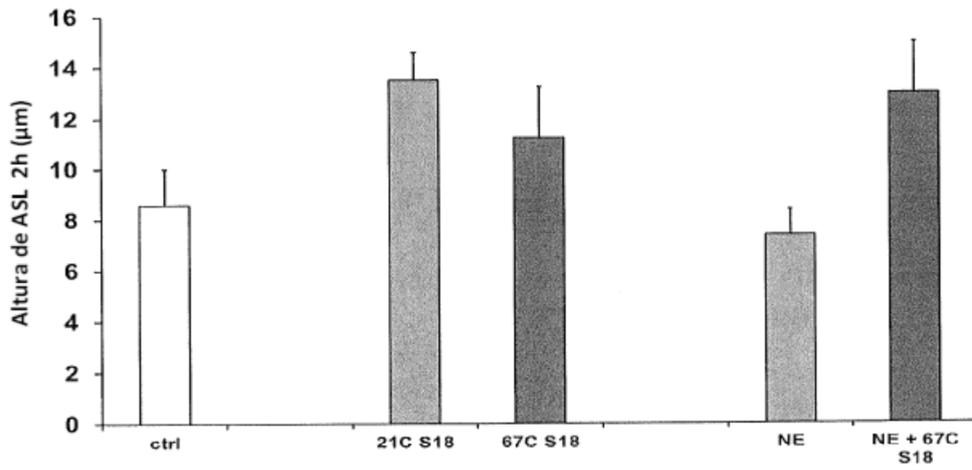


FIG. 24

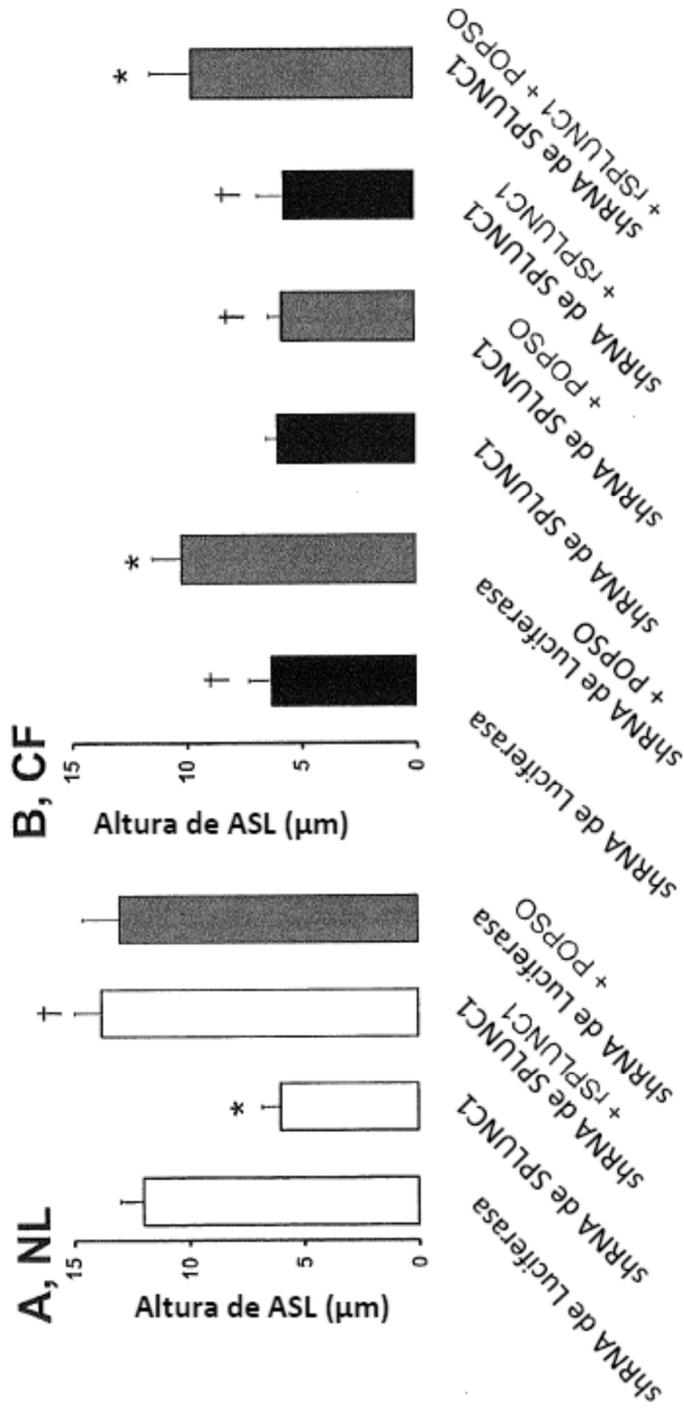


FIG. 25

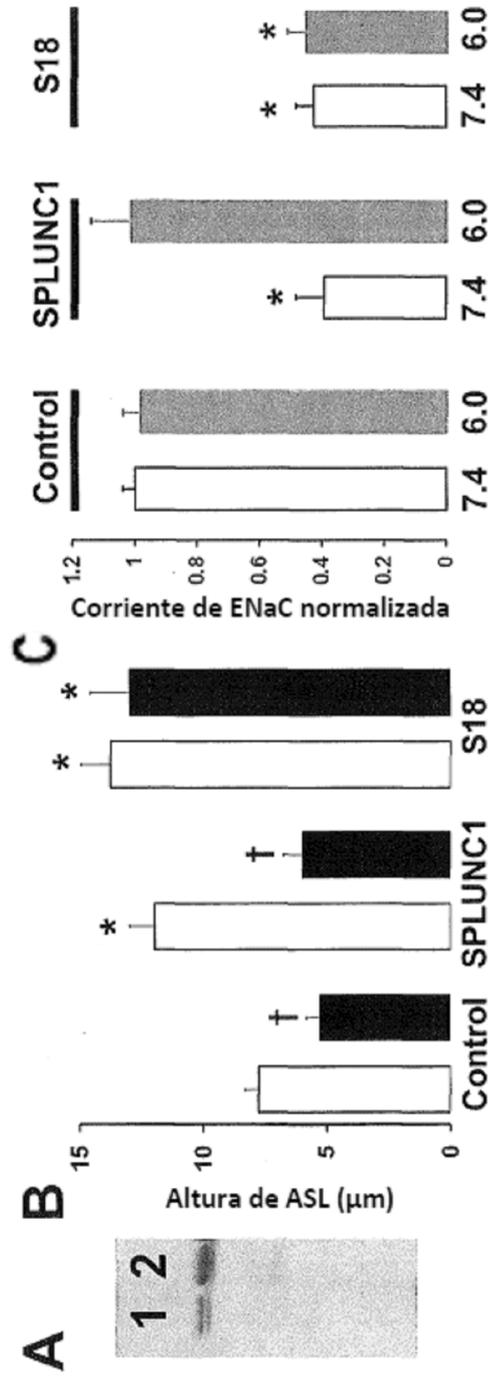


FIG. 26

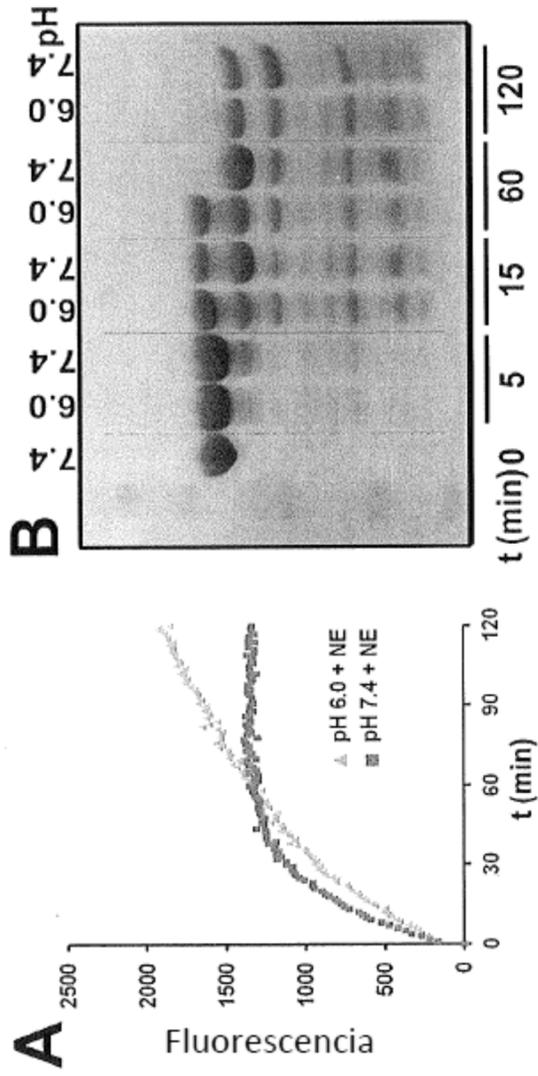


FIG. 27

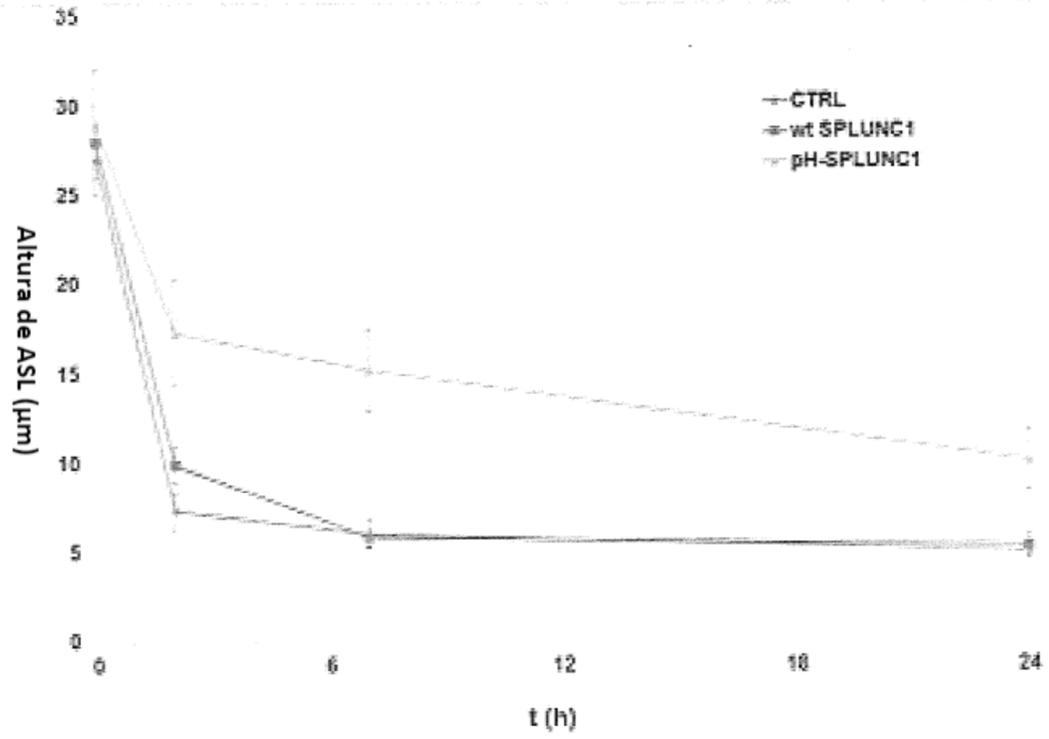


FIG. 28

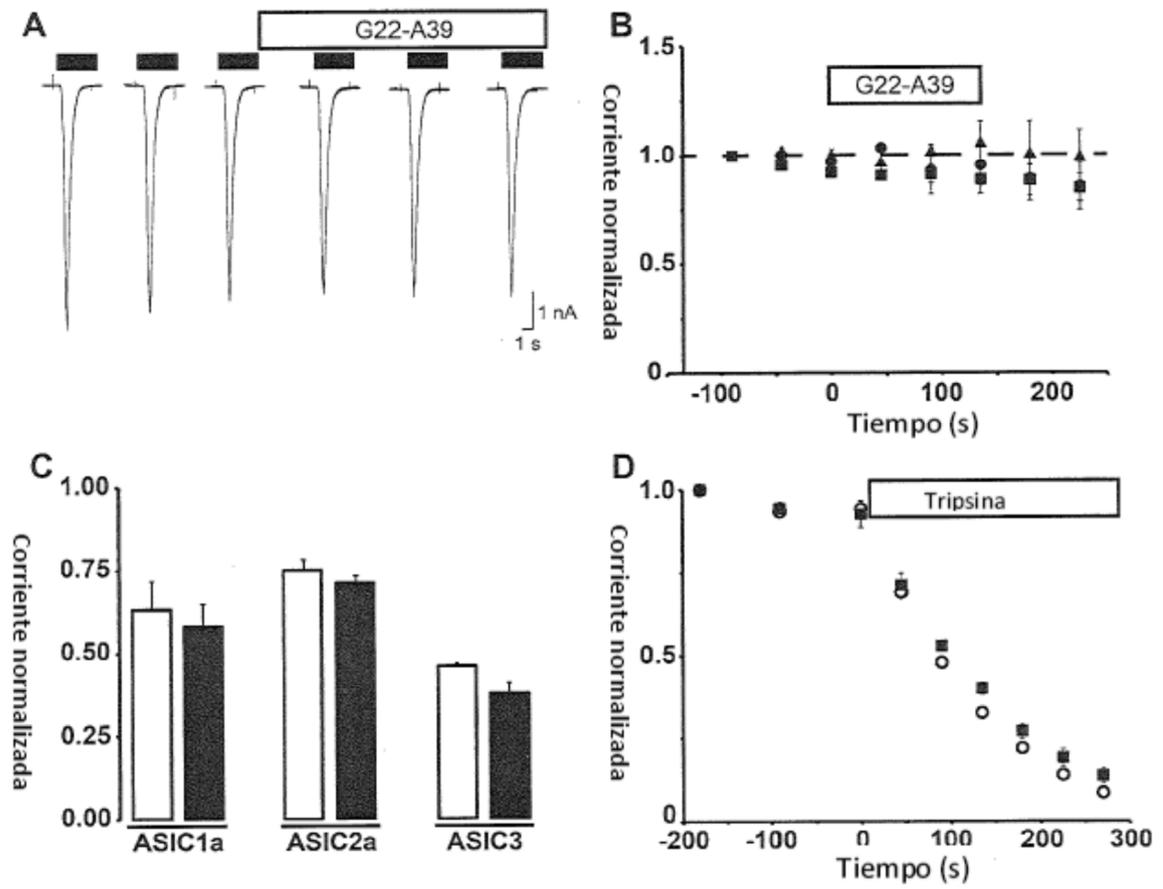


FIG. 29

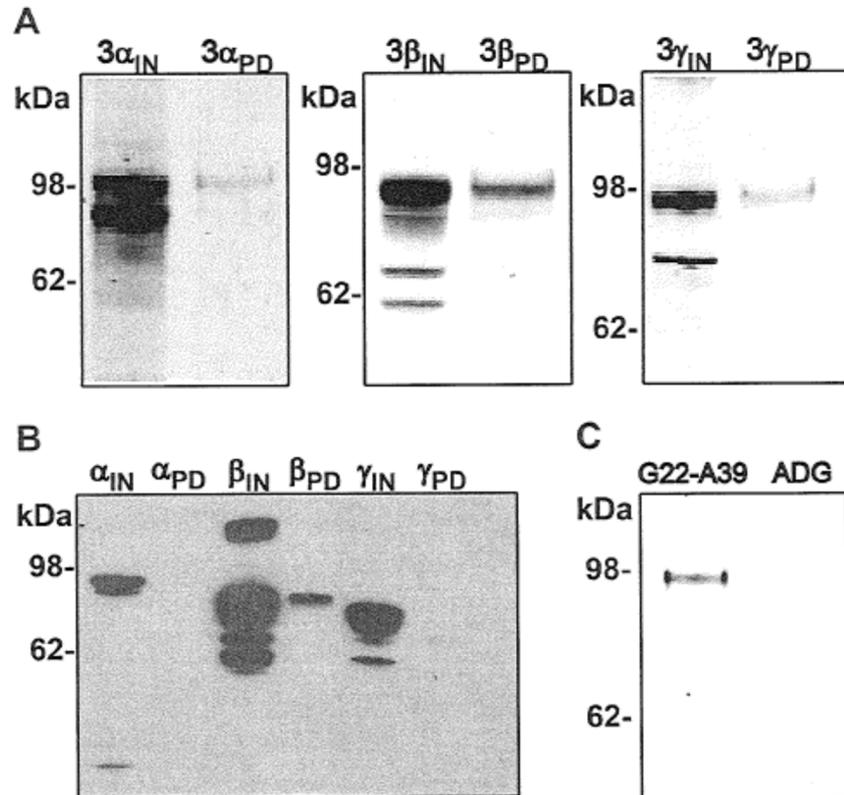


FIG. 30

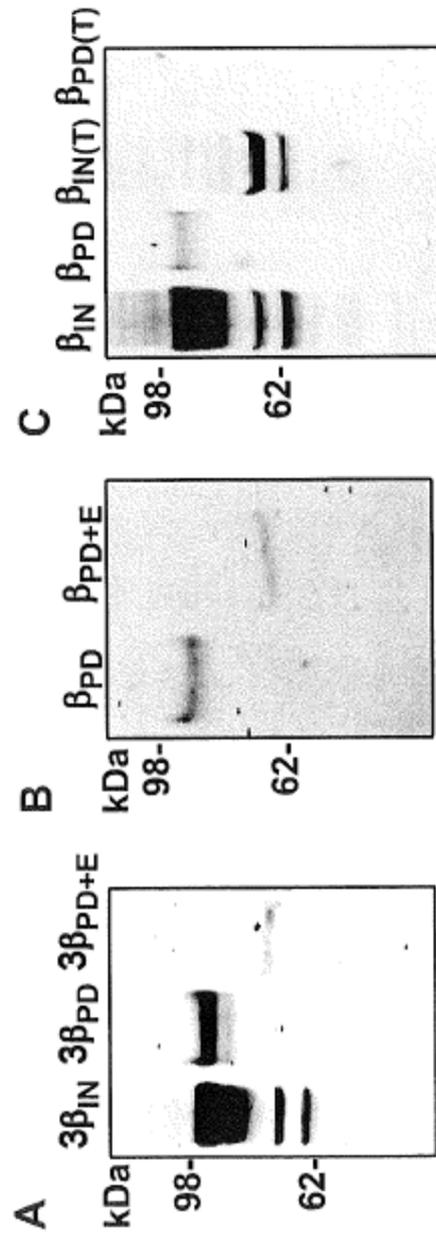


FIG. 31

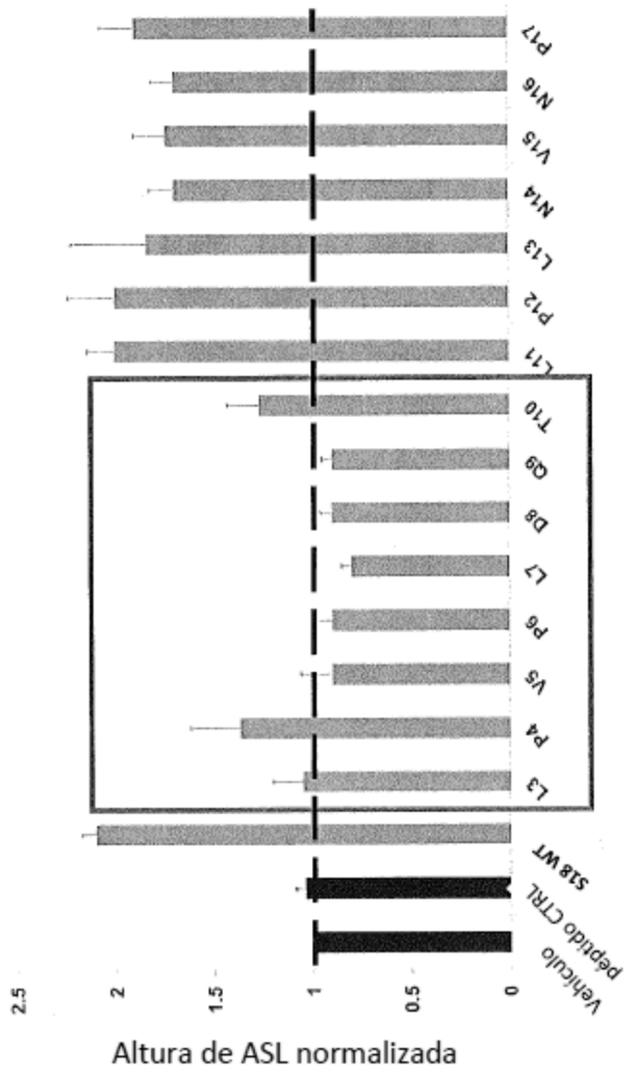


FIG. 32

