

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 989 635**

51 Int. Cl.:

A01P 1/00 (2006.01)
A01N 63/10 (2010.01)
A01N 63/50 (2010.01)
A61K 38/48 (2006.01)
A61P 11/00 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 43/00 (2006.01)
A61P 31/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.07.2016** **PCT/EP2016/067570**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **02.02.2017** **WO17017027**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.07.2016** **E 16751512 (1)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.09.2024** **EP 3325002**

54 Título: **Composiciones terapéuticas combinadas**

30 Prioridad:

24.07.2015 EP 15178209

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
27.11.2024

73 Titular/es:

ENZYMATICA AB (100.0%)
Ideon Science Park
223 70 Lund, SE

72 Inventor/es:

GUDMUNDSDÓTTIR, ÁGÚSTA y
SCHEVING, REYNIR

74 Agente/Representante:

GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo

ES 2 989 635 T3

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

DESCRIPCIÓN

Composiciones terapéuticas combinadas

Campo de la invención

La presente invención se refiere a terapias combinadas para el tratamiento y prevención de biopelículas bacterianas, como las presentes en infecciones recurrentes del tracto respiratorio superior e inferior.

Antecedentes de la invención

Las biopelículas son matrices tridimensionales heterogéneas y complejas que comprenden una población de células microbianas incrustadas en una matriz extracelular (MEC). No son sólo un conjunto pasivo de células, sino sistemas biológicos estructural y dinámicamente complejos que forman ecosistemas locales. Las células microbianas de una población de biopelículas parecen cooperar y asumir funciones especiales. Al cooperar y formar una MEC protectora, la biopelícula proporciona a los microorganismos un modo de crecimiento protegido que les permite colonizar diversos entornos. El modo de crecimiento en biopelícula permite a las bacterias contrarrestar el sistema inmunitario del huésped, así como los antibióticos y otros agentes bacteriostáticos y bactericidas similares. De este modo, el desarrollo de biopelículas permite que una población bacteriana muestre resistencia a los antibióticos. Las bacterias que crecen en biopelículas son más difíciles de derrotar que sus homólogas planctónicas, es decir, de vida libre (véase del Pozo y Patel, 2007, Clin. Pharmacol. Ther. 82:204-9 y Stewart & Costerton, 2001, Lancet 358:135-8).

Las biopelículas pueden consistir en poblaciones mono o polibacterianas adheridas a prácticamente cualquier superficie biológica o no biológica. En estas poblaciones multicelulares, las células se adhieren unas a otras. La mayoría de las especies bacterianas, así como las arqueas, los protozoos, los hongos y las algas, tienen la capacidad de adherirse a las superficies y entre sí y formar estructuras de biopelículas. La formación de biopelículas suele comenzar con la adhesión de microorganismos flotantes a una superficie. Cuando se modifican las expresiones de numerosos genes, una célula planctónica sufre un cambio fenotípico y pasa del modo de vida libre al modo de crecimiento en biopelícula. Los primeros colonos se adhieren a la superficie inicialmente mediante una adhesión débil y reversible, que puede reforzarse mediante la producción de estructuras de adhesión celular como los *pili*. Una vez iniciada la colonización, la biopelícula crece mediante una combinación de división celular y aparición y fijación de nuevas bacterias. Los primeros colonos facilitan la llegada de otras células al proporcionar sitios de adhesión más diversos y al empezar a construir la matriz que mantiene unida la biopelícula.

Las biopelículas pueden formarse en diversos entornos, como en la naturaleza, en entornos domésticos, industriales y hospitalarios, donde ejercen diversos efectos que pueden ser positivos o negativos en función del contexto.

En el entorno médico, las biopelículas forman reservorios persistentes de bacterias en las superficies. Las biopelículas pueden producirse tanto directamente en el paciente como indirectamente en las superficies de su entorno inmediato. Las biopelículas presentes directamente sobre el paciente suelen asociarse a infecciones recurrentes, mientras que la transferencia de bacterias del entorno inmediato al paciente está implicada tanto en las infecciones primarias como en las recurrentes. Ejemplos de biopelículas en entornos hospitalarios son las biopelículas en catéteres y otros tipos de tubos, y en implantes como válvulas cardíacas y prótesis articulares.

En los entornos industriales, las biopelículas pueden ser tanto esenciales como perjudiciales. Por ejemplo, en los recientes desarrollos de biorreactores microbianos eficientes, se utilizan electrodos colonizados por biopelículas para generar electricidad. También se han explorado las biopelículas como posibles fábricas biológicas de compuestos, por ejemplo, celulosa.

La solicitud de patente internacional WO 00/78332 proporciona el uso de proteasas de serina de pescado, incluyendo tripsinas y quimotripsinas derivadas del bacalao, como el bacalao del Atlántico, para tratar y/o prevenir una variedad de enfermedades y trastornos. Se trata, por ejemplo, de enfermedades inflamatorias, enfermedades infecciosas causadas por virus, bacterias y especies fúngicas y enfermedades en cuya patogénesis interviene un mecanismo de unión a receptores.

Augustin *et al.* (2004) y Gudmundsdottir *et al.* (2013) debaten la posibilidad de utilizar enzimas para eliminar las biopelículas. Sin embargo, el uso de enzimas por sí solo no es suficiente para destruir las bacterias y éstas pueden, si se les da tiempo y el entorno adecuado, volver a adherirse a la superficie o a cualquier superficie cercana y reconstruir la biopelícula (Augustin *et al.*, 2004; Gudmundsdottir *et al.*, 2013).

Se ha demostrado que la tripsina del bacalao facilita la eliminación de la piel muerta por desbridamiento y, por lo tanto, ayuda en el proceso normal de reparación de la piel. El principal problema de utilizar enzimas marinas hidrófilas, como la tripsina de bacalao y otras serina proteasas de ambientes fríos, es que dichas enzimas son sensibles a la inactivación por calor y, por tanto, son relativamente inestables a temperatura ambiente (Stefansson *et al.*, 2010). El uso de tripsina de bacalao en cosméticos, dispositivos médicos y farmacéuticos depende del aumento de la estabilidad de la enzima.

Se ha comprobado que las biopelículas están implicadas en una amplia variedad de infecciones microbianas en el cuerpo, según una estimación el 80% de todas las infecciones (véase "Research on microbial biofilms (PA-03-047)", NIH, National Heart, Lung, and Blood Institute, 2002-12-20). Los procesos infecciosos en los que se ha implicado a las biopelículas incluyen problemas comunes como las infecciones urinarias, las infecciones por catéteres, las infecciones del oído medio, el recubrimiento de lentes de contacto, y procesos menos comunes pero más letales como la endocarditis, las infecciones en la fibrosis quística y las infecciones de dispositivos permanentes internos como las prótesis articulares y las válvulas cardíacas.

Curiosamente, microorganismos como las bacterias que se adhieren a una superficie y crecen en forma de biopelícula son menos vulnerables a los tratamientos antibióticos convencionales. La menor susceptibilidad a los antibióticos contribuye a la persistencia de las infecciones por biopelículas, como las asociadas a los dispositivos implantados. Los mecanismos de protección que actúan en las biopelículas parecen ser distintos de los responsables de la resistencia convencional a los antibióticos. En las biopelículas, la escasa penetración de antibióticos, la limitación de nutrientes, el crecimiento lento, las respuestas adaptativas al estrés y la formación de células persistentes constituyen, según la hipótesis, una defensa multicapa.

Además, los cultivos de biopelículas suelen ser muy refractarios a la erradicación con quimioterapia, sin desarrollar resistencia genotípica. En consecuencia, el número de opciones terapéuticas es limitado y el desarrollo de nuevos agentes antimicrobianos con actividad antibiopelícula es cada vez más importante.

Iwase *et al* (2010), Nature, 465(7296):346-349 afirman que *Staphylococcus epidermidis* Esp inhibe la formación de biopelículas de *Staphylococcus aureus* y la colonización nasal.

Bals *et al* (1998), J Clin Invest, 102(5):874-880 se refieren a la beta-defensina 2 humana como un antibiótico peptídico sensible a la sal expresado en el pulmón humano.

El documento WO 2015/150799 A1 se refiere a procedimientos para la producción de polipéptidos recombinantes que tienen actividad de serina proteasa, polipéptidos obtenibles por tales procedimientos y uso de dichos polipéptidos en medicina, cosmética e industria.

El documento WO 2015/114343 A1 se refiere a polipéptidos que tienen actividad proteasa para su uso en el tratamiento o prevención de infecciones microbianas en un sujeto con inmunodeficiencia o susceptible de padecerla.

Un artículo en la red informática titulado "Natural Anti-Biofilm Agents" por drwillip (<https://thescienceofnutrition.me/2015/03/13/natural-anti-biofilm-agents/>) trata sobre los agentes antibiopelícula naturales.

Darouiche *et al* (2009), J Antimicrob Chemother, 64(1):88-93 alegan una eficacia antimicrobiana y antibiopelícula de la combinación de triclosán y DispersinB.

Rogers *et al* (2010), Antimicrob Agents Chemother, 54(5):2112-2118 se refieren a supuestos efectos sinérgicos entre antibióticos convencionales y agentes antibiopelícula derivados de 2-aminoimidazoles.

Mukherji *et al* (2015), Enz Eng, 4(1), DOI: 10.4172/2329-6674.1000126, se refieren al papel de las proteasas extracelulares en la disrupción de biopelículas de bacterias Gram positivas, con especial énfasis en las biopelículas de *Staphylococcus aureus*.

Por lo tanto, existe la necesidad de nuevos procedimientos para eliminar, inhibir o prevenir el crecimiento de biopelículas bacterianas (tanto en entornos médicos como no médicos).

Sumario de la invención

La invención se describe en las reivindicaciones adjuntas. Las referencias a procedimientos de tratamiento mediante terapia en esta descripción deben interpretarse como referencias a compuestos, composiciones farmacéuticas y medicamentos de la presente invención para su uso en dichos procedimientos.

Un primer aspecto de la invención proporciona una terapia de combinación para su uso en el tratamiento de una biopelícula bacteriana en un sujeto que comprende (a) un polipéptido que tiene actividad de serina proteasa y (b) uno o más compuestos antibióticos. Según la invención reivindicada, el polipéptido que tiene actividad de serina proteasa es una tripsina obtenible a partir de bacalao, y dicha biopelícula comprende estreptococos.

Por "terapia combinada" incluimos cualquier forma de tratamiento concurrente o paralelo con los dos o más agentes terapéuticos. Así, tales terapias incluyen la administración por separado del polipéptido y de los compuestos antibióticos, así como el suministro de una única composición que comprenda ambos agentes terapéuticos mezclados.

Por "tratamiento" incluimos tanto el uso terapéutico como profiláctico de los agentes terapéuticos combinados. En relación con el uso terapéutico, los expertos en la materia apreciarán que la terapia combinada puede erradicar por completo una biopelícula bacteriana existente o puede proporcionar un beneficio parcial (como una reducción del tamaño de la población bacteriana que constituye la biopelícula y/o una ralentización del crecimiento de la población

bacteriana que constituye la biopelícula). Asimismo, en relación con el uso profiláctico, la terapia combinada puede prevenir completamente la formación de biopelículas o puede proporcionar sólo un beneficio parcial, como reducir la probabilidad y/o gravedad de la infección con una biopelícula bacteriana.

5 En una realización, el sujeto es un ser humano. Sin embargo, las terapias combinadas de la invención también pueden ser útiles en un entorno veterinario, por ejemplo en el tratamiento de biopelículas bacterianas en animales domésticos y/o de granja (incluidos perros, gatos, caballos, vacas, cerdos, ovejas y similares).

10 Individualmente, los antibióticos y las proteasas de serina (como las tripsinas) no son capaces de resolver las infecciones por biopelículas. Aunque los antibióticos pueden utilizarse para tratar infecciones bacterianas sistémicas y locales con mayor o menor éxito, estos compuestos no pueden penetrar fácilmente en la matriz extracelular de las biopelículas, por lo que su eficacia para eliminar las bacterias que se encuentran en su interior es limitada. Por lo tanto, los antibióticos son incapaces de resolver por completo las infecciones originadas por biopelículas.

15 Las proteasas de serina (como las tripsinas) pueden disolver la matriz extracelular de las bacterias y también son capaces de liberar las bacterias adheridas a material biológico o inorgánico, así como de impedir su reimplantación inmediata. Sin embargo, las bacterias no mueren con el tratamiento de tripsina y, con el tiempo, podrán recuperar su capacidad de adherirse a las superficies.

Así pues, cuando se administran individualmente, las proteasas de serina o los antibióticos no son capaces de resolver completamente las infecciones por biopelículas.

20 La presente invención surge del descubrimiento inesperado de un efecto sinérgico sobre las biopelículas bacterianas cuando se administran en combinación proteasas de serina (como tripsinas) y compuestos antibióticos convencionales. Sorprendentemente, esta combinación seleccionada de agentes activos es capaz de destruir tanto la matriz extracelular como las bacterias de las biopelículas de forma sinérgica. Sin querer ceñirnos a la teoría, se cree que al alterar la matriz extracelular de las biopelículas, la serina proteasa permite a los antibióticos penetrar más profundamente en la biopelícula y acceder a las células bacterianas que residen en ella. Esto permite al antibiótico ejercer su función sobre las bacterias, que de otro modo se vería obstaculizada por los efectos barrera de la matriz extracelular.

Los expertos en la materia apreciarán que las terapias combinadas descritas en el presente documento pueden utilizarse para eliminar, inhibir o prevenir el crecimiento de una biopelícula microbiana en cualquier entorno en el que puedan encontrarse dichas biopelículas. Así, la biopelícula puede estar asociada a un soporte inerte o a un soporte vivo.

30 En una realización, la biopelícula está asociada a un soporte vivo. Por ejemplo, la biopelícula puede crecer o ser susceptible de crecer en una superficie dentro del cuerpo humano o animal.

Así, la invención proporciona terapias combinadas como las definidas anteriormente para su uso en el tratamiento o la prevención de una afección asociada con la presencia o el crecimiento de una biopelícula.

35 Por ejemplo, las terapias combinadas descritas en el presente documento pueden utilizarse para tratar o prevenir un trastorno o afección asociados con el crecimiento de una biopelícula microbiana en uno de los siguientes lugares del cuerpo:

- (a) las vías respiratorias (por ejemplo, infecciones bacterianas recurrentes de las vías respiratorias superiores y/o inferiores);
- (b) las vías urinarias (por ejemplo, cistitis);
- 40 (c) los senos paranasales (por ejemplo, sinusitis crónica);
- (d) el oído (por ejemplo, infecciones del oído medio);
- (e) el corazón (por ejemplo, endocarditis);
- (f) la próstata (por ejemplo, prostatitis bacteriana crónica);
- (g) el hueso (por ejemplo, osteomielitis);
- 45 (h) los pulmones (por ejemplo, infecciones en la fibrosis quística como la neumonía);
- (i) los riñones (por ejemplo, cálculos renales infecciosos y en diálisis peritoneal); y/o
- (j) la piel.

En otra realización, la biopelícula está asociada a un soporte inerte. Así, la biopelícula puede crecer o ser susceptible de crecer en la superficie de un dispositivo implantado o insertado de otro modo dentro del cuerpo humano o animal.

50 Por ejemplo, las terapias combinadas aquí descritas pueden utilizarse para tratar o prevenir una infección asociada con el crecimiento de una biopelícula microbiana en una de las siguientes superficies inertes dentro del cuerpo:

- (a) un catéter (por ejemplo, para uso intravascular o de las vías urinarias);
- (b) un stent (por ejemplo, un stent coronario);
- (c) una derivación (por ejemplo, una derivación cerebroespinal);
- 55 (d) un tubo de intubación o traqueotomía;

- (e) un dispositivo oftálmico (por ejemplo, lentes de contacto, hebillas esclerales y lentes intraoculares);
- (f) prótesis articulares (es decir, artroplastia e implantación de otros dispositivos ortopédicos).
- (g) una válvula cardíaca artificial; y/o
- (h) un implante mamario.

5 Por lo tanto, se apreciará que las terapias combinadas descritas en el presente documento son particularmente adecuadas para el tratamiento y la prevención de infecciones nosocomiales.

De acuerdo con la invención reivindicada, la biopelícula comprende o está formada por estreptococos. De otro modo, la biopelícula comprende o está formada por bacterias Gram negativas y/o Gram positivas.

10 Las bacterias pueden ser bacterias Gram positivas, como las seleccionadas del grupo que consiste en estafilococos o estreptococos. Por ejemplo, las bacterias pueden ser estafilococos, como *Staphylococcus aureus* (por ejemplo, *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina, SARM). Alternativamente, las bacterias pueden ser estreptococos, como *Streptococcus mutans* y/o *Streptococcus sanguis*.

Las bacterias también pueden ser bacterias Gram negativas, como la *Legionella*.

15 Preferiblemente, la biopelícula comprende bacterias seleccionadas independientemente del grupo que consiste en *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus mitis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Haemophilus influenza*, *staphylococcus aureus* resistente a la meticilina, *Staphylococcus aureus* sensible a la meticilina, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguinis*, *Legionella pneumophila*, *Clostridium difficile*, y cualquier mezcla de los mismos.

20 Así, dicha biopelícula puede comprender bacterias seleccionadas independientemente de *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus mitis*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Haemophilus influenza*, o una mezcla de las mismas.

De acuerdo con la invención reivindicada, la biopelícula comprende o consiste en estreptococos, como *Streptococcus mitis* y/o *Streptococcus pneumoniae*.

25 Las terapias combinadas de la invención se administrarán a un sujeto en una dosis farmacéuticamente eficaz. Una "cantidad terapéuticamente eficaz", o "cantidad efectiva", o "terapéuticamente eficaz", como se utiliza aquí, se refiere a la cantidad que proporciona un efecto terapéutico para una afección y un régimen de administración determinados (por ejemplo, erradicación, reducción del tamaño o retraso del crecimiento de una biopelícula bacteriana). Se trata de una cantidad predeterminada de material activo calculada para producir un efecto terapéutico deseado en asociación con el aditivo y diluyente requeridos, es decir, un portador o vehículo de administración. Además, se entiende una cantidad suficiente para reducir, y preferiblemente prevenir, un déficit clínicamente significativo en la actividad, función y respuesta del huésped. Alternativamente, una cantidad terapéuticamente eficaz es suficiente para causar una mejora en una condición clínicamente significativa en un huésped. Como aprecian los expertos en la materia, la cantidad de un compuesto puede variar en función de su actividad específica. Las cantidades de dosificación adecuadas pueden contener una cantidad predeterminada de composición activa calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el diluyente requerido. En los procedimientos y el uso para la fabricación de composiciones de la invención, se proporciona una cantidad terapéuticamente eficaz del componente activo. Una cantidad terapéuticamente eficaz puede ser determinada por un médico o veterinario experto basándose en las características del paciente, como la edad, el peso, el sexo, el estado, las complicaciones, otras enfermedades, etc., como es bien conocido en la técnica. La administración de la dosis farmacéuticamente eficaz puede llevarse a cabo tanto por administración única en forma de una unidad de dosis individual o varias unidades de dosis más pequeñas, como por administraciones múltiples de dosis subdivididas a intervalos específicos. Alternativamente, la dosis puede administrarse como infusión continua durante un periodo prolongado.

Un primer componente crítico de las terapias combinadas de la invención es un polipéptido con actividad de serina proteasa.

45 Por polipéptido con actividad de serina proteasa incluimos polipéptidos catalíticos naturales y no naturales capaces de escindir enlaces peptídicos en proteínas, en los que la serina sirve como aminoácido nucleofílico en el sitio activo del polipéptido (como se define de acuerdo con el número CE 3.4.21). La actividad de la serina proteasa puede ser de tipo quimotripsina (es decir, tripsinas, quimotripsinas y elastasas) o de tipo subtilisina.

50 De acuerdo con la invención reivindicada, el polipéptido que tiene actividad de serina proteasa es tripsina obtenible de bacalao, tal como bacalao del Atlántico (*Gadus morhua*). De otro modo divulgado es en el que el polipéptido que tiene actividad de serina proteasa exhibe actividad de tripsina. Por ejemplo, el polipéptido con actividad de serina proteasa puede ser una tripsina natural, de origen eucariota o procariota, o una versión mutada de dicha tripsina. Se incluyen específicamente las tripsinas adaptadas al frío, como la tripsina del bacalao del Atlántico (*Gadus morhua*), del salmón del Atlántico y del Pacífico (por ejemplo, *Salmo salar* y especies de *Oncorhynchus*) y del abadejo de Alaska (*Theragra chalcogramma*), y sus formas mutadas (como se describe a continuación).

55 Se han caracterizado tres isoenzimas principales de tripsina del bacalao del Atlántico, denominadas tripsina I, II y III (véase Ásgeirsson et al., 1989, Eur. J. Biochem. 180:85-94). Por ejemplo, véase GenBank Accession No. ACO90397.

Además, el bacalao del Atlántico expresa dos isoenzimas principales de quimotripsina, denominadas quimotripsina A y B (véase Ásgeirsson & Bjarnason, 1991, Comp. Biochem. Physiol. 8 998:327-335). Por ejemplo, véase GenBank Accession No. CAA55242.1.

- 5 En una realización de la invención reivindicada, el polipéptido que tiene actividad de serina proteasa comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 (abajo). De otro modo divulgado es donde el polipéptido que tiene actividad de serina proteasa comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que comparte al menos 70% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de tripsina I de bacalao del Atlántico (*Gadus morhua*), es decir, SEQ ID NO: 1:

```

16
|
IVGGYECTKHSQAHQVSLNSGYHFCGGSLSKDWVWSAAHCYKSVLRVRLGEHHIRVNEG

79
|
TEQYISSSSVIRHPNYSSYNINNDIMLIKLT KPATLNQYVHAVALPTECAADATMCTVSG

141
|
WGNTMSSVADGDKLQCLSLPILSHADCANSYPGMITQSMFCAGYLEGGKDSCQGDSSGGPV

200
|
VCNGVLQGVVSWGYGCAERDHPGVYAKVCVLSGWWRDTMANY

```

[SEQ ID NO: 1]

- 10 (en la que la secuencia de aminoácidos y la numeración se ajustan a la entrada "2EEK" del Banco de Datos de Proteínas [PDB])

Como muchas proteasas, la tripsina I del bacalao del Atlántico se produce como un precursor inactivo, o zimógeno, que comprende una secuencia de propéptidos (o "activación") que se escinde para generar la tripsina madura y activa. El producto de expresión inicial de la tripsina también comprende una secuencia señal, que se elimina tras la expresión.

- 15 La secuencia zimógena de la tripsina I del bacalao del Atlántico, incluida la secuencia señal, se muestra a continuación como SEQ ID NO:2 (y corresponde a la base de datos Uniprot nº de acceso P16049-1):

10	20	30	40	50
MKSLIFVLLL	GAV <i>FAEEDKI</i>	VG	GYECTKHS	QAHQVSLNSG
60	70	80	90	100
KDWVWSAAHC	YKSVLRVRLG	EH	HIRVNEGT	EQYISSSSVI
110	120	130	140	150
NNDIMLIKLT	KPATLNQYVH	AVALPTECAA	DATMCTVSGW	GNTMSSVADG
160	170	180	190	200
DKLQCLSLPI	LSHADCANSY	PGMITQSMFC	AGYLEGGKDS	CQGDSSGGPVV
210	220	230	240	
CNGVLQGVVS	WGYGCAERDH	PGVYAKVCVL	SGWVRDTMAN	Y

[SEQ ID NO: 2]

en la que:

- 20 Péptido señal = aminoácidos 1 a 13 (subrayados)
 Propéptido = aminoácidos 14 a 19 (negrita cursiva)
 Tripsina madura = aminoácidos 20 a 241

- 25 De acuerdo con la invención reivindicada, el polipéptido que tiene actividad de serina proteasa es una tripsina obtenible del bacalao. El término "aminoácido" utilizado en el presente documento incluye los veinte aminoácidos estándar codificados genéticamente y sus correspondientes estereoisómeros en forma "D" (en comparación con la forma natural "L"), los omega-aminoácidos y otros aminoácidos naturales, los aminoácidos no convencionales (por ejemplo, los aminoácidos α,α -disustituidos, los aminoácidos N-alkilados, etc.) y los aminoácidos derivados químicamente (véase más adelante).

Por lo tanto, cuando se enumera específicamente un aminoácido, como "alanina" o "Ala" o "A", el término se refiere tanto a la L-alanina como a la D-alanina, a menos que se indique explícitamente lo contrario. Otros aminoácidos no convencionales también pueden ser componentes adecuados para los polipéptidos descritos en el presente documento, siempre que el polipéptido conserve la propiedad funcional deseada. Para los polipéptidos mostrados, cada residuo de aminoácido codificado, en su caso, está representado por una designación de una sola letra, correspondiente al nombre trivial del aminoácido convencional.

De acuerdo con la convención, las secuencias de aminoácidos aquí divulgadas se proporcionan en la dirección N-terminal a C-terminal.

Los polipéptidos utilizados en las composiciones de la invención consisten en L-aminoácidos.

De otro modo, se divulga que el polipéptido que tiene actividad de serina proteasa puede comprender o consistir en una secuencia de aminoácidos que comparte al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 95%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia con SEQ ID NO:1.

En una realización de la invención reivindicada, el polipéptido que tiene actividad de serina proteasa puede comprender o consistir en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1.

Sin embargo, el polipéptido puede comprender o consistir alternativamente en la secuencia de aminoácidos que es un mutante o variante de SEQ ID NO:1. Por "variante" entendemos que el polipéptido no comparte el 100% de identidad de secuencia de aminoácidos con SEQ ID NO: 1, es decir, uno o más aminoácidos de SEQ ID NO: 1 debe mutar. De otro modo, el polipéptido puede comprender o consistir en una secuencia de aminoácidos con al menos un 50% de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, más preferiblemente al menos 60%, 70% u 80% u 85% o 90% de identidad con dicha secuencia, y más preferiblemente al menos 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con dicha secuencia de aminoácidos. Así, un aminoácido en una posición específica puede ser eliminado, sustituido o puede ser el lugar de una inserción/adición de uno o más aminoácidos. Los expertos en la materia apreciarán que las sustituciones pueden ser conservadoras o no conservadoras.

El porcentaje de identidad puede determinarse, por ejemplo, mediante el programa LALIGN (Huang and Miller, Adv. Appl. Math. (1991) 12:337-357) en las instalaciones de Expasy:

(http://www.ch.embnet.org/software/LALIGN_form.html) utilizando como parámetros la opción de alineación global, matriz de puntuación BLOSUM62, penalización por hueco de apertura -14, penalización por hueco de extensión -4. Alternativamente, el porcentaje de identidad de secuencia entre dos polipéptidos puede determinarse utilizando programas informáticos adecuados, por ejemplo el programa GAP del Grupo de Computación Genética de la Universidad de Wisconsin, y se apreciará que el porcentaje de identidad se calcula en relación con los polipéptidos cuya secuencia se ha alineado óptimamente.

El alineamiento puede realizarse alternativamente utilizando el programa Clustal W (como se describe en Thompson *et al.*, 1994, Nucl. Acid Res. 22:4673-4680). Los parámetros utilizados pueden ser los siguientes:

- Parámetros de alineación rápida por pares: Tamaño de K-tupla(palabra); 1, tamaño de ventana; 5, penalización por hueco; 3, número de diagonales superiores; 5. Procedimiento de puntuación: x por ciento.
- Parámetros de alineación múltiple: penalización por apertura de hueco; 10, penalización por extensión de hueco; 0,05.
- Matriz de puntuación: BLOSUM.

Alternativamente, el programa BESTFIT puede ser utilizado para determinar alineamientos de secuencia local.

De otro modo divulgado es en el que el polipéptido que tiene actividad de serina proteasa puede ser una variante de SEQ ID NO:1, como las descritas en la Solicitud de Patente Internacional N° PCT/GB2015/051006 (Publicación N° WO 2015/150799) a Enzymatica AB.

Los expertos en la materia apreciarán que el polipéptido con actividad de serina proteasa descrito en el presente documento puede comprender o consistir alternativamente en un fragmento de cualquiera de las secuencias de aminoácidos definidas anteriormente, en el que el fragmento presenta una actividad antibacteriana.

Por "fragmento" incluimos al menos 5 aminoácidos contiguos de cualquiera de las secuencias de aminoácidos anteriores, tales como pero no limitadas a SEQ ID NO: 1 ó 2. Por ejemplo, el fragmento puede comprender al menos 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180, 200 o más aminoácidos contiguos de cualquiera de las secuencias de aminoácidos anteriores.

Los procedimientos de identificación de fragmentos de los polipéptidos de serina proteasa definidos anteriormente que conservan una actividad antimicrobiana (es decir, antibacteriana) son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, podría generarse una gama de fragmentos diferentes mediante metodologías recombinantes conocidas, utilizando los procedimientos de expresión descritos en el documento WO 2015/150799, y luego exponerlos *in vitro* a

microorganismos representativos (como cepas bacterianas, virus y/o cepas fúngicas) para determinar cuál de los fragmentos inhibe (en parte o en su totalidad) el crecimiento y/o la proliferación de dichos microorganismos.

Preferiblemente, el polipéptido con actividad de serina proteasa descrito en el presente documento comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de una serina proteasa natural. Así, el polipéptido con actividad de serina proteasa puede consistir en la secuencia de aminoácidos de una tripsina natural, de origen eucariota o procariota. Se incluyen específicamente las tripsinas adaptadas al frío, como la tripsina del bacalao del Atlántico (*Gadus morhua*), del salmón del Atlántico y del Pacífico (por ejemplo, *Salmo salar* y especies de *Oncorhynchus*) y del abadejo de Alaska (*Theragra chalcogramma*). Por ejemplo, el polipéptido que tiene actividad de serina proteasa puede comprender o consistir en el aminoácido de SEQ ID NO:1.

Tales proteasas de serina naturales pueden purificarse a partir de un organismo fuente (por ejemplo, bacalao del Atlántico) o pueden expresarse recombinantemente.

Por lo tanto, los expertos en la materia apreciarán que dichos polipéptidos de serina proteasa naturales de la invención deben proporcionarse en una forma diferente a aquella en la que se encuentran en la naturaleza. Por ejemplo, el polipéptido de la invención puede consistir en la secuencia de aminoácidos de una tripsina eucariota natural, pero carecer de las moléculas de glicosilación presentes en la proteína tal como se expresa en la naturaleza.

El componente polipeptídico puede formularse en diversas concentraciones, dependiendo de la eficacia/toxicidad de la serina proteasa que se utilice. Preferentemente, la formulación comprende el agente activo a una concentración de al menos 0,001 μM , por ejemplo al menos 0,01 μM , al menos 0,1 μM , al menos 1 μM , al menos 10 μM , al menos 100 μM , o al menos 500 μM . Convenientemente, la formulación comprende el agente activo en una concentración de hasta 1 mM, por ejemplo hasta 500 μM , hasta 100 μM , hasta 10 μM , hasta 1 μM , hasta 0,1 μM , o hasta 0,01 μM . En una realización, el polipéptido de serina proteasa está presente en la formulación a una concentración de entre 0,001 y 10 μM . Así, la formulación terapéutica puede comprender una cantidad de un polipéptido suficiente para matar o ralentizar el crecimiento de bacterias en una población de biopelículas.

En una realización de este aspecto, la actividad del polipéptido de serina proteasa (por ejemplo, tripsina de bacalao) es de 0,001 U/g a 32 U/g.

Otro componente crítico de las terapias combinadas de la invención es uno o más compuestos antibióticos.

Puede utilizarse cualquier compuesto antibiótico conocido. Por ejemplo, el uno o más compuestos antibióticos pueden seleccionarse del grupo que consiste en amoxicilina, ampicilina, azitromicina, carbapenems, cefotaxima, ceftriaxona, cefuroxima, cefalosporinas, cloranfenicol, ciprofloxacina, clindamicina, dalacina, dalfopristina, daptomicina, doxiciclina, ertapenem, eritromicina, fluoroquinolonas, meropenem, metronidazol, minociclina, moxifloxacina, nafcilina, oxacilina, penicilina, quinupristina, rifampicina, sulfametoxazol, teicoplanina, tetraciclina, trimetoprima, vancomicina, bacitracina y polimixina B, o una mezcla de los mismos.

En una realización preferente, uno o más compuestos antibióticos se seleccionan del grupo que consiste en tetraciclina, cefotaxima, vancomicina, eritromicina y oxacilina.

Los expertos en la materia apreciarán que las terapias combinadas de la invención pueden comprender un único compuesto antibiótico o múltiples compuestos antibióticos.

La concentración de los antibióticos a utilizar en las terapias combinadas de la invención dependerá del antibiótico particular a utilizar y de la indicación y/o localización de la biopelícula a tratar, de acuerdo con el conocimiento general común en la materia. Típicamente, el antibiótico se formulará a una concentración de entre el 0,1 y el 5% (en peso), por ejemplo entre el 0,1 y el 1% (en peso).

Un segundo aspecto relacionado de la invención proporciona un polipéptido que tiene actividad de serina proteasa para su uso en el tratamiento de una biopelícula bacteriana en un sujeto, en el que el polipéptido es para su uso en combinación con uno o más compuestos antibióticos. Según la invención reivindicada, el polipéptido que tiene actividad de serina proteasa es una tripsina obtenible a partir de bacalao, y dicha biopelícula comprende estreptococos.

Un tercer aspecto relacionado divulgado de otro modo en el presente documento proporciona un polipéptido que tiene actividad de serina proteasa en la preparación de un medicamento para tratar una biopelícula bacteriana en un sujeto, en el que el polipéptido es para uso en combinación con uno o más compuestos antibióticos.

Los ejemplos de polipéptidos de serina proteasa y compuestos antibióticos adecuados para su uso en relación con el segundo y tercer aspectos se detallan anteriormente.

Un cuarto aspecto divulgado en el presente documento, pero no reivindicado como tal, proporciona una composición farmacéutica que comprende (a) un polipéptido con actividad de serina proteasa y (b) uno o más compuestos antibióticos, junto con un tampón, excipiente, diluyente o portador farmacéuticamente aceptable. Las composiciones farmacéuticas de acuerdo con el cuarto aspecto se incluyen en el dispositivo médico de acuerdo con el quinto aspecto de la invención, tal como se define en las reivindicaciones.

Los ejemplos de polipéptidos de serina proteasa y compuestos antibióticos adecuados para su uso en relación con el cuarto aspecto se detallan anteriormente.

En un caso, el polipéptido que tiene actividad de serina proteasa está presente en una concentración de al menos 0,001 μM , por ejemplo al menos 0,01 μM , al menos 0,1 μM , al menos 1 μM , al menos 10 μM , al menos 100 μM , o al menos 500 μM . Convenientemente, la composición comprende el agente activo en una concentración de hasta 1 mM, por ejemplo hasta 500 μM , hasta 100 μM , hasta 10 μM , hasta 1 μM , hasta 0,1 μM , o hasta 0,01 μM . En un caso, el polipéptido de serina proteasa está presente en la composición a una concentración de entre 0,001 y 10 μM .

Cuando se utiliza tripsina obtenible a partir de bacalao, su concentración en las composiciones del cuarto aspecto es de 0,001 U/g a 32 U/g (es decir, medida como unidades de actividad por gramo de la composición final).

En un caso, uno o más compuestos antibióticos están presentes en una concentración de 0,1% a 5% en peso, por ejemplo 0,1% a 2%, 0,5% a 1,5%, y preferentemente 1%.

Las composiciones farmacéuticas pueden prepararse de una manera conocida en la técnica que sea suficientemente estable al almacenamiento y adecuada para su administración a seres humanos y animales. Por ejemplo, las composiciones terapéuticas pueden liofilizarse, por ejemplo, mediante liofilización, secado por pulverización, enfriamiento por pulverización, o mediante el uso de la formación de partículas a partir de la formación de partículas supercríticas.

Por "farmacéuticamente aceptable" se entiende un material no tóxico que no disminuye la eficacia de la actividad de la tripsina del polipéptido de la invención. Dichos tampones, soportes o excipientes farmacéuticamente aceptables son bien conocidos en la técnica (véase Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª edición, A.R. Gennaro, Ed., Mack Publishing Company (1990) y Handbook of Pharmaceutical Excipients, 3ª edición, A. Kibbe, Ed., Pharmaceutical Press (2000)).

Se entiende por "tampón" una solución acuosa que contiene una mezcla ácido-base con el fin de estabilizar el pH. Ejemplos de tampones son Trizma, Bicina, Tricina, MOPS, MOPSO, MOBS, Tris, Hepes, HEPBS, MES, fosfato, carbonato, acetato, citrato, glicolato, lactato, borato, ACES, ADA, tartrato, AMP, AMPD, AMPSO, BES, CABS, cacodilato, CHES, DIPSO, EPPS, etanolamina, glicina, HEPPSO, imidazol, ácido imidazolelático, PIPES, SSC, SSPE, POPSO, TAPS, TABS, TAPSO y TES.

Por "diluyente" se entiende una solución acuosa o no acuosa destinada a diluir el péptido en la preparación terapéutica. El diluyente puede ser uno o más de solución salina, agua, polietilenglicol, propilenglicol, etanol o aceites (como aceite de cártamo, aceite de maíz, aceite de cacahuete, aceite de semilla de algodón o aceite de sésamo).

El "excipiente" puede ser uno o más de los hidratos de carbono, polímeros, lípidos y minerales. Algunos ejemplos de hidratos de carbono son la lactosa, la glucosa, la sacarosa, el manitol y las ciclodextrinas, que se añaden a la composición, por ejemplo, para facilitar la liofilización. Ejemplos de polímeros son el almidón, los éteres de celulosa, la carboximetilcelulosa, la hidroxipropilmetilcelulosa, la hidroxietilcelulosa, la etilhidroxietilcelulosa, los alginatos, los carageenos, el ácido hialurónico y sus derivados, el ácido poliacrílico, el polisulfonato, polietilenglicol/óxido de polietileno, copolímeros de óxido de polietileno/óxido de polipropileno, polivinilalcohol/polivinilacetato de diferente grado de hidrólisis, y polivinilpirrolidona, todos ellos de diferente peso molecular, que se añaden a la composición, p. ej.g., para controlar la viscosidad, lograr la bioadhesión o proteger el lípido de la degradación química y proteolítica. Ejemplos de lípidos son los ácidos grasos, los fosfolípidos, los mono-, di- y triglicéridos, las ceramidas, los esfingolípidos y los glicolípidos, todos ellos de diferente longitud de cadena acil y saturación, la lecitina de huevo, la lecitina de soja, el huevo hidrogenado y la lecitina de soja, que se añaden a la composición por razones similares a las de los polímeros. Ejemplos de minerales son el talco, el óxido de magnesio, el óxido de zinc y el óxido de titanio, que se añaden a la composición para obtener beneficios como la reducción de la acumulación de líquido o propiedades pigmentarias ventajosas.

En un caso, el polipéptido puede suministrarse junto con un estabilizador, como el cloruro de calcio.

También pueden incluirse en las composiciones del cuarto aspecto absorbentes ultravioletas (p. ej. N,N-dimetil éster octílico de PABA, octil metil cinamato, butil metoxidibenzoilmetano, ácido di-p-metoxicinámico-mono-2-etil hexanoico glicerílico, 2-hidroxi-4-metoxi benzofenona, 2-hidroxi-4-metoxi benzofenona-5-sulfonato sódico), alcoholes inferiores (por ej. alcohol etílico, alcohol isopropílico), conservantes (por ejemplo, metilparabeno, etilparabeno, propilparabeno, butilparabeno, fenoxietanol), bactericidas (por ejemplo, clorhexidina, clorhidrato, triclorocarbanilida, triclosán, piritona de cinc), plata (por ejemplo, plata elemental, óxido de plata, nitrato de plata, sulfadiazina de plata, nanopartículas de plata), colorantes (por ejemplo, tintes, pigmentos), p. ej. tintes, pigmentos), aromatizantes (p. ej. mentol, alcanfor, timol, eucaliptol), polvos, perfumes (p. ej. aceites esenciales, perfume de origen animal, perfume sintético), vitaminas (p. ej. vitamina A y sus derivados, vitamina E y sus derivados, vitamina C y sus derivados, ácido pantoténico, vitamina H, vitamina B y sus derivados), urea, polímeros hidrosolubles (p. ej. p. ej., alcohol polivinílico, polivinilpirrolidona, polímero carboxilvinílico, goma xantana, ácido hialurónico), agentes tampón (p. ej., glutamato sódico, arginina, ácido aspártico, ácido cítrico, citrato sódico, ácido láctico, lactato sódico), medicamentos antibióticos, antifúngicos, antivirales y antiparasitarios.

Los polipéptidos con actividad de serina proteasa pueden formularse en cualquier tipo de composición terapéutica conocida en la técnica por ser adecuada para la administración de agentes polipeptídicos.

En un caso, el polipéptido y el (los) compuesto(s) antibiótico(s) pueden disolverse simplemente en agua, solución salina, polietilenglicol, propilenglicol, etanol o aceites (como aceite de cártamo, aceite de maíz, aceite de cacahuete, aceite de semilla de algodón o aceite de sésamo), goma tragacanto y/o diversos tampones. Por ejemplo, cuando el polipéptido se formula para administración oral (como en un *spray* bucal), la composición terapéutica puede comprender el polipéptido disuelto en agua, glicerol y mentol. Un ejemplo de aerosol bucal se comercializa en Escandinavia con el nombre de ColdZyme® (Enzymatica AB, Lund, Suecia).

Preferiblemente, la presente divulgación proporciona un polipéptido de proteasa y compuesto(s) antibiótico(s) como se ha descrito anteriormente en una solución osmóticamente activa. Por ejemplo, el polipéptido y el compuesto o compuestos antibióticos pueden formularse en glicerol o glicerina. Sin querer ceñirnos a la teoría, se cree que dichas soluciones osmóticamente activas facilitan el movimiento del fluido desde el interior de las células microbianas hacia el medio extracelular. A su vez, se cree que esto facilita el efecto terapéutico de los polipéptidos aquí descritos al crear una barrera fina y activa que inhibe (al menos, en parte) la captación de células microbianas como bacterias y virus por parte de las células epiteliales del huésped, por ejemplo, de la orofaringe.

En otro caso, las composiciones terapéuticas aquí descritas pueden presentarse en forma de liposoma, en el que el polipéptido y el compuesto o compuestos antibióticos se combinan, además de otros portadores farmacéuticamente aceptables, con agentes anfipáticos como lípidos, que existen en formas agregadas como micelas, monocapas insolubles y cristales líquidos. Los lípidos adecuados para la formulación liposomal incluyen, sin limitación, monoglicéridos, diglicéridos, sulfátidos, lisolecitina, fosfolípidos, saponina, ácidos biliares y similares. Los lípidos adecuados también incluyen los lípidos anteriores modificados por polietilenglicol en el grupo de cabeza polar para prolongar el tiempo de circulación del torrente sanguíneo. La preparación de tales formulaciones liposomales puede encontrarse, por ejemplo, en el documento US 4.235.871.

Las composiciones terapéuticas aquí descritas también pueden presentarse en forma de microesferas biodegradables. Los poliésteres alifáticos, como el poli(ácido láctico) (PLA), el poli(ácido glicólico) (PGA), los copolímeros de PLA y PGA (PLGA) o el poli(caprolactona) (PCL), y los polianhídridos se han utilizado ampliamente como polímeros biodegradables en la producción de microesferas. Se pueden encontrar preparaciones de tales microesferas en US 5.851.451 y en EP 0 213 303.

En otro caso, las composiciones terapéuticas descritas en el presente documento se proporcionan en forma de geles poliméricos, en los que polímeros como almidón, éteres de celulosa, carboximetilcelulosa de celulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, hidroxietilcelulosa, etilhidroxietilcelulosa, alginatos, carageenanos, ácido hialurónico y sus derivados, ácido poliacrílico, imidazol polivinílico, polisulfonato, polietilenglicol/óxido de polietileno, copolímeros de óxido de polietileno/óxido de polipropileno, alcohol polivinílico/acetato de polivinilo de diferente grado de hidrólisis, y polivinilpirrolidona se utilizan para espesar la solución que contiene el péptido. Los polímeros también pueden contener gelatina o colágeno.

Se apreciará que las composiciones terapéuticas aquí descritas pueden incluir iones y un pH definido para potenciar la acción de los polipéptidos. Además, las composiciones pueden someterse a operaciones terapéuticas convencionales como la esterilización y/o pueden contener adyuvantes convencionales como conservantes, estabilizantes, humectantes, emulsionantes, tampones, cargas, etc.

En un caso preferido, la composición terapéutica comprende el polipéptido y compuesto(s) antibiótico(s) en un tampón Tris o fosfato, junto con uno o más de EDTA, xilitol, sorbitol, propilenglicol y glicerol.

Las composiciones terapéuticas aquí descritas pueden administrarse por cualquier vía adecuada conocida por los expertos en la materia. Así, las posibles vías de administración incluyen la inhalatoria, bucal, parenteral (intravenosa, subcutánea, intratecal e intramuscular), tópica, ocular, nasal, pulmonar, parenteral, vaginal y rectal. También es posible la administración a partir de implantes.

Alternativamente, las composiciones terapéuticas pueden administrarse por vía parenteral, por ejemplo, por vía intravenosa, intracerebroventricular, intraarticular, intraarterial, intraperitoneal, intratecal, intraventricular, intraesternal, intracraneal, intramuscular o subcutánea, o pueden administrarse mediante técnicas de infusión. Se utilizan convenientemente en forma de solución acuosa estéril que puede contener otras sustancias, por ejemplo, suficientes sales o glucosa para que la solución sea isotónica con la sangre. Las soluciones acuosas deben estar convenientemente tamponadas (preferiblemente a un pH de 3 a 9), si es necesario. La preparación de formulaciones parenterales adecuadas en condiciones estériles se realiza fácilmente mediante técnicas farmacéuticas estándar bien conocidas por los expertos en la materia.

Las formulaciones adecuadas para la administración parenteral incluyen soluciones de inyección estériles acuosas y no acuosas que pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostáticos y solutos que hacen que la formulación sea isotónica con la sangre del receptor previsto; y suspensiones estériles acuosas y no acuosas que pueden incluir agentes de suspensión y espesantes. Las formulaciones pueden presentarse en envases unidos o multidosis, por ejemplo ampollas y viales sellados, y pueden almacenarse liofilizadas, requiriendo únicamente la adición del portador

líquido estéril, por ejemplo agua para inyectables, inmediatamente antes de su uso. Las soluciones y suspensiones inyectables extemporáneas pueden prepararse a partir de polvos, gránulos y comprimidos estériles del tipo descrito anteriormente.

Alternativamente, las composiciones terapéuticas pueden administrarse por vía intranasal o por inhalación (por ejemplo, en forma de presentación en aerosol a partir de un recipiente presurizado, bomba, pulverizador o nebulizador con el uso de un propulsor adecuado, como diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, un hidrofluoroalcano como 1,1,1,2-tetrafluoroetano (HFA 134A3 o 1,1,2,3,3,3-heptafluoropropano (HFA 227EA3), dióxido de carbono u otro gas adecuado). En el caso de un aerosol presurizado, la unidad de dosificación puede determinarse proporcionando una válvula para suministrar una cantidad dosificada. El recipiente presurizado, la bomba, el pulverizador o el nebulizador pueden contener una solución o suspensión del polipéptido activo, por ejemplo utilizando una mezcla de etanol y el propulsor como disolvente, que puede contener además un lubricante, por ejemplo trioleato de sorbitán. Las cápsulas y cartuchos (hechos, por ejemplo, de gelatina) para su uso en un inhalador o insuflador pueden formularse para contener una mezcla en polvo de un compuesto de la invención y una base en polvo adecuada, como lactosa o almidón.

Ventajosamente, el polipéptido se proporciona en una forma adecuada para su administración a la mucosa del tracto respiratorio.

Un quinto aspecto de la invención proporciona un dispositivo médico para administrar a un sujeto una cantidad eficaz de una terapia combinada según el primer aspecto de la invención, comprendiendo el dispositivo un depósito de una composición farmacéutica según el cuarto aspecto y medios para liberar dicha composición desde el dispositivo, tal como se define en las reivindicaciones anexas.

Por ejemplo, el dispositivo puede ser un aerosol bucal o nasal adecuado para administrar una terapia combinada según el primer aspecto de la invención a la mucosa del tracto respiratorio.

En una realización, la invención proporciona un dispositivo médico implantable que está impregnado, recubierto o tratado de otro modo con una composición como la descrita en el presente documento.

Por ejemplo, el dispositivo médico puede ser un dispositivo médico implantable seleccionado del grupo que consiste en dispositivos intravasculares, catéteres, derivaciones, tubos de intubación y traqueotomía, dispositivos oftálmicos, prótesis articulares, válvulas cardíacas artificiales e implantes mamarios. Por "dispositivo implantable" se entienden los dispositivos fijados a una superficie interna o externa del cuerpo, por ejemplo, lentes de contacto.

Preferiblemente, el dispositivo médico implantable se envasa en un recipiente sellado y estéril antes de su uso.

Un sexto aspecto de la invención proporciona un procedimiento para matar, inhibir o prevenir el crecimiento de una biopelícula bacteriana *in vitro*, comprendiendo el procedimiento exponer la biopelícula (o superficie sobre la que se quiere prevenir el crecimiento de la biopelícula) a una terapia combinada según el primer aspecto de la invención. Según la invención reivindicada, dicha biopelícula comprende estreptococos.

Por ejemplo, las composiciones descritas anteriormente también pueden utilizarse en forma de solución o lavado esterilizante para evitar el crecimiento de biopelículas microbianas en una superficie o sustrato, como en un entorno doméstico (por ejemplo, superficies de trabajo de cocina, duchas, tuberías, suelos, *etc.*) o un entorno comercial o industrial (por ejemplo, dentro de sistemas de refrigeración, tuberías, superficies de suelos, *etc.*).

Dichas soluciones de lavado pueden comprender además un agente tensioactivo o surfactante. Los tensioactivos adecuados incluyen tensioactivos aniónicos (por ejemplo, un sulfonato alifático), tensioactivos anfóteros y/o zwitteriónicos (por ejemplo, derivados de compuestos alifáticos de amonio cuaternario, fosfonio y sulfonio) y tensioactivos no iónicos (por ejemplo, alcoholes alifáticos, ácidos, amidas o alquilfenoles con óxidos de alquileño). Convenientemente, el agente tensioactivo está presente en una concentración de 0,5 a 5 por ciento en peso.

Tanto en usos *in vitro* como *in vivo*, las composiciones de la invención se exponen preferentemente a la superficie diana durante al menos cinco minutos. Por ejemplo, el tiempo de exposición puede ser de al menos 10 minutos, 20 minutos, 30 minutos, 40 minutos, 50 minutos, 1 hora, 2 horas, 3 horas, 5 horas, 12 horas y 24 horas.

La siguiente serie de dibujos forma parte de la presente memoria descriptiva y se incluye para demostrar ciertos aspectos de la presente invención. La invención puede entenderse mejor por referencia a esto en combinación con la descripción detallada de las realizaciones específicas presentadas en este documento.

Figura 1 Efectos de las combinaciones de tripsinas de bacalao con antibióticos seleccionados sobre la dispersión de la biopelícula

Efectos de la combinación de tripsinas de bacalao con antibióticos seleccionados sobre la dispersión de biopelículas. La figura muestra que la combinación de tripsinas de bacalao y antibióticos seleccionados puede ser más eficaz para alterar las biopelículas que cualquiera de los dos por separado. Se cultivaron biopelículas con una combinación de *Streptococcus pneumoniae* y *Streptococcus mitis* en una placa de microtitulación y se utilizaron como modelo de

biopelícula. La biopelícula se trató con un antibiótico o con una combinación de antibióticos y tripsinas de bacalao. Las biopelículas se tiñeron con cristal violeta y luego se disolvieron con ácido acético. La formación de biopelícula se midió como absorbancia a 492 nm, y se normalizó con respecto a la biopelícula no tratada. Basándose en el estudio, se puede concluir que ciertos antibióticos, en este caso la tetraciclina, la eritromicina, la oxacilina y la cefotaxima, y las combinaciones de tripsina de bacalao son más eficaces para alterar la biopelícula bacteriana que los antibióticos por sí solos. Sin embargo, se demostró que la vancomicina no tenía una eficacia significativamente mayor contra la biopelícula modelo cuando se combinaba con tripsina. Los valores P sobre las barras indican la significación de la diferencia entre los dos tratamientos, evaluada mediante la prueba t de Student.

Figura 2 Efectos de la combinación de tripsinas de bacalao con antibióticos seleccionados sobre la dispersión de la biopelícula.

Efectos de la combinación de tripsinas de bacalao con antibióticos seleccionados sobre la dispersión de biopelículas. La figura muestra que la combinación de tripsinas de bacalao con tetraciclina o cefotaxima puede ser más eficaz para alterar las biopelículas que cualquiera de ellas por separado. Se cultivaron biopelículas con una combinación de *Streptococcus pneumoniae* y *Streptococcus mitis* en una placa de microtitulación y se utilizaron como biopelícula modelo. La biopelícula se trató con tripsinas de bacalao, un antibiótico o una combinación de ambos. Las biopelículas se tiñeron con cristal violeta y luego se disolvieron con ácido acético. La formación de biopelícula se midió como absorbancia a 492 nm, y se normalizó con respecto a la biopelícula no tratada. Basándose en el estudio, puede concluirse que, para este modelo, la combinación de tripsina de bacalao y el antibiótico tetraciclina o cefotaxima es más eficaz para alterar la biopelícula bacteriana que la tripsina de bacalao o los antibióticos por separado. Los valores P sobre las barras indican la significación de los efectos evaluados mediante el análisis ANOVA.

Figura 3 Efectos de la combinación de tripsinas de bacalao con antibióticos seleccionados sobre la dispersión de la biopelícula

Efectos de la combinación de tripsinas de bacalao con antibióticos seleccionados sobre la dispersión de biopelículas. La imagen es una clara demostración visual de que la combinación de tripsinas de bacalao y antibióticos seleccionados puede ser más eficaz para alterar las biopelículas que cualquiera de los dos por separado. Se cultivaron biopelículas con una combinación de *Streptococcus pneumoniae* y *Streptococcus mitis* en una placa de microtitulación. La biopelícula se trató con tripsinas de bacalao, un antibiótico o una combinación de ambos. A continuación, las biopelículas se tiñeron con cristal violeta. Basándose en el estudio, puede concluirse que las combinaciones de tripsinas de bacalao y antibióticos son más eficaces para alterar la biopelícula bacteriana que los antibióticos por sí solos. Como se demostró con la Vancomicina, el tratamiento de las biopelículas con antibióticos puede aumentar la formación de biopelículas, cuyos efectos se ven contrarrestados por la presencia de tripsina de bacalao, como se evidencia en las columnas 7 y 8.

La imagen muestra una placa de 96 pocillos en la que se cultivaron biopelículas compuestas por *Streptococcus pneumoniae* y *Streptococcus mitis* durante 4 horas, seguidas de tratamiento con tripsina de bacalao (ct), antibiótico, o combinación de tripsina de bacalao/antibiótico. Cada columna representa un tipo de tratamiento o combinación de tratamientos, y las filas representan concentraciones decrecientes de arriba abajo. Tras el tratamiento, las biopelículas se tiñen con cristal violeta; un color más oscuro representa más biopelícula remanente. La imagen demuestra que las combinaciones de antibióticos y tripsina de bacalao pueden ser más eficaces que cualquiera de las dos entidades por separado. Esto es especialmente profundo en el caso de la vancomicina, donde el fármaco por sí solo parece aumentar la formación de biopelículas, mientras que en combinación con la tripsina de bacalao la vancomicina puede aumentar la eficacia de la tripsina de bacalao. La fila inferior representa espacios en blanco, donde los seis primeros agujeros representan biopelícula sin tratar y los seis siguientes representan sin biopelícula. La tabla de la izquierda muestra las concentraciones de tripsina de bacalao y antibióticos utilizadas en cada fila/dilución.

La imagen muestra cómo la tripsina aumenta la eficacia de ciertos antibióticos, presumiblemente al romper la biopelícula y permitir así el acceso de los antibióticos a las bacterias.

Figura 4 Efectos de las tripsinas de bacalao en la super biopelícula presentados visualmente tras la tinción de la biopelícula con cristal violeta.

Efectos de las tripsinas de bacalao sobre la super biopelícula presentados visualmente tras la tinción de la biopelícula con cristal violeta. La figura muestra que las tripsinas de bacalao interrumpen la super biopelícula de una manera dependiente de la concentración como se ve por los pocillos claros que indican la ausencia de biopelícula. La super biopelícula con una combinación de *Streptococcus pneumoniae* y *Streptococcus mitis* se cultivó en una placa de microtitulación. La biopelícula se trató con tripsinas de bacalao o placebo durante 2 minutos y los pocillos se tiñeron para medir la presencia (pocillos negros) de biopelícula o su ausencia (pocillos claros) tras el tratamiento. Basándose en el estudio, puede concluirse que las tripsinas de bacalao son muy eficaces para desintegrar la super biopelícula.

La imagen fotográfica muestra una placa de 96 pocillos en la que se cultivaron biopelículas compuestas de *Streptococcus pneumoniae* y *Streptococcus mitis* durante 4 horas, seguidas de tratamiento con tripsina de bacalao o placebo. Cada columna representa una concentración, con las tres primeras filas representando réplicas del tratamiento con tripsina de bacalao y las tres filas inferiores muestran réplicas de la formulación sin tripsina de bacalao.

en la misma dilución. Tras el tratamiento, las biopelículas se tiñeron con cristal violeta; un color más oscuro representaba más biopelícula remanente. La imagen demuestra que la tripsina de bacalao puede ser eficaz para eliminar las biopelículas en la concentración más alta, pero puede requerir factores adicionales en las concentraciones más bajas.

5 **Figura 5 Efectos de las tripsinas de bacalao en la super biopelícula**

Efectos de las tripsinas de bacalao sobre la super biopelícula, medidos por espectrofotometría tras tinción con cristal violeta y disolución en ácido acético. La figura muestra que las tripsinas de bacalao alteran la super biopelícula en función de la concentración. Se cultivaron biopelículas con una combinación de *Streptococcus pneumoniae* y *Streptococcus mitis* en una placa de microtitulación. La biopelícula se trató con tripsinas de bacalao o placebo y los pocillos se tiñeron con cristal violeta seguido de disolución con ácido acético. La formación de biopelícula se midió como absorbancia a 492 nm, y se normalizó con respecto a la biopelícula no tratada. Basándose en el estudio, puede concluirse que las tripsinas de bacalao son muy eficaces para alterar la biopelícula bacteriana. Los datos se presentan en forma de diagrama de barras con las barras de error indicando el error estándar de la media (SEM). Los datos de las diluciones de biopelículas bacterianas tratadas con placebo y tripsinas de bacalao se colocan uno junto al otro. La reducción logarítmica de la formación de biopelículas de Penzyme comparada con la de placebo en la misma dilución está por encima de las barras, al igual que el nivel de significación indicado por los asteriscos (*), donde * representa una P de < 0,05, ** una P < 0,01 y *** una P < 0,001. Para calcular la significación se utilizó la prueba T de Student.

Figura 6. Reducción logarítmica de la super biopelícula por tripsinas de bacalao a diferentes concentraciones.

Reducción logarítmica de la super biopelícula por tripsinas de bacalao a diferentes concentraciones. La figura muestra que las tripsinas de bacalao alteran la superpelícula en función de la concentración. Se cultivaron biopelículas con una combinación de *Streptococcus pneumoniae* y *Streptococcus mitis* en una placa de microtitulación. La biopelícula se trató con tripsinas de bacalao o placebo y los pocillos se tiñeron con cristal violeta seguido de disolución con ácido acético. La formación de biopelícula se midió como absorbancia a 492 nm, y la reducción comparada con la biopelícula tratada con placebo en una escala logarítmica. Basándose en el estudio, se puede concluir que las tripsinas de bacalao son muy eficaces para alterar la biopelícula bacteriana a concentraciones de 8 U/g o superiores, en menos de 2 minutos, donde una reducción logarítmica de 3 representa una eliminación del 99,9% de la biopelícula y una reducción logarítmica de 4 es una reducción del 99,99% de la biopelícula.

Figura 7 Efectos del pretratamiento con tripsinas de bacalao en la formación de biopelículas.

Efectos del pretratamiento con tripsinas de bacalao en la formación de biopelículas. La figura muestra que el pretratamiento de las bacterias formadoras de biopelículas *Streptococcus pneumoniae* y *Streptococcus mitis* con tripsina de bacalao antes de la incubación a 37°C en una placa de microtitulación de 96 pocillos tiene un efecto dependiente de la concentración sobre su capacidad de formar biopelículas. Se cultivaron biopelículas con una combinación de *Streptococcus pneumoniae* y *Streptococcus mitis* en una placa de microtitulación después de tratarlas brevemente con tripsinas de bacalao o placebo. Tras dejar crecer las biopelículas durante 4 horas, los pocillos se tiñeron con cristal violeta y se disolvieron con ácido acético. La formación de biopelícula se midió como absorbancia a 492 nm, y se normalizó con respecto a la biopelícula no tratada. Basándose en el estudio, puede concluirse que las tripsinas de bacalao son muy eficaces para prevenir la formación de biopelículas bacterianas. Los datos se presentan en forma de diagrama de caja en el que la parte superior del rectángulo indica el tercer cuartil, una línea horizontal cerca del centro del rectángulo indica la mediana y la parte inferior del rectángulo indica el primer cuartil. Una línea vertical se extiende desde la parte superior del rectángulo para indicar el valor máximo, y otra línea vertical se extiende desde la parte inferior del rectángulo para indicar el valor mínimo.

Figura 8 Efectos del pretratamiento con tripsina de bacalao en la formación de biopelículas

Efectos del pretratamiento con tripsina de bacalao en la formación de biopelículas. La figura muestra que la tripsina de bacalao puede prevenir la formación de biopelículas de una manera dependiente de la concentración cuando las bacterias planctónicas son tratadas con tripsina antes de que se les permita formar la biopelícula. Se cultivaron biopelículas con una combinación de *Streptococcus pneumoniae* y *Streptococcus mitis* en una placa de microtitulación tras ser tratadas con tripsinas de bacalao o placebo. Tras dejar crecer las biopelículas durante 4 horas, los pocillos se tiñeron con cristal violeta y se disolvieron con ácido acético. La formación de biopelícula se midió como absorbancia a 492 nm, y se normalizó con respecto a la biopelícula no tratada. Basándose en el estudio, puede concluirse que las tripsinas de bacalao son muy eficaces para prevenir la formación de biopelículas bacterianas. La significación estadística de la diferencia, evaluada mediante la prueba t de Student, se indica mediante símbolos encima de las casillas donde n.s. es $p > 0,05$, * es $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$.

Ejemplos

55 Ejemplo 1: Inhibición de la adhesión de *Pneumococcus* y *S. mitis* por una composición de tripsina de bacalao

Como se demuestra en la Figura 1 y la Figura 2, se cultivaron biopelículas con una combinación de *Streptococcus pneumoniae* y *Streptococcus mitis* en una placa de microtitulación después de ser tratadas con tripsinas de bacalao o

placebo. Tras dejar crecer las biopelículas durante 4 horas, los pocillos se tiñeron con cristal violeta y se disolvieron con ácido acético. La formación de biopelícula se midió como absorbancia a 492 nm, y se normalizó con respecto a la biopelícula no tratada. Basándose en el estudio, se concluye que la composición de tripsina de bacalao fue muy eficaz para prevenir la formación de biopelículas bacterianas. El tratamiento de las bacterias con una composición de tripsina de bacalao antes de la formación de la biopelícula mostró un efecto dependiente de la concentración sobre la formación de la biopelícula *in vitro*. Las tripsinas de bacalao impiden la formación de biopelículas de forma dependiente de la concentración. Se cultivaron biopelículas con una combinación de *Streptococcus pneumoniae* y *Streptococcus mitis* en una placa de microtitulación tras ser tratadas con tripsinas de bacalao o placebo. Tras dejar crecer las biopelículas durante 4 horas, los pocillos se tiñeron con cristal violeta y se disolvieron con ácido acético. La formación de biopelícula se midió como absorbancia a 492 nm, y se normalizó con respecto a la biopelícula no tratada. Basándose en el estudio, puede concluirse que las tripsinas de bacalao son muy eficaces para prevenir la formación de biopelículas bacterianas. Los datos se presentan en forma de diagrama de caja en el que la parte superior del rectángulo indica el tercer cuartil, una línea horizontal cerca del centro del rectángulo indica la mediana y la parte inferior del rectángulo indica el primer cuartil. Una línea vertical se extiende desde la parte superior del rectángulo para indicar el valor máximo, y otra línea vertical se extiende desde la parte inferior del rectángulo para indicar el valor mínimo. Los datos de las bacterias tratadas con placebo y tripsina de bacalao se colocan en el mismo gráfico. La superposición de las cajas indicaría que no hay diferencias en la formación de biopelículas. La significación estadística de la diferencia, evaluada mediante la prueba t de Student, se indica mediante símbolos encima de las casillas donde n.s. es $p > 0,05$, * es $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$. Los resultados se presentan en las figuras 1 y 2.

Las Figuras 4, 5, 6, 7, y 8 demuestran que las tripsinas de bacalao son bastante capaces tanto de eliminar bacterias de las superficies como de prevenir parcialmente la reimplantación de bacterias a las mismas de una manera dependiente de la concentración. Sin embargo, esto por sí solo puede no ser suficiente para erradicar por completo las infecciones bacterianas, ya que la tripsina del bacalao no es letal para las bacterias.

Ejemplo 2: Combinación de tripsina de bacalao y antibióticos para una disrupción de la super biopelícula por dichas composiciones de tripsina

Se cultivaron biopelículas con una combinación de *Streptococcus pneumoniae* y *Streptococcus mitis* en una placa de microtitulación. La biopelícula se trató con un antibiótico o con una combinación de antibióticos y tripsinas de bacalao. Las biopelículas se tiñeron con cristal violeta y luego se disolvieron con ácido acético. La formación de biopelícula se midió como absorbancia a 492 nm, y se normalizó con respecto a la biopelícula no tratada. Se llegó a la conclusión de que las combinaciones de tripsinas de bacalao y antibióticos eran más eficaces para alterar la biopelícula bacteriana que los antibióticos solos (véase la figura 3). Los valores P sobre las barras indican la significación de la diferencia entre los dos tratamientos, evaluada mediante la prueba t de Student. El uso de antibióticos seleccionados en combinación con el tratamiento con tripsinas de bacalao mostró que el uso de tripsinas de bacalao potenciaba significativamente los efectos de los antibióticos en 4 de los 5 fármacos probados, como se observa en la Figura 1. Los datos de la Figura 2 proporcionan resultados en los que las biopelículas se tiñeron con cristal violeta seguido de disolución con ácido acético. La formación de biopelícula se midió como absorbancia a 492 nm, y se normalizó con respecto a la biopelícula no tratada. Los valores P sobre las barras indican la significación de los efectos evaluados mediante el análisis ANOVA. Los datos demuestran que el uso local combinatorio de tripsinas de bacalao con tratamiento antibiótico mejoró la disrupción de la biopelícula en comparación con los antibióticos solos. Se descubrió por casualidad que la combinación de tripsina de bacalao con antibióticos mejoraba la alteración de la biopelícula por los antibióticos. La adición de tripsina de bacalao permite el uso de concentraciones más bajas de antibióticos en el tratamiento de las infecciones por biopelículas. La figura 3 muestra los efectos de la combinación de tripsinas de bacalao con antibióticos seleccionados sobre la dispersión de la biopelícula. La imagen es una clara demostración visual de que la combinación de tripsinas de bacalao y antibióticos seleccionados es más eficaz para alterar las biopelículas que cualquiera de los dos por separado. Se cultivaron biopelículas con una combinación de *Streptococcus pneumoniae* y *Streptococcus mitis* en una placa de microtitulación. La biopelícula se trató con tripsinas de bacalao, un antibiótico o una combinación de ambos. A continuación, las biopelículas se tiñeron con cristal violeta. Basándose en el estudio, puede concluirse que las combinaciones de tripsinas de bacalao y antibióticos son más eficaces para alterar la biopelícula bacteriana que los antibióticos por sí solos.

Referencias

- Augustin, M., T. Ali-Vehmas, y F. Atroshi, 2004, Assessment of enzymatic cleaning agents and disinfectants against bacterial biofilms: Revista de Farmacia y Ciencias Farmacéuticas, v. 7, p. 55-64.
- Bjarnason, J. B., 2000, Fish serine proteases and their pharmaceutical and cosmetic use. Patente: PCT, WO 00/78332 A2.
- Gudmundsdottir, A., H. Hilmarsson, y B. Stefansson, 2013, Potential Use of Atlantic Cod Trypsin in Biomedicine: Investigación Biomédica Internacional.
- Stefansson, B., L. Helgadóttir, S. Olafsdóttir, A. Gudmundsdóttir, and J. B. Bjarnason, 2010, Characterization of cold-adapted Atlantic cod (*Gadus morhua*) trypsin I - Kinetic parameters, autolysis and thermal stability: Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology, v. 155, p. 186-194.

REIVINDICACIONES

1. Una composición terapéutica combinada para su uso en el tratamiento de una biopelícula bacteriana en un sujeto que comprende (a) un polipéptido que tiene actividad de serina proteasa y (b) uno o más compuestos antibióticos, en la que el polipéptido que tiene actividad de serina proteasa es una tripsina obtenible a partir de bacalao, y en la que dicha biopelícula comprende estreptococos.
2. Un polipéptido con actividad de serina proteasa para su uso en el tratamiento de una biopelícula bacteriana en un sujeto en combinación con uno o más compuestos antibióticos, en el que el polipéptido con actividad de serina proteasa es una tripsina obtenible a partir de bacalao, y en el que dicha biopelícula comprende estreptococos.
3. Una composición terapéutica combinada para su uso según la reivindicación 1 o un polipéptido para su uso según la reivindicación 2, en el que el sujeto es un ser humano.
4. Una composición terapéutica combinada para su uso según la reivindicación 1 o 3 o un polipéptido para su uso según la reivindicación 2 o 3, en el que la biopelícula está localizada en el tracto respiratorio superior y/o inferior.
5. Una composición terapéutica combinada para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1, 3 y 4, o un polipéptido para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 2-4, en el que dichos estreptococos se seleccionan independientemente entre *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguinis*, y cualquier mezcla de los mismos.
6. Una composición terapéutica combinada para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1, 3-5, o un polipéptido para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 2-5, en el que dicha biopelícula consiste en estreptococos.
7. Una composición terapéutica combinada para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1, 3-6, o un polipéptido para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 2-6, en el que el bacalao es bacalao del Atlántico.
8. Una composición terapéutica combinada o polipéptido para uso según la reivindicación 7, en el que la tripsina es tripsina I.
9. Una composición terapéutica combinada según una cualquiera de las reivindicaciones 1, 3-8, o un polipéptido según una cualquiera de las reivindicaciones 2-8, en el que el polipéptido que tiene actividad de serina proteasa comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1:
- IVGGYECTKHSQAHQVSLNSGYHFCGGLVSKDWVVSAAHCYKSVLRVRLGEHHIRVNEG
TEQYISSSSVIRHPNYSSYNINNDIMLIKLTTPATLNQYVHAVALPTECAADATMCTVSGWG
NTMSSVADGDKLQCLSLPILSHADCANSYPMITQSMFCAGYLEGGKDSCQGDSSGPPVVC
NGVLQGVVSWGYGCAERDHPGVYAKVCVLSGWVRDTMANY
- [SEQ ID NO: 1].
10. Una composición terapéutica combinada para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1, 3-9, o un polipéptido para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 2-9, en el que el uno o más compuestos antibióticos es/son seleccionado/s del grupo que consiste en amoxicilina, ampicilina, azitromicina, carbapenems, cefotaxima, ceftriaxona, cefuroxima, cefalosporinas, cloranfenicol, ciprofloxacina, clindamicina, dalacina, dalfopristina, daptomicina, doxiciclina, ertapenem, eritromicina, fluoroquinolonas, meropenem, metronidazol, minociclina, moxifloxacina, nafcilina, oxacilina, penicilina, quinupristina, rifampicina, sulfametoxazol, teicoplanina, tetraciclina, trimetoprima, vancomicina, bacitracina y polimixina B, o una mezcla de los mismos.
11. Una composición terapéutica combinada o polipéptido para uso según la reivindicación 10, en el que uno o más compuestos antibióticos se seleccionan del grupo que consiste en tetraciclina, cefotaxima, vancomicina, eritromicina y oxacilina.
12. Un dispositivo médico para administrar a un sujeto una cantidad eficaz de una composición terapéutica combinada según una cualquiera de las reivindicaciones 1, 3-11, comprendiendo el dispositivo un depósito de una composición farmacéutica y medios para liberar dicha composición del dispositivo, en el que la composición farmacéutica comprende (a) un polipéptido con actividad de serina proteasa y (b) uno o más compuestos antibióticos, junto con un tampón, excipiente, diluyente o soporte farmacéuticamente aceptable, en el que el polipéptido con actividad de serina proteasa es una tripsina obtenible a partir de bacalao.
13. Un dispositivo médico según la reivindicación 12, en el que el dispositivo es un aerosol bucal o nasal.
14. Un procedimiento para matar, inhibir o prevenir el crecimiento de una biopelícula bacteriana *in vitro*, comprendiendo el procedimiento exponer la biopelícula, o la superficie sobre la que se quiere prevenir el crecimiento de la biopelícula, a una terapia combinada según una cualquiera de las reivindicaciones 1, 3-10, en el que dicha biopelícula comprende estreptococos.

Figura 1

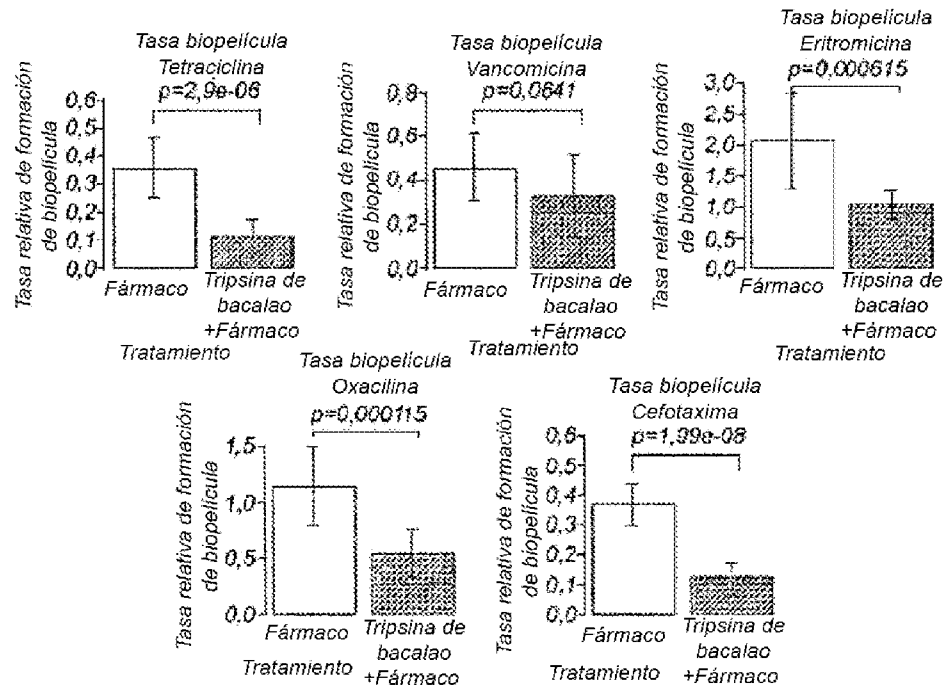


Figura 2

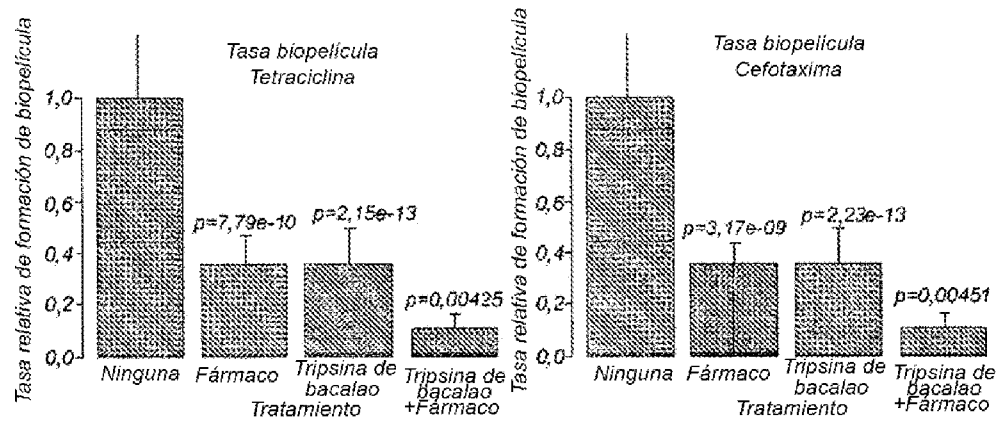


Figura 3

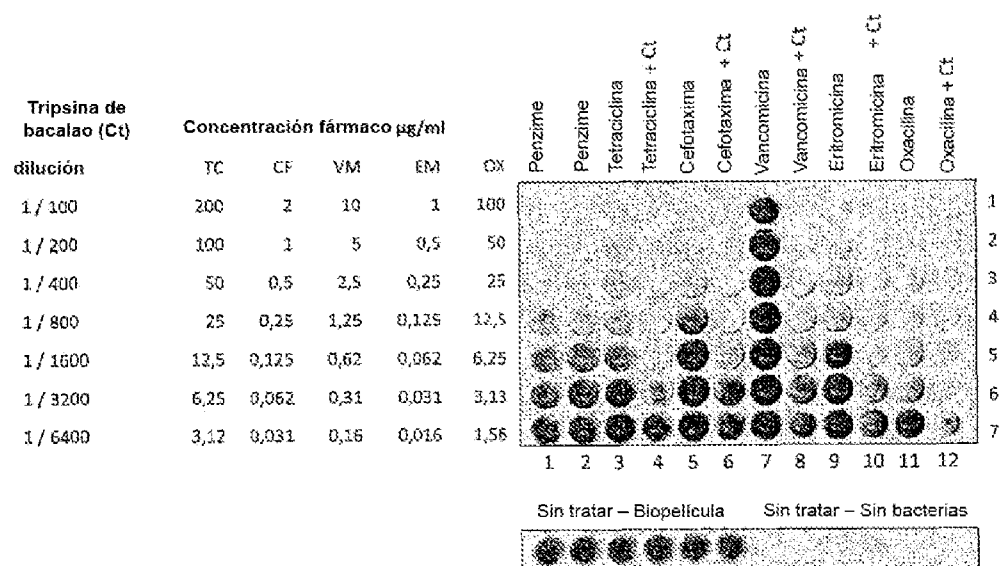


Figura 4

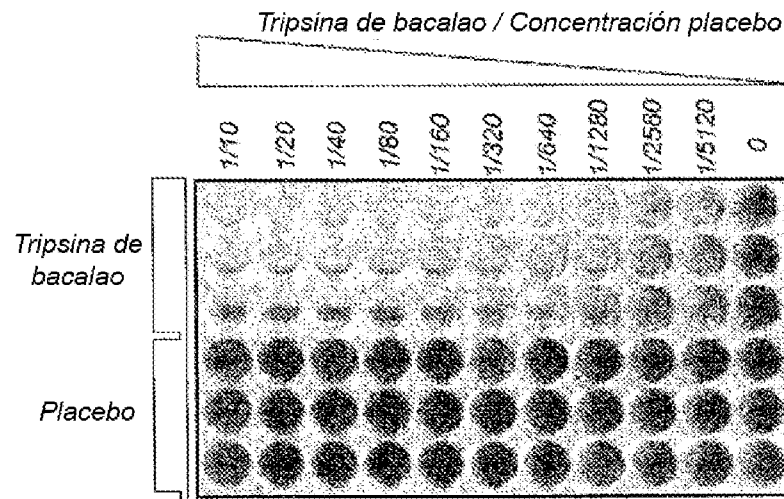


Figura 5

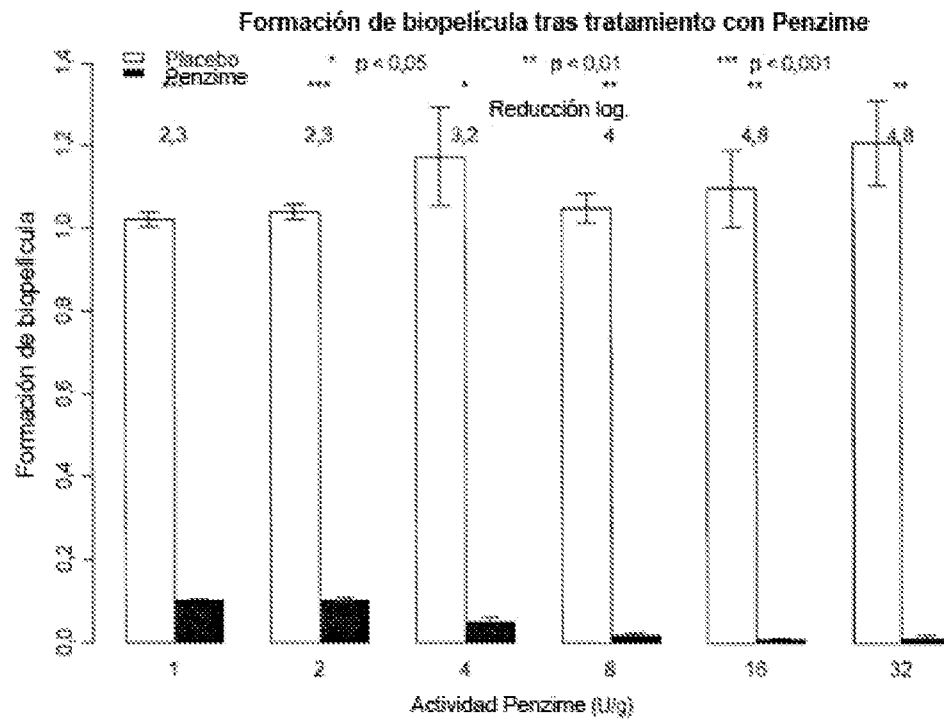


Figura 6

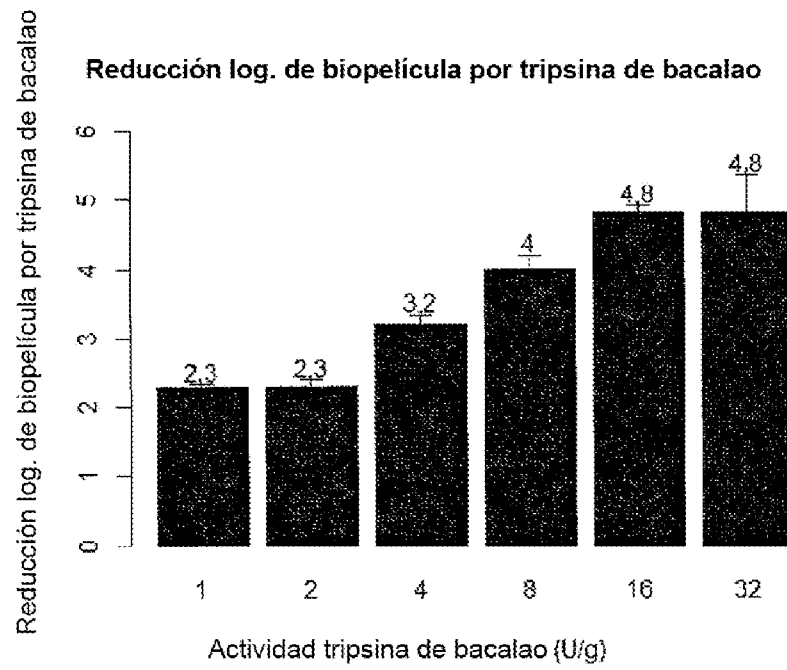


Figura 7

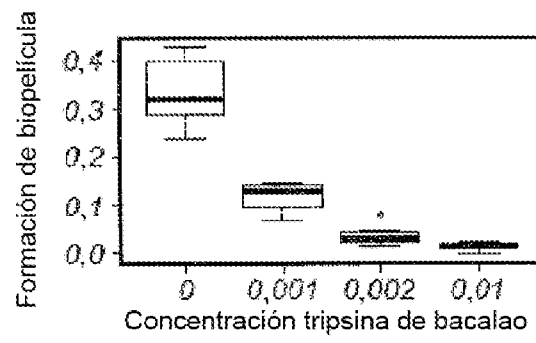


Figura 8

