

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 890 555**

(51) Int. Cl.:

A61K 38/48 (2006.01)
A61P 31/00 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)
A61P 31/10 (2006.01)
A61P 31/12 (2006.01)
A61P 11/00 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.01.2015 PCT/GB2015/050212**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **06.08.2015 WO15114343**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.01.2015 E 15708564 (8)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.08.2021 EP 3099317**

(54) Título: **Tripsina de bacalao para uso en el tratamiento de infecciones microbianas en un sujeto con inmunodeficiencia**

(30) Prioridad:

29.01.2014 GB 201401480
31.03.2014 GB 201405784

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
20.01.2022

(73) Titular/es:

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

(72) Inventor/es:

CLARSUND, MATS PETER y
BLOM, ULF THOMAS

(74) Agente/Representante:

PADIAL MARTÍNEZ, Ana Belén

ES 2 890 555 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

Tripsina de bacalao para uso en el tratamiento de infecciones microbianas en un sujeto con inmunodeficiencia

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a agentes basados en polipéptidos para uso en el tratamiento o la prevención de infecciones microbianas en un sujeto con o susceptible de inmunodeficiencia.

10 Antecedentes

Las inmunodeficiencias primarias (PID) son un grupo diverso de más de 300 trastornos genéticos que afectan fundamentalmente al desarrollo y/o la funcionalidad del sistema inmunitario. La mayoría de ellos son trastornos monogénicos raros, pero el espectro de las PID se amplía constantemente con la identificación de nuevos síndromes de inmunodeficiencias mediante tecnologías de secuenciación de nueva generación y una mejor conciencia clínica. Los pacientes se presentan clásicamente con una mayor susceptibilidad a infecciones o infección con organismos inusuales y también pueden desarrollar enfermedad autoinmunitaria o autoinflamatoria y neoplasias malignas linforreticulares. Aunque las terapias mínimas o de apoyo son eficaces para muchas de estas afecciones, las más graves requieren un tratamiento precoz definitivo para prevenir la morbilidad crónica y la mortalidad precoz.

20 La incidencia de la mayoría de las inmunodeficiencias primarias es incierta debido a la falta de un registro nacional o de informes de las encuestas de salud gubernamentales. En Estados Unidos, hasta 500.000 personas tienen una de las inmunodeficiencias primarias conocidas, con aproximadamente 50.000 casos diagnosticados cada año. Las inmunodeficiencias primarias parecen afectar por igual a hombres que a mujeres.

25 Las PID también son un problema de salud pública no abordado en Europa, con un cálculo aproximado de dos millones de niños y adultos que padecen infecciones recurrentes en los estados miembros sin ser diagnosticados y a los que, por lo tanto, no se les ofrece tratamiento.

30 Se han desarrollado una serie de estrategias de tratamiento diferentes para el tratamiento de inmunodeficiencias primarias, que incluyen:

(a) Inmunoglobulina intravenosa (ivlg)

35 Durante los últimos 20 años, para el tratamiento de la agammaglobulinemia se ha usado inmunoglobulina (ivlg) administrada por vía intravenosa. Este agente ahora es una terapia estándar para la mayoría de las deficiencias de anticuerpos. Con mayor frecuencia, la IVIG se usa en pacientes con agammaglobulinemia relacionada con el cromosoma X, inmunodeficiencia variable común, hiper IgM relacionada con el cromosoma X, inmunodeficiencia combinada grave, síndrome de Wiskott-Aldrich, y deficiencia de clase de IgG selectiva.

40 La Ivlg también se usa, o su uso se está considerando, en una amplia diversidad de otras enfermedades. Por lo tanto, su disponibilidad limitada es una preocupación.

(b) Trasplante de médula ósea

45 Los trasplantes de médula ósea de donantes con HLA idénticos pueden ser curativos en pacientes con inmunodeficiencias celulares tales como inmunodeficiencia combinada grave, síndrome de Wiskott-Aldrich, y síndrome de DiGeorge, y pueden ser beneficiosos en pacientes con enfermedad granulomatosa crónica. En la actualidad, el trasplante de médula ósea no tiene ningún papel en el tratamiento de las deficiencias de anticuerpos.

50 Los donantes con HLA idénticos no siempre están disponibles. La supervivencia a largo plazo puede ser menor con los trasplantes de médula ósea de donantes haploidénticos. Por lo tanto, las investigaciones de estrategias alternativas, tales como terapia génica, podrían favorecer el tratamiento de pacientes con trastornos de inmunodeficiencia primaria que de otra manera podrían requerir un trasplante de médula ósea.

(c) Antibióticos y otras terapias

55 Cuando las infecciones recurrentes son un problema, muchos pacientes con inmunodeficiencias primarias se tratan con antibióticos solos o en combinación con IGIV. Por ejemplo, en pacientes con enfermedad granulomatosa crónica, la terapia profiláctica con trimetoprim-sulfametoxazol (Bactrim, Septra) reduce la incidencia de infecciones graves en un 50 por ciento. Del mismo modo, el tratamiento para deficiencias del complemento se dirige a prevenir la infección, y consiste en profilaxis con antibióticos e inmunizaciones para bacterias encapsuladas (por ejemplo, vacuna neumocócica heptavalente, vacuna conjugada frente a Haemophilus b, vacuna de polisacárido meningocócico).

65 Otros tratamientos para las inmunodeficiencias primarias incluyen el reemplazo enzimático en pacientes con

deficiencia de adenosina desaminasa (un subtipo de inmunodeficiencia combinada grave) y la terapia con citoquinas en pacientes con enfermedad granulomatosa crónica.

5 Más recientemente, también se han realizado avances en terapia génica para inmunodeficiencias primarias (por ejemplo, véase Rivat *et al.*, 2012, Hum. Gene Ther. 23 (7): 668-675).

10 Sin embargo, sigue existiendo la necesidad de terapias mejoradas para el tratamiento de infecciones microbianas en sujetos con una inmunodeficiencia, tal como una inmunodeficiencia primaria o una inmunodeficiencia inducida por fármacos, con el fin de mejorar la calidad de vida de dichos pacientes.

15 10 El documento de patente WO 00/78332 A2 se refiere a serina proteinasas obtenidas a partir de pescado, incluyendo tripsinas y quimotripsina obtenidas a partir de bacalao, tal como bacalao del Atlántico, para uso en el tratamiento y/o prevención de una diversidad de enfermedades y trastornos tales como enfermedades inflamatorias, enfermedades infecciosas causadas por virus, bacterias y especies fúngicas y enfermedades en las que interviene un mecanismo de unión a receptores en la patogénesis. También se describen composiciones farmacéuticas y cosméticas que comprenden las proteinasas.

20 15 El documento de patente WO 2011/050135 A1 se refiere a la prevención y el tratamiento de la gripe, y más particularmente del virus de la gripe A, subtipo H1N1, con el uso de una composición farmacéutica que comprende una o más enzimas digestivas, tales como enzimas pancreáticas y enzimas pancreáticas porcinas. La divulgación se refiere además al uso del nivel de quimotripsina fecal de un individuo como indicador, por ejemplo, biomarcador de si un individuo puede ser más susceptible de padecer gripe, por ejemplo, gripe A, subtipo H1N1, y/o si un individuo se beneficiará de la administración de las composiciones farmacéuticas descritas. También se contempla el uso de las composiciones como agentes esterilizantes, antisépticos, desinfectantes y detergentes, por ejemplo, para reducir o erradicar el virus de la gripe presente en superficies vivas o inanimadas.

25 20 El documento de patente WO 02/06460 A2 se refiere a polipéptidos de serina proteasa-2 asociada a lectina de unión a manina (MASP-2) básicamente puros y fragmentos de los mismos, así como a ácidos nucleicos que codifican tales polipéptidos. También se desvelan usos de un polipéptido básicamente puro que comprende secuencias de aminoácidos obtenidas a partir de serina proteasa-2 asociada a lectina de unión a manano (MASP2) o un homólogo funcional del mismo para la producción de una composición farmacéutica, así como composiciones farmacéuticas que comprenden MASP-2 y/o fragmentos de MASP-2. Además, se describen inhibidores de MASP-2 y composiciones farmacéuticas que comprenden tales inhibidores, y métodos para detectar la expresión de ácido nucleico de MASP-2.

30 25 Gudmundsdóttir *et al.*, se refiere al uso potencial de tripsina de bacalao del Atlántico en biomedicina (Biomed Res Int, 749078: 1-11 (2013)).

Sumario de la invención

35 30 La invención es tal como se establece en las reivindicaciones. El primer aspecto de la invención proporciona un polipéptido que tiene actividad de proteasa para uso en el tratamiento o prevención de infecciones microbianas en un sujeto con o susceptible de inmunodeficiencia, en donde el polipéptido comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, o un fragmento de al menos 15 aminoácidos contiguos de SEQ ID NO: 1, o variante del mismo que tiene al menos un 90 % de identidad con la SEQ ID NO: 1 que retiene la actividad de tripsina de dicha secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, en donde además el polipéptido se proporciona en una forma adecuada para su administración a la mucosa de la boca y/o faringe, y en donde la infección microbiana se selecciona entre el grupo que consiste en infecciones secundarias de la boca y la faringe. En la medida en que se desvelan otros polipéptidos en el presente documento, estos se incluyen simplemente con fines de referencia.

40 35 Por "proteasa" los investigadores incluyen cualquier enzima capaz de catalizar la proteólisis *in vivo*, en el cuerpo de un mamífero (por ejemplo, un ser humano). Por lo tanto, en la invención se puede utilizar cualquier tipo de proteasa, que incluye, pero no se limita a, serina proteasas (tales como tripsinas/quimotripsinas), treonina proteasas, cisteína proteasas, aspartato proteasas, proteasas de ácido glutámico y metaloproteasas.

45 40 Por "inmunodeficiencia" los investigadores se refieren a una afección en la que la enfermedad inmunitaria del sujeto está comprometida, en su totalidad o en parte. La inmunodeficiencia puede ser adquirida o secundaria, por ejemplo, después del tratamiento con una terapia con inmunosupresores, o puede ser primaria, por ejemplo, un trastorno de origen natural en el que parte del sistema inmunitario del cuerpo se pierde o no funciona normalmente. Por lo tanto, en una realización, la inmunodeficiencia es una inmunodeficiencia secundaria o adquirida.

50 45 Por ejemplo, la inmunodeficiencia en el sujeto puede surgir al recibir tratamiento con una terapia con inmunosupresores (tales como glucocorticoides, agentes citostáticos, anticuerpos, fármacos que actúan sobre inmunofilitinas, interferones, opioides, proteínas de unión a TNF, micofenolato y terapia de radiación).

55 50 Las terapias con inmunosupresores se usan habitualmente en medicina, por ejemplo:

- (a) para prevenir el rechazo de órganos y tejidos trasplantados (por ejemplo, médula ósea, corazón, riñón, hígado);
 5 (b) para tratar enfermedades autoinmunitarias o enfermedades de origen autoinmunitario (por ejemplo, artritis reumatoide, esclerosis múltiple, miastenia grave, lupus eritematoso sistémico, sarcoidosis, glomeruloesclerosis focal y segmentaria, enfermedad de Crohn, enfermedad de Behcet, pénfigo y colitis ulcerosa); y
 (c) para tratar otras enfermedades inflamatorias no autoinmunitarias (por ejemplo, control del asma alérgica a largo plazo).
- 10 En otra realización más, la inmunodeficiencia es una inmunodeficiencia de origen natural. Por ejemplo, la inmunodeficiencia puede deberse a una inmunodeficiencia primaria (véase a continuación), un cáncer (tal como leucemia, linfoma, mieloma múltiple), infección crónica (tal como síndrome de inmunodeficiencia adquirida o SIDA), desnutrición y/o envejecimiento.
- 15 Las inmunodeficiencias primarias incluyen una diversidad de trastornos que hacen que los pacientes sean más susceptibles de infecciones. Si no se tratan, estas infecciones pueden ser mortales. Las inmunodeficiencias primarias comunes incluyen trastornos de la inmunidad humoral (que influyen en la diferenciación de linfocitos B o en la producción de anticuerpos), defectos de linfocitos T y defectos combinados de linfocitos B y T, trastornos fagocíticos y deficiencias del complemento. Las principales indicaciones de estos trastornos incluyen infecciones 20 múltiples a pesar de un tratamiento agresivo, infecciones por organismos no habituales u oportunistas, retraso del desarrollo o crecimiento deficiente, y antecedentes familiares positivos. El reconocimiento y el diagnóstico precoces pueden alterar el curso de las inmunodeficiencias primarias de manera significativa y pueden tener un efecto positivo en la evolución del paciente.
- 25 En una realización, el paciente tiene una inmunodeficiencia primaria seleccionada entre el grupo que consiste en las indicaciones que se enumeran en las Tablas I a VIII.

Tabla I**30 Inmunodeficiencias combinadas de linfocitos T y B**

En estos trastornos, tanto los linfocitos T como los linfocitos B son disfuncionales o presentan una disminución de su número. Los miembros principales son diversos tipos de inmunodeficiencia combinada grave (SCID).

- 35 1. SCID T-/B+ (linfocitos T predominantemente ausentes): deficiencia de γ c, deficiencia de JAK3, deficiencia de la cadena α del receptor de interleuquina 7, deficiencia de CD45, deficiencia de CD3 δ /CD3 ϵ .
 2. SCID T-/B- (linfocitos tanto T como B ausentes): deficiencia de RAG 1/2, deficiencia de DCLRE1C, deficiencia de adenosina desaminasa (ADA), disgenesia reticular
 3. Síndrome de Omenn
 40 4. Deficiencia de ADN ligasa de tipo IV
 5. Deficiencia de Cernunnos
 6. Deficiencia del ligando CD40
 7. Deficiencia de CD40
 8. Deficiencia de purina nucleósido fosforilasa (PNP)
 45 9. Deficiencia de CD3y
 10. Deficiencia de CD8
 11. ZAP-70
 12. Deficiencia de canales de Ca⁺⁺
 13. Deficiencia de MHC de clase I
 50 14. Deficiencia de MHC de clase II
 15. Deficiencia de la hélice alada
 16. Deficiencia de CD25
 17. Deficiencia de STAT5b
 18. Deficiencia de Itk
 55 19. Deficiencia de DOCK8.

Tabla II**Deficiencias de anticuerpos predominantemente**

- 60 En las deficiencias de anticuerpos primarios, uno o más isótipos de inmunoglobulina están disminuidos o fallan en su funcionamiento correcto.
- 65 1. Linfocitos B ausentes con una reducción severa resultante de todos los tipos de anticuerpos: agammaglobulinemia relacionada con el cromosoma X (deficiencia de btk, o agammaglobulinemia de Bruton), deficiencia de la cadena pesada μ , deficiencia de IgA, deficiencia de BLNK, timoma con

- inmunodeficiencia
2. Linfocitos B bajos pero presentes o normales, pero con reducción en 2 o más isotipos (generalmente IgG e IgA, en ocasiones IgM): inmunodeficiencia de variable común (CVID), deficiencia de ICOS, deficiencia de CD19, deficiencia de TACI (TNFRSF13B), deficiencia de receptor de BAFF
 - 5 3. Números normales de linfocitos B con disminución de IgG e IgA y aumento de IgM: síndromes de hiper-IgM
 4. Números normales de linfocitos B con deficiencias de isotipo o cadena ligera: delecciones de cadenas pesadas, deficiencia de cadena kappa, deficiencia de subclase de IgG aislada, deficiencia de subclase de IgA con IgG, deficiencia de inmunoglobulina A selectiva
 - 10 5. Deficiencia de anticuerpo específico para antígenos específicos con concentraciones de linfocitos B normales e Ig normales
 6. Hipogammaglobulinemia transitoria de la infancia (THI).

Tabla III**15 Otros síndromes de inmunodeficiencia bien definidos**

Una serie síndromes evitan la clasificación formal, pero de otro modo se pueden reconocer por características clínicas o inmunológicas particulares.

- 20 1. Síndrome de Wiskott-Aldrich
2. Defectos de reparación del ADN que no causan SCID aislada: ataxia telangiectasia, síndrome similar a ataxia, síndrome de rotura de Nijmegen, síndrome de Bloom
3. Síndrome de DiGeorge (cuando está asociado a defectos tímicos)
- 25 4. Diversas displasias inmuno-óseas (desarrollo anómalo del esqueleto con problemas inmunitarios): hipoplasia de cartílago-pelo, síndrome de Schimke
5. Síndrome de Hermansky-Pudlak de tipo 2
6. Síndrome de hiper-IgE
7. Candidiasis mucocutánea crónica
8. Enfermedad venooclusiva hepática con inmunodeficiencia (VODI)
- 30 9. Disqueratosis congénita XL (síndrome de Hoyeraal-Hreidarsson).

Tabla IV**Enfermedades de disregulación inmunitaria**

- 35 En determinadas afecciones, la regulación es el problema predominante, más que la actividad intrínseca de partes del sistema inmunitario.
 1. Inmunodeficiencia con hipopigmentación o albinismo: síndrome de Chediak-Higashi, síndrome de Griscelli de tipo 2
 2. Linfohistiocitosis hemofagocítica familiar: deficiencia de perforina, deficiencia de MUNC13D, deficiencia de sintaxina 11
 3. Síndrome linfoproliferativo relacionado con el cromosoma X
 4. Síndromes con autoinmunidad:
 - (a) Síndrome linfoproliferativo autoinmunitario: tipo 1a (defectos de CD95), tipo 1b (defectos del ligando Fas), tipo 2a (defectos de CASP10), tipo 2b (defectos de CASP8)
 - (b) APECED (poliendocrinopatía autoinmunitaria con candidiasis y distrofia ectodérmica)
 - (c) IPEX (síndrome de inmunodisregulación poliendocrinopatía enteropatía relacionado con el cromosoma X)
 - (d) Deficiencia de CD25.
- 45
- 50

Tabla V**Defectos congénitos del número de fagocitos, función, o ambos**

55 En determinadas afecciones, o el número de fagocitos se reduce o su capacidad funcional se altera.

1. Neutropenia congénita grave: debida a deficiencia de ELA2 (con mielodisplasia)
2. Neutropenia congénita grave: debida a deficiencia de GFI1 (con linfopenia T/B)
- 60 3. Síndrome de Kostmann
4. Neutropenia con malformaciones cardíacas y urogenitales
5. Enfermedad por almacenamiento de glicógeno de tipo 1b
6. Neutropenia cíclica
7. Neutropenia/mielodisplasia relacionadas con el cromosoma X
- 65 8. Deficiencia de P14
9. Deficiencia de adhesión leucocitaria de tipo 1

- 10. Deficiencia de adhesión leucocitaria de tipo 2
- 11. Deficiencia de adhesión leucocitaria de tipo 3
- 12. Deficiencia de RAC2 (síndrome de immunodeficiencia de neutrófilos)
- 13. Deficiencia de beta-actina
- 5 14. Periodontitis juvenil localizada
- 15. Síndrome de Papillon-Lefèvre
- 16. Deficiencia granular específica
- 17. Síndrome de Shwachman-Diamond
- 18. Enfermedad granulomatosa crónica: relacionada con el cromosoma X
- 10 19. Enfermedad granulomatosa crónica: autosómica (CYBA)
- 20. Enfermedad granulomatosa crónica: autosómica (NCF1)
- 21. Enfermedad granulomatosa crónica: autosómica (NCF2)
- 22. Deficiencia de cadena de β1 de IL-12 e IL-23
- 23. Deficiencia de IL-12p40.
- 15 24. Deficiencia del receptor 1 de interferón γ
- 25. Deficiencia del receptor 2 de interferón γ
- 26. Deficiencia de STAT1 (2 formas)
- 27. Hiper-IgE AD
- 28. Hiper-IgE AR
- 20 29. Proteinosis alveolar pulmonar.

Tabla VIDefectos en la inmunidad innata

- 25 Varias enfermedades raras se deben a defectos en el sistema inmunitario innato. Muchas de estas afecciones están asociadas a problemas cutáneos.
- 30 1. Displasia ectodérmica hipohidrótica
 - (a) Deficiencia de NEMO
 - (b) Deficiencia de IKBA
 - 35 2. EDA-ID
 - 3. Deficiencia de IRAK-4
 - 4. Deficiencia de MyD88
 - 5. Síndrome de WHIM (verrugas, hipogammaglobulinemia, infecciones, mielocatexis)
 - 6. Epidermodisplasia verruciforme
 - 7. Encefalitis por herpes simple
 - 40 8. Candidiasis mucocutánea crónica
 - 9. Tripanosomiasis.

Tabla VIITrastorno autoinflamatorio

En lugar de predisposición a las infecciones, la mayoría de los trastornos autoinflamatorios conducen a una inflamación excesiva. Muchos se manifiestan por sí mismos como síndromes febres periódicos.

- 50 1. Fiebre mediterránea familiar
- 2. Síndrome periódico asociado al receptor de TNF (TRAPS)
- 3. Síndrome de hiper-IgD (HIDS)
- 4. Enfermedades relacionadas con CIAS1:
 - 55 (a) Síndrome de Muckle-Wells
 - (b) Síndrome autoinflamatorio familiar inducido por el frío
 - (c) Enfermedad inflamatoria multisistémica de inicio neonatal
- 5. Síndrome de PAPA (artritis estéril piógena, pioderma gangrenoso, acné)
- 6. Síndrome de Blau
- 60 7. Osteomielitis multifocal recurrente crónica y anemia diseritropoyética congénita (síndrome de Majeed)
- 8. DIRA (deficiencia del antagonista del receptor de IL-1).

Tabla VIIIDeficiencias del complemento

Las deficiencias del complemento predisponen a infecciones pero también a afecciones autoinmunitarias.

- 5 1. Deficiencia de C1q (síndrome similar al lupus, enfermedad reumatoide, infecciones)
- 2. Deficiencia de C1r (ídem)
- 3. Deficiencia de C1s
- 4. Deficiencia de C4 (ídem)
- 5. Deficiencia de C2 (síndrome similar al lupus, vasculitis, polimiositis, infecciones piógenas)
- 6. Deficiencia de C3 (infecciones piógenas recurrentes)
- 10 7. Deficiencia de C5 (infecciones por *Neisseria*, SLE)
- 8. Deficiencia de C6 (ídem)
- 9. Deficiencia de C7 (ídem, vasculitis)
- 10. Deficiencia de C8a
- 11. Deficiencia de C8b
- 15 12. Deficiencia de C9 (infecciones por *Neisseria*)
- 13. Deficiencia de inhibidor de C1 (angioedema hereditario)
- 14. Deficiencia de Factor I (infecciones piógenas)
- 15. Deficiencia de Factor H (síndrome hemolítico-urémico, glomerulonefritis membranoproliferativa)
- 16. Deficiencia de Factor D (infecciones por *Neisseria*)
- 20 17. Deficiencia de Properdina (infecciones por *Neisseria*)
- 18. Deficiencia de MBP (infecciones piógenas)
- 19. Deficiencia de MASP2
- 20. Deficiencia de receptor 3 del complemento (CR3)
- 21. Deficiencia de proteína de cofactor de membrana (CD46)
- 25 22. Deficiencia de inhibidor del complejo de ataque a membranas (CD59)
- 23. Hemoglobinuria paroxística nocturna
- 24. Inmunodeficiencia asociada a deficiencia de ficolina 3.

30 Las personas con experiencia en la materia apreciarán que los polipéptidos de la invención no proporcionan una cura para las inmunodeficiencias primarias *per se*. Más bien, los polipéptidos buscan aliviar o prevenir uno o más de los síntomas de infecciones microbianas asociadas a tales trastornos.

35 Por lo tanto, por "tratamiento" los investigadores incluyen el alivio, en parte o en su totalidad, de los síntomas de infecciones microbianas, que incluyen, pero no se limitan a, infecciones bacterianas, virales y fúngicas, en pacientes con una inmunodeficiencia primaria.

40 Por "prevención" los investigadores incluyen la reducción del riesgo de desarrollar una infección microbiana en pacientes con una inmunodeficiencia primaria. Sin embargo, se apreciará que tal prevención puede no ser absoluta, es decir, puede que no evite que todos estos pacientes desarrollen infecciones microbianas. Como tal, los términos "prevención" y "profilaxis" se pueden usar indistintamente.

En una realización, la infección microbiana se selecciona entre el grupo que consiste en infecciones bacterianas, infecciones virales, infecciones fúngicas e infecciones por levadura.

45 Los polipéptidos de la invención son para uso en el tratamiento o la prevención de infecciones secundarias de la boca y/o la faringe (por ejemplo, orofaringe). Por ejemplo, los polipéptidos se pueden usar en el tratamiento o la prevención de rinorrea y/o infección fúngica de la cavidad oral y/o llagas en las encías.

50 Los polipéptidos de la invención son particularmente útiles en el tratamiento o la prevención de infecciones microbianas en pacientes con PI que padecen episodios regulares de infección (por ejemplo, al menos cinco infecciones microbianas al año, por ejemplo, al menos diez, quince, veinte, treinta o más infecciones microbianas al año).

55 Los polipéptidos de la invención pueden presentar actividad de tripsina. Por "actividad tripsina" los investigadores quieren decir que el polipéptido exhibe una actividad de peptidasa de una enzima tripsina (EC 3.4.21.4) o de una peptidasa relacionada (tal como enzimas quimotripsina, EC 3.4.21.1).

Los polipéptidos de la invención pueden ser de origen natural o de origen no natural.

60 En una realización, el polipéptido se obtiene, directa o indirectamente, a partir de un pez, tal como bacalao del Atlántico (*Gadus morhua*), salmón del Atlántico y del Pacífico (por ejemplo, *Salmo salar* y especies de *Oncorhynchus*) y abadejo de Alaska (*Theragra chalcogramma*).

65 A partir de bacalao del Atlántico se han caracterizado tres isoenzimas de tripsina principales, denominadas tripsina I, II y III (véase Ásgeirsson *et al.*, 1989, Eur. J. Biochem. 180: 85-94). Por ejemplo, véase el N.º AC090397 de acceso en GenBank.

Además, el bacalao del Atlántico expresa dos isoenzimas principales de quimotripsina, denominadas quimotripsina A y B (véase Ásgeirsson y Bjarnason, 1991, Comp. Biochem. Physiol. B 998: 327-335). Por ejemplo, véase el N.º CAA55242.1 de acceso en GenBank.

5 En una realización, el polipéptido comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos de tripsina I de bacalao atlántico (*Gadus morhua*), es decir, SEQ ID NO: 1:

```
IVGGYECTKHSQAHQVSLNSGYHFCGGSLVSKDWWVSAAHCYKSVLVRVLGEHHIRVNEGTEQYI
SSSSVIRHPNYSSYNINNDIMLIKLTKPATLNQYVHAVALPTECAADATMCTVSGWGNTMSSVAD
GDKLQCLSLPILSHADCANSYPGMITQSMFCAGYLEGGKDSCQGDGGPVVCNGVLQGVVSWGYG
CAERDHPGVYAKVCVLSGWVRDTMANY
```

10 [SEQ ID NO: 1]

un fragmento o variante, que retiene la actividad de tripsina de dicha secuencia de aminoácidos, en donde el fragmento comprende al menos 15 aminoácidos contiguos de SEQ ID NO: 1, o la variante tiene al menos un 90 % de identidad con la SEQ ID NO: 1, y en donde el polipéptido, fragmento o variante, y/o derivado o fusión del mismo, 15 retiene la actividad de tripsina de dicha secuencia de aminoácidos.

En una realización preferente, el polipéptido comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO: 1. Tal polipéptido se puede purificar a partir de bacalao del Atlántico, por ejemplo como se describe en Ásgeirsson *et al.*, 1989, Eur. J. Biochem. 180: 85-94.

20 Algunos polipéptidos a modo de ejemplo adecuados de la invención, y métodos para su producción, también se describen en el documento de Patente Europea N.º 1 202 743 B.

25 El término "aminoácido", tal como se usa en el presente documento, incluye los veinte aminoácidos estándar codificados genéticamente y sus estereoisómeros correspondientes en la forma "D" (en comparación con la forma "L" natural), omega-aminoácidos y otros aminoácidos de origen natural, aminoácidos no convencionales (por ejemplo, aminoácidos α,α -disustituidos, N-alquil aminoácidos, etc.) y aminoácidos derivatizados por vía química (véase a continuación).

30 Cuando un aminoácido se enumera específicamente, tal como "alanina" o "Ala" o "A", el término se refiere tanto a L-alanina como a D-alanina, a menos que se indique explícitamente de otro modo. Otros aminoácidos no convencionales también pueden ser componentes adecuados para polipéptidos de la presente invención, siempre que el polipéptido retenga la propiedad funcional deseada. Para los péptidos mostrados, cada resto de aminoácido codificado, cuando sea apropiado, está representado mediante una designación de una sola letra, que corresponde 35 al nombre trivial del aminoácido convencional.

De acuerdo con la convención, las secuencias de aminoácidos que se desvelan en el presente documento se proporcionan en la dirección del extremo N-terminal al extremo C-terminal.

40 En una realización, los polipéptidos de la invención comprenden o consisten en L-aminoácidos.

Cuando el polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO: 1, puede comprender aminoácidos adicionales en los extremos N y/o C terminales más allá de los de SEQ ID NO: 1, por ejemplo, el polipéptido puede comprender aminoácidos adicionales en su extremo C-terminal. Del mismo modo, 45 cuando el polipéptido comprende un fragmento, variante o derivado de una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO: 1, puede comprender aminoácidos adicionales en sus extremos N y/o C terminales.

Las personas con experiencia apreciarán que no es necesario que el polipéptido de la invención corresponda a la proteína tripsina de origen natural de longitud completa. En su lugar, el polipéptido puede corresponder a un fragmento de tal tripsina de tipo natural, siempre que dicho fragmento retenga (al menos en parte) la actividad de la tripsina de la proteína tripsina de origen natural a partir de la que se obtiene, y en donde el fragmento comprende al menos 15 aminoácidos contiguos de SEQ ID NO: 1.

50 La actividad de la tripsina se puede determinar usando métodos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, los kits de ensayo de tripsina están disponibles en el mercado en Abcam, Cambridge, Reino Unido (véase el N.º de Cat. ab102531) y otros proveedores. En una realización, la actividad de tripsina se mide usando Cbz-Gly-Pro-Arg-p-nitroanilida (Cbz-GPR-pNA) como sustrato, produciendo una actividad específica de al menos 10 U/mg, por ejemplo 55 al menos 50 U/mg o al menos 100 U/mg (véase el documento de patente EP 1 202 743 B).

Por lo tanto, en una realización el polipéptido comprende o consiste en un fragmento de al menos 15 aminoácidos contiguos de SEQ ID NO: 1, por ejemplo al menos 16, 17, 18, 19, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230 o 240 aminoácidos contiguos de SEQ ID NO: 1.

5 Por ejemplo, el fragmento puede comprender o consistir en los restos de aminoácido 61 a 77 de SEQ ID NO: 1.

Alternativamente, o además, el fragmento puede comprender o consistir en los restos de aminoácido 225 a 241 de SEQ ID NO: 1.

10 Las personas con experiencia en la materia apreciarán que el polipéptido de la invención puede comprender o consistir en una variante de la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO: 1 (o fragmento de la misma), en donde la variante tiene al menos un 90 % de identidad con la SEQ ID NO: 1. Tal variante puede ser una variante de origen no natural.

15 Por "variantes" del polipéptido los investigadores incluyen inserciones, delecciones y sustituciones, ya sean conservativas o no conservativas. Las variantes del polipéptido retienen, al menos en parte, la actividad de tripsina de dicho polipéptido.

20 Tales variantes se pueden preparar usando los métodos de ingeniería de proteínas y mutagénesis dirigida al sitio que se conocen bien en la técnica usando los polinucleótidos recombinantes (véase por ejemplo, Molecular Cloning: a Laboratory Manual, 3^a edición, Sambrook y Russell, 2000, Cold Spring Harbor Laboratory Press).

25 También se desvela una variante que tiene una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 50 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO: 1 o un fragmento de la misma, por ejemplo al menos un 55 %, un 60 %, un 65 %, un 70 %, un 75 %, un 80 %, un 90 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 % o al menos un 99 % de identidad.

30 El porcentaje de identidad de secuencia entre dos polipéptidos se puede determinar usando programas informáticos adecuados, por ejemplo, el programa GAP del University of Wisconsin Genetic Computing Group y se apreciará que el porcentaje de identidad se calcula con respecto a polipéptidos cuyas secuencias se han alineado de manera óptima.

35 El alineamiento se puede realizar alternativamente usando el programa Clustal W (tal como se describe en Thompson *et al.*, 1994, Nuc. Acid Res. 22: 4673-4680).

Los parámetros usados pueden ser los que siguen a continuación:

Parámetros de alineamiento rápido por pares: tamaño de tupla K (palabra); 1, tamaño de la ventana; 5, penalización por hueco; 3, número de diagonales superiores; 5. Método de puntuación: x por ciento.

40 Múltiples parámetros de alineamiento: penalización por apertura de hueco; 10, penalización por extensión de hueco; 0,05.

45 Matriz de puntuación: BLOSUM.

45 Alternativamente, el programa BESTFIT se puede usar para determinar alineamientos de secuencia local.

En una realización, el polipéptido que tiene actividad de proteasa es una variante de SEQ ID NO: 1 que comprende uno o más aminoácidos mutados seleccionados entre el grupo que consiste en posiciones de aminoácido:

50 E21, H25, H29, V47, K49, D50, L63, H71, H72, R74, N76, T79, Y82, S85, S87, S89, N98, I99, V121, M135, V138, M145, V148, D150, K154, L160, M175, S179, A183, L185, V212, Y217, P225, A229, V233, L234, V238, N240, Y241 y/o M242.

55 (en donde la secuencia de aminoácidos y la numeración están de acuerdo con la entrada "2EEK!" del banco de datos de proteínas (*Protein Data Bank [PDB]*), con la isoleucina inicial de SEQ ID NO: 1 numerada como posición I-16).

Por lo tanto, el polipéptido que tiene actividad de proteasa puede ser una variante de SEQ ID NO: 1 que comprende una o más mutaciones de aminoácidos seleccionadas entre el grupo que consiste en:

60 E21T, H25Y, H29(Y/N), V47I, K49E, D50Q, L63I, H71D, H72N, R74(K/E), N76(T/L), T79(S/N), Y82F, S85A, S87(K/R), S89R, N98T, I99L, V121I, M135Q, V138I, M145(T/L/V/E/K), V148G, D150S, K154(T/V), L160(I/A), M175(K/Q), S179N, A183V, L185G, V212I, Y217(D/H/S), P225Y, A229V, V233N, L234Y, V238I, N240S, Y241N y/o M242I.

65 Por ejemplo, el polipéptido que tiene actividad de proteasa puede comprender o consistir en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 con una de las siguientes mutaciones definidas (o combinaciones de las mismas):

- (a) N240S, Y241N, S87K ("EZA-002");
- (b) K154T ("EZA-003");
- (c) K154L ("EZA-004");
- (d) K154V ("EZA-005");
- 5 (e) K154E ("EZA-006");
- (f) N98T ("EZA-007");
- (g) I99L ("EZA-008");
- (h) L185G, P225Y ("EZA-009");
- (i) V212I ("EZA-0010");
- 10 (j) Y217D, M175K ("EZA-011");
- (k) Y217H ("EZA-012");
- (l) Y217S ("EZA-013");
- (m) A229V ("EZA-014");
- 15 (n) H25Y ("EZA-015");
- (o) H25N ("EZA-016");
- (p) H29Y ("EZA-017");
- (q) H71D ("EZA-018");
- (r) H72N ("EZA-019");
- 20 (s) R74K ("EZA-020");
- (t) R74E ("EZA-021");
- (u) N76T ("EZA-022");
- (v) N76L, Y82F ("EZA-023");
- (w) T79S ("EZA-0024");
- 25 (x) T79N ("EZA-025");
- (y) K49E, D50Q ("EZA-026");
- (z) S87R ("EZA-027");
- (aa) E21T, H71D, D150S, K154V ("EZA-028");
- (bb) S179N, V233N ("EZA-029");
- (cc) M135Q ("EZA-030");
- 30 (dd) M145K, V148G ("EZA-031");
- (ee) M175Q ("EZA-032");
- (ff) L63I, S85A ("EZA-033");
- (gg) L160I ("EZA-034");
- (hh) V138I, L160A, A183V ("EZA-035");
- 35 (ii) V121I ("EZA-036");
- (jj) V47I, V238I, M242I ("EZA-037");
- (kk) V238I ("EZA-038"); y
- (ll) L234Y ("EZA-039")

40 Del mismo modo, el polipéptido que tiene actividad de proteasa puede comprender o consistir en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 con una de las siguientes mutaciones definidas (o combinaciones de las mismas):

- (a) H25N, N76T
- (b) H25N, H29Y
- 45 (c) H25N, M135Q
- (d) H29Y, T79N, M135Q
- (e) I99L, V121I, L160I, Y217H
- (f) V121I, L160I
- (g) H72N, R74E, S87K
- 50 (h) H25N, M135Q, Y217H
- (i) T79N, V121I, V212I
- (j) H29Y, N76T, I99L, M135Q
- (k) K49E, D50Q, N76L, Y82F, S179N, V233N
- (l) M145K, V148G, N76L, Y82F, S179N, V233N
- 55 (m) H25N, N76T, S87K, K154T
- (n) H25Q
- (o) H25D
- (p) H25S
- (q) K24E, H25N
- 60 (r) Y97N
- (s) N100D
- (t) A120S, A122S
- (u) M135E
- (v) V204Q, A122S
- 65 (w) T79D
- (x) R74D

- (y) K49E
 - (z) K49S, D50Q
 - (aa) D50Q
 - (bb) Q178D
 - (cc) S87R

En una realización preferente, el polipéptido que tiene actividad de proteasa es una variante de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 que no comprende histidina en la posición 25.

- 10 Por ejemplo, el polipéptido que tiene actividad de proteasa puede comprender o consistir en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 (que comprende una mutación H25N; véase la caja en la secuencia que sigue a continuación):

16

1

IVGGYECTKNSQAHQVSLNSGYHFCGGSLVSKDWVVSAAHCYKSVLVRLGEHHIRVNEG

79

1

TEQYISSLSSVIRHPNYSSYNINNDIMLKLTKPATLNQYVHAVALPTECAADAMCTVSG

141

1

WGNTMSSVADGDKLQCLSLPILSHADCANSYPGMITQSMFCAGYLEGGKDSCQGDGGPV

200

1

VCNGVLQGVVSGYGCAERDHPGVYAKVCVLSGWVRDTMANY

15

[SEQ ID NO: 2]

En una realización preferente alternativa, el polipéptido que tiene actividad de proteasa es una variante de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 que no comprende lisina en la posición 160.

- Por ejemplo, el polipéptido que tiene actividad de proteasa puede comprender o consistir en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 (que comprende una mutación L160I; véase la caja en la secuencia que sigue a continuación):

16

|

IVGGYECTKHSQAHQVSLNSGYHFCGGSLVSKDWVSAAHCYKSVLVRLGEHHIRVNEG

79

|

TEQYISSLSSVIRHPNYSSYNINNDIMLILKPATLNQYVHAVALPTECAADAMCTVSG

141

|

WGNTMSSVADGDKLQCLSIPILSHADCANSYPGMITQSMFCAGYLEGGKDSCQGDGGPV

200

|

VCNGVLQGVVSWGYGCAERDHPGVYAKVCVLSGWWRDTMANY

[SEQ ID NO: 3]

5 Las personas con experiencia en la materia apreciarán que las mutaciones identificadas anteriormente (definidas por referencia a la secuencia de aminoácidos de la tripsina I de bacalao del Atlántico, SEQ ID NO: 1) también se podrían producir en tripsinas de otras especies. Por ejemplo, las mutaciones específicas resaltadas en las SEQ ID NOS: 2 y 10 3 (H25N y L160I, respectivamente) se podrían realizar en la tripsina de abadejo de Alaska (por ejemplo, véase GenBank: BAH70476.3, en donde la secuencia de aminoácidos de la tripsina activa comienza en la posición 120, de modo que H25 corresponde a H29 en BAH70476.3, etc.).

En una realización alternativa, el polipéptido que tiene actividad proteasa comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de una serina proteasa de origen natural. Por lo tanto, el polipéptido que tiene actividad de serina proteasa puede consistir en la secuencia de aminoácidos de una tripsina de origen natural, de origen eucariota o 15 procariota. Están incluidas específicamente las tripsinas adaptadas al frío, tales como tripsina de bacalao del Atlántico (*Gadus morhua*), salmón del Atlántico y del Pacífico (por ejemplo, *Salmo salar* y especies de *Oncorhynchus*) y abadejo de Alaska (*Theragra chalcogramma*).

20 En una realización adicional del primer aspecto de la invención, el polipéptido comprende o consiste en una proteína de fusión.

Por "fusión" de un polipéptido los investigadores incluyen una secuencia de aminoácidos que corresponde a la SEQ 25 ID NO: 1 (o un fragmento o variante de la misma) fusionado a cualquier otro polipéptido. Por ejemplo, el polipéptido mencionado se puede fusionar con un polipéptido tal como glutatión-S-transferasa (GST) o proteína A para facilitar la purificación de dicho polipéptido. Las personas con experiencia en la materia conocen bien algunos ejemplos de tales fusiones. Del mismo modo, el polipéptido mencionado se puede fusionar con una etiqueta de oligohistidina tal como His6 o con un epítopo reconocido por un anticuerpo tal como el epítopo de etiqueta Myc bien conocido. Las fusiones a cualquier variante o derivado de dicho polipéptido también están incluidas en el alcance de la invención.

30 La fusión puede comprender una parte adicional que confiera una característica deseable al polipéptido mencionado de la invención; por ejemplo, la parte puede ser útil para aumentar o prolongar el efecto terapéutico. Por ejemplo, en una realización la fusión comprende albúmina de suero humano o una proteína similar.

35 Alternativamente, la parte fusionada puede ser, por ejemplo, un resto de biotina, un resto radioactivo, un resto fluorescente, por ejemplo un fluoróforo pequeño o un fluoróforo de proteína fluorescente verde (GFP), como conocen bien las personas con experiencia en la materia. El resto puede ser una etiqueta inmunogénica, por ejemplo una etiqueta Myc, como conocen las personas con experiencia en la materia o puede ser una molécula lipófila o dominio polipeptídico que es capaz de promover la captación celular del polipéptido, como conocen las personas con experiencia en la materia.

40 En una realización adicional del primer aspecto de la invención, el polipéptido comprende o consiste en uno o más aminoácidos que se modifican o derivatizan.

Algunos derivados químicos de uno o más aminoácidos se pueden conseguir mediante reacción con un grupo lateral

- funcional. Tales moléculas derivatizadas incluyen, por ejemplo, aquellas moléculas en las que los grupos amino libres se han derivatizado para formar clorhidratos de amina, grupos p-toluenosulfonilo, grupos carboxibenzoxi, grupos *t*-butiloxicarbonilo, grupos cloroacetilo o grupos formilo. Los grupos carboxilo libres se pueden derivatizar para formar sales, ésteres de metilo y etilo u otros tipos de ésteres e hidrazidas. Algunos grupos hidroxilo libres se pueden derivatizar para formar derivados de O-acilo o de O-alquilo. Como derivados químicos también están incluidos aquellos péptidos que contienen derivados de aminoácidos de origen natural de los veinte aminoácidos estándar. Por ejemplo: la 4-hidroxiprolina se puede sustituir por prolina; la 5-hidroxilisina se puede sustituir por lisina; la 3-metilhistidina se puede sustituir por histidina; la homoserina se puede sustituir por serina y la ornitina por lisina. Algunos derivados también incluyen péptidos que contienen una o más adiciones o delecciones siempre que se mantenga la actividad requerida. Otras modificaciones incluidas son amidación, acilación amino terminal (por ejemplo, acetilación o amidación con ácido tioglicólico), carboxilamidación terminal (por ejemplo, con amoniaco o metilamina) y modificaciones terminales similares.
- Las personas con experiencia en la materia apreciarán además que algunos compuestos peptidomiméticos también pueden ser útiles. Por lo tanto, por "polipéptido" los investigadores incluyen compuestos peptidomiméticos que tienen una actividad antiinflamatoria del polipéptido de SEQ ID NO: 1. El término "peptidomimético" se refiere a un compuesto que imita la conformación y las características deseables de un péptido particular como un agente terapéutico.
- Por ejemplo, los polipéptidos de la invención incluyen no solo moléculas en las que los restos de aminoácido están unidos mediante enlaces peptídicos (-CO-NH-) sino también moléculas en las que el enlace peptídico está invertido. Tales peptidomiméticos retroinversos se pueden preparar usando métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, tales como los que se describen en Meziere *et al.* (1997) J. Immunol. 159, 3230-3237. Este enfoque implica la preparación de pseudopéptidos que contienen cambios que implican a la cadena principal, y no a la orientación de las cadenas laterales. Algunos péptidos retroinversos, que contienen enlaces NH-CO en lugar de enlaces peptídicos CO-NH, son mucho más resistentes a la proteólisis. Alternativamente, el polipéptido de la invención puede ser un compuesto peptidomimético en donde uno o más de los restos de aminoácido están unidos mediante un enlace -y(CH₂NH)- en lugar del enlace amido convencional.
- En una alternativa adicional, se puede prescindir del enlace peptídico por completo siempre que se use un resto conector apropiado que retenga la separación entre los átomos de carbono de los restos de aminoácido; puede ser ventajoso que el resto conector tenga básicamente la misma distribución de carga y básicamente la misma planitud que un enlace peptídico.
- Se apreciará que el polipéptido se pueda bloquear convenientemente en sus extremos N o C terminales para ayudar a reducir la susceptibilidad a la digestión exoproteolítica.
- Para modificar polipéptidos también se han usado una diversidad de aminoácidos no codificados o modificados tales como D-aminoácidos y N-metil aminoácidos. Además, una supuesta conformación bioactiva se puede estabilizar mediante una modificación covalente, tal como ciclado o mediante la incorporación de lactama u otros tipos de puentes, por ejemplo, véanse Veber *et al.*, 1978, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75: 2636 y Thursell *et al.*, 1983, Biochem. Biophys. Res. Comm. 111: 166.
- En una realización preferente, sin embargo, el polipéptido de la invención comprende uno o más aminoácidos modificados o derivatizados mediante PEGilación, amidación, esterificación, acilación, acetilación y/o alquilación.
- Las personas con experiencia en la materia apreciarán que los polipéptidos de la invención pueden tener cualquier longitud adecuada de acuerdo con las reivindicaciones. Preferentemente, los polipéptidos tienen entre 15 y 20 aminoácidos de longitud. Alternativamente, el polipéptido puede tener entre 150 y 250 aminoácidos de longitud, por ejemplo, entre 200 y 250, 210 y 240, 220 y 230, o 220 y 225 aminoácidos de longitud.
- En una realización, el polipéptido es lineal.
- En una realización adicional, el polipéptido es un polipéptido recombinante.
- De manera ventajosa, el polipéptido se proporciona en una forma adecuada para su administración a la mucosa de la boca y/o faringe (por ejemplo, orofaringe). Por ejemplo, el polipéptido se puede proporcionar en una pulverización bucal, pulverización nasal, pastilla para chupar, pastilla, chicle o líquido.
- También se desvela un polipéptido como se ha definido anteriormente en la preparación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de infecciones microbianas en un sujeto con o susceptible de inmunodeficiencia.
- Algunas realizaciones a modo de ejemplo de la presente divulgación se han descrito anteriormente con respecto al primer aspecto de la invención.
- Los polipéptidos de la invención, así como moléculas de ácido nucleico, vectores y células hospedadoras para

producir los mismos, se pueden preparar usando métodos bien conocidos en la técnica (por ejemplo, véase Sambrook y Russell, 2000, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, tercera edición, Cold Spring Harbor, Nueva York).

- 5 Alternativamente, los polipéptidos de la invención se pueden sintetizar por medios conocidos, tales como síntesis en fase líquida y en fase sólida (por ejemplo, síntesis de péptidos en fase sólida t-Boc y BOP-SPPS).

Las personas con experiencia en la materia apreciarán que la presente invención también incluye sales de adición de ácido o base farmacéuticamente aceptables de los polipéptidos que se han descrito anteriormente. Los ácidos 10 que se usan para preparar las sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables de los compuestos básicos mencionados anteriormente útiles en la presente invención son aquellos que forman sales de adición de ácido no tóxicas, es decir, sales que contienen aniones farmacológicamente aceptables, tales como sales de clorhidrato, bromhidrato, yodhidrato, nitrato, sulfato, bisulfato, fosfato, fosfato ácido, acetato, lactato, citrato, citrato ácido, tartrato, bitartrato, succinato, maleato, fumarato, gluconato, sacarato, benzoato, metanosulfonato, etanosulfonato, 15 bencenosulfonato, p-toluenosulfonato y pamoato [es decir, 1,1'-metilen-bis-(2-hidroxi-3) naftoato], entre otras.

También se pueden usar sales de adición de base farmacéuticamente aceptables para producir formas de sal farmacéuticamente aceptables de los polipéptidos. Las bases químicas que se pueden usar como reactivos para 20 preparar sales básicas farmacéuticamente aceptables de los presentes compuestos que son de naturaleza ácida son aquellas que forman sales básicas no tóxicas con tales compuestos. Tales sales básicas no tóxicas incluyen, pero no se limitan a, aquellas obtenidas a partir de cationes farmacológicamente aceptables tales como cationes de metales alcalinos (por ejemplo, potasio y sodio) y cationes de metales alcalinotérreos (por ejemplo, calcio y magnesio), sales de adición de amonio o amina soluble en agua tales como N-metilglucamina-(meolumina), y el 25 alanolamonio inferior y otras sales básicas de aminas orgánicas farmacéuticamente aceptables, entre otras.

25 Se apreciará además que los polipéptidos de la invención se pueden liofilizar para su almacenamiento y se pueden reconstituir en un vehículo adecuado antes de su uso. Se puede emplear cualquier método de liofilización adecuado (por ejemplo, secado por pulverización, secado de torta) y/o técnicas de reconstitución. Las personas con experiencia en la materia apreciarán que la liofilización y la reconstitución pueden conducir a diversos grados de 30 pérdida de actividad y que es posible tener que ajustar los niveles de uso al alza para compensar. Preferentemente, el polipéptido liofilizado (secado por congelación) pierde no más de aproximadamente un 20 %, o no más de aproximadamente un 25 %, o no más de aproximadamente un 30 %, o no más de aproximadamente un 35 %, o no más de aproximadamente un 40 %, o no más de aproximadamente un 45 %, o no más de aproximadamente un 50 % de su actividad (antes de la liofilización) cuando se rehidrata.

35 Los polipéptidos de la invención se proporcionan generalmente en forma de una composición terapéutica, en la que el polipéptido se formula junto con un tampón, diluyente, vehículo, adyuvante o excipiente farmacéuticamente aceptable. En las composiciones se pueden incluir compuestos adicionales, incluyendo agentes quelantes tales como EDTA, citrato, EGTA o glutatión. Las composiciones antimicrobianas/terapéuticas se pueden preparar de una 40 manera conocida en la técnica que sea suficientemente estable durante el almacenamiento y adecuada para su administración a seres humanos y animales. Las composiciones terapéuticas se pueden liofilizar, por ejemplo, mediante secado por congelación, secado por pulverización, enfriamiento por pulverización o mediante el uso de formación de partículas a partir de formación de partículas supercríticas.

45 Por "farmacéuticamente aceptable" los investigadores se refieren a un material no tóxico que no disminuye la eficacia de la actividad de tripsina del polipéptido de la invención. Tales tampones, vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables se conocen bien en la técnica (véase Pharmaceutical Sciences de Remington, 18^a edición, AR Gennaro, Ed., Mack Publishing Company (1990) y handbook of Pharmaceutical Excipients, 3^a edición, A. Kibbe, Ed., Pharmaceutical Press (2000)).

50 El término "tampón" pretende hacer referencia a una solución acuosa que contiene una mezcla de ácido-base con la finalidad de estabilizar el pH. Algunos 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 55 imidazoláctico, PIPES, SSC, SSPE, POPSO, TAPS, TABS, TAPSO y TES.

El término "diluyente" pretende hacer referencia a una solución acuosa o no acuosa con la finalidad de diluir el péptido en la preparación terapéutica. El diluyente puede ser uno o más de solución salina, agua, polietilenglicol, propilenglicol, etanol o aceites (tales como aceite de cártamo, aceite de maíz, aceite de cacahuete, aceite de semilla de algodón o aceite de sésamo).

60 El término "adyuvante" pretende hacer referencia a cualquier compuesto añadido a la formulación para incrementar el efecto biológico del polipéptido de la invención. El adyuvante puede ser una o más sales de cinc, cobre o plata con diferentes aniones, por ejemplo, pero sin limitarse a, fluoruro, cloruro, bromuro, yoduro, tiocianato, sulfito, hidróxido, fosfato, carbonato, lactato, glicolato, citrato, borato, tartrato, y acetatos de diferente composición de acilo. El adyuvante también puede ser polímeros catiónicos tales como éteres de celulosa catiónicos, ésteres de celulosa 65

- catiónicos, ácido hialurónico desacetilado, quitosano, dendrímeros catiónicos, polímeros sintéticos catiónicos tales como poli(vinil imidazol), y polipéptidos catiónicos tales como polihistidina, polilisina, poliarginina, y péptidos que contienen estos aminoácidos.
- 5 El excipiente puede ser uno o más de carbohidratos, polímeros, lípidos y minerales. Algunos ejemplos de carbohidratos incluyen lactosa, glucosa, sacarosa, manitol, y ciclodextrinas, que se añaden a la composición, por ejemplo, para facilitar la liofilización.
- 10 Algunos ejemplos de polímeros son almidón, éteres de celulosa, celulosa carboximetilcelulosa, hidroxipropilmelcelulosa, hidroxietilcelulosa, etilhidroxietilcelulosa, alginatos, carragenanos, ácido hialurónico y derivados de los mismos, ácido poliacrílico, polisulfonato, polietilenglicol/óxido de polietileno, copolímeros de óxido de polietileno/óxido de polipropileno, alcohol de polivinilo/acetato de polivinilo de diferente grado de hidrólisis, y polivinilpirrolidona, todos de diferente peso molecular, que se añaden a la composición, por ejemplo, para el control de la viscosidad, para lograr la bioadhesión o para proteger el lípido de la degradación química y proteolítica.
- 15 Algunos ejemplos de lípidos son ácidos grasos, fosfolípidos, mono, di y triglicéridos, ceramidas, esfingolípidos y glicolípidos, todos de diferente longitud de cadena de acilo y saturación, lecitina de huevo, lecitina de soja, lecitina de huevo y soja hidrogenada, que se añaden al composición por razones similares a las de los polímeros. Algunos ejemplos de minerales son talco, óxido de magnesio, óxido de cinc y óxido de titanio, que se añaden a la composición para obtener beneficios tales como la reducción de acumulación de líquido o propiedades pigmentarias ventajosas.
- 20 En una realización, el polipéptido se puede proporcionar junto con un estabilizante, tal como cloruro de calcio.
- 25 Los polipéptidos de la invención se pueden formular en cualquier tipo de composición terapéutica conocida en la técnica por ser adecuada para la administración de agentes polipeptídicos.
- 30 En una realización, los polipéptidos pueden disolverse simplemente en agua, solución salina, polietilenglicol, propilenglicol, etanol o aceites (tales como aceite de cártamo, aceite de maíz, aceite de cacahuete, aceite de semilla de algodón o aceite de sésamo), goma de tragacanto y/o diversos tampones. Por ejemplo, cuando el polipéptido se formula para administración oral (tal como en una pulverización bucal), la composición terapéutica puede comprender el polipéptido disuelto en agua, glicerol y mentol. En Escandinavia se comercializa una formulación de pulverización bucal a modo de ejemplo denominada *ColdZyme®* (de Enzymatica AB, Lund, Suecia).
- 35 En una realización preferente, la invención proporciona un polipéptido de proteasa tal como se ha descrito anteriormente en una solución osmóticamente activa. Por ejemplo, el polipéptido se puede formular en glicerol o glicerina. Sin deseas quedan unido a ninguna teoría, se cree que tales soluciones osmóticamente activas facilitan el movimiento de fluido desde el interior de las células microbianas al medio extracelular. A su vez, se cree que esto facilita el efecto terapéutico de los polipéptidos de la invención al crear una barrera china y activa que inhibe (al menos, en parte) la captación de células microbianas tales como bacterias y virus por las células epiteliales del hospedador, por ejemplo, de la faringe.
- 40 En una realización adicional, las composiciones terapéuticas de la invención se pueden presentar en forma de un liposoma, en el que el polipéptido se combina, además de otros vehículos farmacéuticamente aceptables, con agentes anfipáticos tales como lípidos, que existen en formas agregadas tales como micelas, monocapas insolubles y cristales líquidos. Algunos lípidos adecuados para formulación liposomal incluyen, pero no se limitan a, monoglicéridos, diglicéridos, sulfatidas, lisolecitina, fosfolípidos, saponina, ácidos biliares y similares. Algunos lípidos adecuados también incluyen los lípidos mencionados anteriormente modificados por poli(etylenglicol) en el grupo de cabeza polar para prolongar el tiempo de circulación en el torrente sanguíneo. La preparación de tales formulaciones liposomales se puede encontrar, por ejemplo, en el documento de patente US 4.235.871.
- 45 50 En una realización adicional, las composiciones terapéuticas de la invención también se pueden presentar en forma de microesferas biodegradables. Algunos poliésteres alifáticos, tales como poli(ácido láctico) (PLA), poli(ácido glicólico) (PGA), copolímeros de PLA y PGA (PLGA) o poli(capro-lactona) (PCL), y polianhídridos se han usado ampliamente como polímeros biodegradables en la producción de microesferas. Algunas preparaciones de tales microesferas se pueden encontrar en el documento de patente US 5.851.451 y en el documento de patente EP 0 213 303.
- 55 En una realización adicional, las composiciones terapéuticas de la invención se proporcionan en forma de geles poliméricos, en donde polímeros tales como almidón, éteres de celulosa, celulosa carboximetilcelulosa, hidroxipropilmelcelulosa, hidroxietilcelulosa, etilhidroxietilcelulosa, alginatos, carragenanos, ácido hialurónico y derivados de los mismos, poli(ácido acrílico), polivinil imidazol, polisulfonato, polietilenglicol/óxido de polietileno), copolímeros de óxido de polietileno/óxido de polipropileno, alcohol de polivinilo/poli(acetato de vinilo) de diferente grado de hidrólisis y polivinilpirrolidona se usan para espesar la solución que contiene el péptido. Los polímeros también pueden comprender gelatina o colágeno.
- 60 65 Se apreciará que las composiciones terapéuticas de la invención pueden incluir iones y un pH definido para potenciar la acción de los polipéptidos. Además, las composiciones se pueden someter a operaciones terapéuticas

convencionales tales como esterilización y/o pueden contener adyuvantes convencionales tales como conservantes, estabilizantes, agentes humectantes, emulsionantes, tampones, cargas, etc.

En una realización preferente, la composición terapéutica comprende el polipéptido en un tampón Tris o fosfato, junto con uno o más de EDTA, xilitol, sorbitol, propilenglicol y glicerol.

Una composición terapéutica particularmente preferente de la invención se describe en el Ejemplo A que sigue a continuación.

Las composiciones terapéuticas de acuerdo con la invención se pueden administrar mediante cualquier vía adecuada conocida por las personas con experiencia en la materia. Por lo tanto, las posibles vías de administración incluyen oral, bucal, tópica y nasal. También se describen otras vías de administración, tales como parenteral (intravenosa, subcutánea e intramuscular), ocular, pulmonar, parenteral, vaginal y rectal. También es posible la administración desde implantes.

En una realización preferente, las composiciones terapéuticas se administran por vía oral. Por ejemplo, el polipéptido se puede formular como una pulverización bucal, una pulverización nasal, pastilla para chupar, pastilla, chicle o líquido convencional para administración oral.

También se desvelan composiciones terapéuticas adecuadas para administración por vía parenteral, por ejemplo, por vía intravenosa, por vía intracerebroventricular, por vía intraarticular, por vía intraarterial, por vía intraperitoneal, por vía intratecal, por vía intraventricular, por vía intraesternal, por vía intracraneal, por vía intramuscular o por vía subcutánea, o mediante técnicas de infusión. Se usan de forma conveniente en forma de una solución acuosa estéril que puede contener otras sustancias, por ejemplo, sales o glucosa suficientes para hacer que la solución sea isotónica con la sangre. Las soluciones acuosas se deberían tamponar de forma adecuada (preferentemente a un pH de 3 a 9), si fuera necesario. La preparación de formulaciones parenterales adecuadas en condiciones estériles se logra fácilmente mediante técnicas farmacéuticas estándar bien conocidas por las personas con experiencia en la materia.

Algunas formulaciones adecuadas para administración parenteral incluyen soluciones inyectables estériles acuosas y no acuosas que pueden contener antioxidantes, tampones, agentes 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 agentes espesantes. Las formulaciones se pueden presentar en recipientes de dosis una sola dosis o de múltiples dosis, por ejemplo, ampollas y viales sellados, y se pueden almacenar en un estado congelado mediante secado (liofilizado) que solo requiere la adición del vehículo líquido estéril, por ejemplo, agua para inyecciones, inmediatamente antes de su uso. Para inyección extemporánea se pueden preparar soluciones y suspensiones a partir de polvos, gránulos y comprimidos estériles del tipo que se ha descrito anteriormente.

Alternativamente, las composiciones terapéuticas se pueden administrar por vía intranasal o mediante inhalación (por ejemplo, en forma de una presentación de pulverización en aerosol desde un recipiente presurizado, bomba, pulverización o nebulizador con el uso de un propelador adecuado, tal como díclorodifluometano, triclorofluorometano, díclorotetrafluoroetano, un hidrofluoroalcano tal como 1,1,1,2-tetrafluoroetano (HFA 134A3 o 1,1,1,2,3,3-heptafluoropropano (HFA 227EA3), dióxido de carbono u otro gas adecuado). En el caso de un aerosol presurizado, la unidad de dosificación se puede determinar proporcionando una válvula para administrar una cantidad medida. El recipiente presurizado, bomba, pulverización o nebulizador pueden contener una solución o suspensión del polipéptido activo, por ejemplo, usando una mezcla de etanol y el propelador como disolvente, que además puede contener un lubricante, por ejemplo, trioleato de sorbitán. Las cápsulas y cartuchos (hechos, por ejemplo, de gelatina) para su uso en un inhalador o insuflador se pueden formular para que contengan una mezcla de polvo de un compuesto de la invención y una base de polvo adecuada tal como lactosa o almidón.

Las composiciones terapéuticas se administrarán a un paciente en una dosis farmacéuticamente eficaz. Una "cantidad terapéuticamente eficaz", o "cantidad eficaz" o "terapéuticamente eficaz", como se usa en el presente documento, se refiere a la cantidad que proporciona un efecto terapéutico para una afección y un régimen de administración dados. Esta es una cantidad de material activo determinada previamente calculada para producir un efecto terapéutico deseado en asociación con el aditivo y diluyente requeridos, es decir, un excipiente o vehículo de administración. Además, se pretende que signifique una cantidad suficiente para reducir, y más preferentemente prevenir, un déficit clínicamente significativo en la actividad, función y respuesta del hospedador. Alternativamente, una cantidad terapéuticamente eficaz es suficiente para provocar una mejora en una afección clínicamente significativa en un hospedador. Como apreciarán las personas con experiencia en la materia, la cantidad de un compuesto puede variar dependiendo de su actividad específica. Algunas cantidades de dosificación adecuadas pueden contener una cantidad de composición activa determinada previamente calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el diluyente requerido. En los métodos y el uso para la preparación de formulaciones de la invención, se proporciona una cantidad terapéuticamente eficaz del componente activo. Una cantidad terapéuticamente eficaz la puede determinar el trabajador médico o veterinario con una experiencia habitual basándose en características del paciente, tales como edad, peso, sexo, estado, complicaciones, otras

- enfermedades, etc., como se conoce bien en la técnica. La administración de la dosis farmacéuticamente eficaz se puede realizar tanto mediante administración única en forma de una unidad de dosis individual o bien varias unidades de dosis menores como también mediante administraciones múltiples de dosis subdivididas a intervalos específicos. Alternativamente, la dosis se puede proporcionar como una infusión continua durante un periodo de tiempo prolongado.
- Los polipéptidos se pueden formular a diversas concentraciones, dependiendo de la eficacia/toxicidad del compuesto que se está usando. Preferentemente, la formulación comprende el agente activo una concentración entre 0,1 µM y 1 mM, más preferentemente entre 1 µM y 500 µM, entre 500 µM y 1 µM, entre 300 µM y 700 µM, entre 1 µM y 100 µM, entre 100 µM y 200 µM, entre 200 µM y 300 µM, entre 300 µM y 400 µM, entre 400 µM y 500 µM y lo más preferentemente aproximadamente 500 µM.
- Por lo tanto, la formulación terapéutica puede comprender una cantidad de un polipéptido, o fragmento, variante, fusión o derivado del mismo, suficiente para eliminar o retardar el crecimiento de microorganismos, tales como virus, bacterias y levaduras, dentro de la boca y/o faringe (por ejemplo orofaringe).
- La divulgación proporciona un método para el tratamiento o la prevención de infecciones microbianas en un sujeto con inmunodeficiencia, comprendiendo el método administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un polipéptido como se ha definido anteriormente.
- Algunas realizaciones a modo de ejemplo de la presente divulgación se han descrito anteriormente en relación con el primer aspecto de la invención.
- Se apreciará que la infección microbiana se puede seleccionar entre el grupo que consiste en infecciones bacterianas, infecciones virales, infecciones fúngicas e infecciones por levadura.
- En una realización, los polipéptidos de la invención son para uso en el tratamiento o la prevención de infecciones secundarias de la boca y/o la faringe (por ejemplo, orofaringe).
- Por ejemplo, los polipéptidos se pueden usar en el tratamiento o la prevención de rinorrea y/o infección fúngica de la cavidad oral y/o llagas en las encías.
- Tales infecciones microbianas se pueden tratar/prevenir de forma conveniente administrando un polipéptido de la invención en forma de una pulverización bucal, pulverización nasal, pastilla para chupar o similares. Tales formulaciones permiten la exposición del polipéptido de la invención a las membranas mucosas de la boca y/o faringe (por ejemplo orofaringe) durante un periodo de tiempo prolongado, tras lo cual la actividad de tripsina del polipéptido queda expuesta a microorganismos infiltrantes.
- Generalmente, el polipéptido de la invención se administrará de forma repetida durante un periodo de días, semanas o mayor.
- Las personas con experiencia en la materia apreciarán que los polipéptidos de la presente invención pueden ser para uso en combinación con uno o más agentes terapéuticos adicionales.
- Por ejemplo, los polipéptidos de la presente invención pueden ser para uso en combinación con:
- (a) agentes antibióticos convencionales (tales como cefalosporinas, tetraciclinas, aminoglicósidos y penicilinas);
 - (b) agentes antivirales (tales como oseltamivir y zanamivir); y/o
 - (c) agentes antifúngicos (tales como nistatina, clortrimazol y flucanozol).
- Además, los polipéptidos de la presente invención pueden ser para uso en combinación con remedios para el resfriado y la gripe "sin receta médica", por ejemplo analgésicos tales como paracetamol e ibuprofeno, y agentes descongestivos tales como fenilefrina.
- Las personas con experiencia en la materia apreciarán además que los usos y métodos de la presente invención tienen utilidad tanto en el campo médico como en el veterinario. Por lo tanto, los medicamentos polipeptídicos se pueden usar en el tratamiento de animales tanto humanos como no humanos (tales como caballos, perros y gatos).
- Sin embargo, preferentemente, el paciente es un ser humano.
- A continuación se describirán ejemplos preferentes, no limitantes, que incorporan ciertos aspectos de la invención. Se debería entender que los siguientes ejemplos se proporcionan a modo de ilustración. En la medida en que los ejemplos incluyan cualquier materia objeto que quede fuera del alcance de las reivindicaciones, se incluye simplemente con fines de referencia.
- Figura 1.** Porcentaje de diversos síntomas de infección a la semana para un paciente masculino de 12 años de

edad diagnosticado con CVID y tratado semanalmente con inyecciones subcutáneas de *Hizentra®* (IgG humana). Datos de valores de referencia recopilados durante 2012 y de enero a septiembre de 2013. El tratamiento con *ColdZyme®* se mantuvo durante 9 semanas de octubre a noviembre de 2013.

- 5 **Figura 2.** Promedio de días a la semana pasados en casa desde el colegio para un paciente masculino de 12 años de edad diagnosticado con CVID y tratado semanalmente con inyecciones subcutáneas de *Hizentra®* (IgG). Datos de valores de referencia recopilados durante 2012 y de enero a septiembre de 2013. El tratamiento con *ColdZyme®* se mantuvo durante 9 semanas de octubre a noviembre de 2013.

10 **Ejemplos**

Ejemplo A: formulación terapéutica a modo de ejemplo

- 15 Una solución de reserva a modo de ejemplo de un polipéptido de la invención, tripsina I de bacalao del Atlántico (SEQ ID NO: 1), se puede formular tal como se muestra en la Tabla 1:

Tabla 1

Descripción del artículo	Cantidad
Agua purificada	50 l
Glicerol	50 l
Solución de reserva de tampón Tris	1 l
Tripsina I de bacalao del Atlántico	300.000 U

20 El pH se ajusta a 7,5.

- 20 Una composición terapéutica adecuada de tripsina I de bacalao del Atlántico (SEQ ID NO: 1) también está disponible en el mercado como *ColdZyme®* (Enzymatica AB, Lund, Suecia).

Ejemplo B: estudio del caso

- 25 Paciente: Masculino de 12 años de edad
 Diagnóstico: CVID (inmunodeficiencia variable común)
 Historial de tratamiento: *Hizentra®*, inmunoglobulina subcutánea (Humana) Amoxicilina, oral
 Tratamiento: *ColdZyme®*, 1 U por dosis, 2 dosis al día

- 30 Desde 2003, el sujeto había recibido inyecciones subcutáneas semanales de inmunoglobulina humana (*Hizentra®*, 4 g a la semana). Sin embargo, antes del tratamiento con el polipéptido de la invención a finales de 2013, el sujeto padecía infecciones microbianas recurrentes de oídos, senos nasales, nariz, bronquios y pulmones. El sujeto presentaba frecuentemente rinorrea continua, crecimiento de hongos en la cavidad oral y gingivitis con heridas en las encías. Como consecuencia, la calidad de vida del sujeto se había visto gravemente comprometida y, por lo general, necesitaba quedarse en casa y no ir al colegio al menos un día a la semana. El mes de noviembre era a menudo un mes particularmente arduo para el sujeto, ya que las infecciones recurrentes a menudo se convertían en neumonía.

- 35 35 Un periodo de tratamiento profiláctico con amoxicilina desde agosto de 2012 hasta mayo de 2013 tuvo poco efecto en los síntomas recurrentes del sujeto.
 40 El sujeto comenzó el tratamiento dos veces al día (por la mañana y por la noche) con la pulverización bucal de *ColdZyme®* en octubre de 2013; la administración semanal de *Hizentra®* continuó durante este periodo de tiempo.

En tan solo tres días desde el inicio del tratamiento con *ColdZyme®*, el sujeto experimentó una notable mejoría en los síntomas y en la calidad de vida (véase la Tabla 2):

Tabla 2

Síntoma	Antes de <i>ColdZyme®</i>	Después de tres días de tratamiento con <i>ColdZyme®</i>
Rinorrea	Continua	Sin rinorrea
Nariz taponada	No es posible respirar por la nariz	Respirando por la nariz

Infección fúngica oral	Alta	Muy baja
Heridas en el tejido de las encías	Alta	Muy baja (curado por primera vez en varios años)

El efecto del tratamiento con *ColdZyme®* también se puede ver claramente en las Figuras 1 y 2.

La Figura 1 (A) muestra el porcentaje de diversos síntomas de infección a la semana experimentados por el sujeto durante tres períodos de tiempo:

- (a) Durante todo el año 2012 (tratamiento = *Hizentra®* y amoxicilina);
- (b) De enero a septiembre de 2013 (tratamiento = *Hizentra®* y amoxicilina); y
- (c) De octubre de 2013 a noviembre de 2013 (tratamiento = *Hizentra®* y *ColdZyme®*).

La reducción espectacular de todos los síntomas de infección observados durante el periodo de tratamiento con *ColdZyme®* es evidente inmediatamente.

La Figura 1(B) muestra el porcentaje de diversos síntomas de infección a la semana experimentados por el mismo sujeto durante un periodo de estudio prolongado de 58 semanas.

La Figura 2(A) muestra el número promedio de días a la semana que el sujeto estuvo ausente del colegio debido a la gravedad de los síntomas de infección durante los mismos tres períodos de tiempo en la Figura 1. La mejora espectacular después del inicio del tratamiento con *ColdZyme®* de nuevo es evidente inmediatamente.

El inicio de acción tan rápido y la erradicación casi total de los síntomas de infección en el sujeto mediante el tratamiento con el polipéptido de la invención fue totalmente inesperado, en particular dado que el periodo de tratamiento inicial (octubre-noviembre) coincidió con la época del año durante la cual el sujeto por lo general, experimentaba las infecciones más graves. Es comprensible que tanto el sujeto como su madre estuvieran encantados por la mejora de la calidad de vida después de diez años de infecciones recurrentes debilitantes.

La Figura 2(B) muestra el número promedio de días a la semana que el sujeto estuvo ausente del colegio debido a la gravedad de los síntomas de infección durante el mismo periodo de estudio prolongado en la Figura 1(B).

30 **Ejemplo C - Producción de polipéptidos de serina proteasa recombinantes**

Clonación

Un gen sintetizado que codifica el polipéptido de serina proteasa de interés se clonó en el vector E3 de expresión de *E. coli* (GenScript) sin ninguna etiqueta.

El ácido nucleico que codifica la tripsina I de tipo natural de bacalao del Atlántico se muestra a continuación en la SEQ ID NO: 4 (en pUC57)

```

1   GAAGAAGATA AAATCGTTGG CGGCTATGAA TGCACGAAAC ACTCGCAGGC ACACCAGGTC
61  TCACTGAACA GCGGTTACCA CTTTGCGGC GGTAGTCTGG TTAGCAAAGA TTGGGTTGTT
121 AGTGCAGGCC ATTGCTATAA AAGCGTGCTG CGTGTTCGCC TGGGCGAACCA TCACATTCTG
181 GTGAATGAAG GCACCGAACAA GTACATTAGC TCTAGTAGCG TTATCCGCCA TCCGAACTAC
241 TCTAGTTACA ACATCAACAA CGATATCATG CTGATCAAAC TGACCAAACCG GGCGACGCTG
301 AACCAAGTATG TGCACGCCGT TGCACGCCG ACCGAATGCG CAGCGGATGC AACCATGTGT
361 ACCGTGAGCG GCTGGGGTAA TACGATGAGC TCTGTTGCCG ATGGCGATAA ACTGCAGTGC
421 CTGTCTCTGC CGATTCTGAG TCATGCGGAT TGTGCCAACT CTTATCCGGG CATGATCACG
481 CAGAGCATGT TTTGCGCCGG TTACCTGGAA GGCGGTAAAG ATAGCTGCCA GGGTGATTCT
541 GGCGGTCCGG TGGTTGTAA CGGCGTTCTG CAGGGTGTGG TTAGCTGGGG CTACGGTTGT
601 GCAGAACGTG ATCACCCGGG TGTCTATGCT AAAGTCTGTG TGCTGTCGGG CTGGGTCCGT
661 GATACGATGG CGAACTAT

```

[SEQ ID NO: 4]

Se sintetizó un número de moléculas de ácido nucleico que codifican versiones mutadas de tripsina I de bacalao del Atlántico mediante técnicas convencionales, es decir, mutagénesis dirigida por PCR.

Replegamiento y purificación de tripsina

- 5 Las células BL21 (DE3) *químicamente competentes* de *E. coli* se transformaron con el vector E3 que contiene la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido de serina proteasa (tripsina) de interés usando procedimientos estándar, es decir, transformación mediante choque térmico.
- 10 El polipéptido de zimógeno (tripsinógeno) se sobreexpresó y formó cuerpos de inclusión en el citoplasma de las células hospedadoras.
- 10 Las células, después de la inducción, se recolectaron y sometieron a lisis mediante tratamiento con ultrasonidos. Despues de la centrifugación, los cuerpos de inclusión se lavaron en tampón (Tris 50 mM, EDTA 10 mM, Triton X-100 al 2 %, NaCl 300 mM, DTT 2 mM, pH 8,0) y se disolvieron en Tris 50 mM, urea 8 M, pH 8,0 y A continuación se sometido a diálsis en 1 x PBS, glicerol al 10 % , pH 7,4 a 4 °C durante la noche.
- 15 La pureza del polipéptido de zimógeno expresado a partir del replegamiento exhibió una pureza >90 % y no se consideró necesaria ninguna otra purificación.
- 20 El polipéptido de zimógeno recombinante se activó a continuación mediante la adición de tripsina I de tipo natural purificada de bacalao del Atlántico (0,2 U/ml) e incubando a temperatura ambiente durante 24 horas (véase el Ejemplo D).

Polipéptidos a modo de ejemplo

- 25 Se obtuvieron o se produjeron los siguientes polipéptidos:
- (a) Tripsina I de tipo natural purificada a partir de de bacalao del Atlántico ("WT-Tryp" o "tipo natural");
- 30 (b) Tripsina I de tipo natural expresada de forma recombinante de bacalao del Atlántico (SEQ ID NO: 1, "R-Tryp"); y
- (c) Treinta y ocho versiones mutadas diferentes de tripsina I de bacalao del Atlántico (es decir, secuencias mutadas de SEQ ID NO: 1).
- 35 Las mutaciones de la secuencia de las treinta y ocho versiones mutadas diferentes de tripsina I de bacalao se muestran en la Tabla 3 que sigue a continuación.

Tabla 3

Secuencias de polipéptidos de tripsina a modo de ejemplo	
Nombre del polipéptido	Mutaciones con respecto a la SEQ ID NO: 1*
EZA-001	(ninguna)
EZA-002	N240S, Y241N, S87K
EZA-003	K154T
EZA-004	K154L
EZA-005	K154V
EZA-006	K154E
EZA-007	N98T
EZA-008	I99L
EZA-009	L185G, P225Y
EZA-010	V212I
EZA-011	Y217D, M175K
EZA-012	Y217H
EZA-013	Y217S
EZA-014	A229V
EZA-015	H25Y

EZA-016	H25N
EZA-017	H29Y
EZA-018	H71D
EZA-019	H72N
EZA-020	R74K
EZA-021	R74E
EZA-022	N76T
EZA-023	N76L, Y82F
EZA-024	T79S
EZA-025	T79N
EZA-026	K49E, D50Q
EZA-027	S87R
EZA-028	E21T, H71D, D150S, K154V
EZA-029	S179N, V233N
EZA-030	M135Q
EZA-031	M145K, V148G
EZA-032	M175Q
EZA-033	L63I, S85A
EZA-034	L160I
EZA-035	V138I, L160A, A183V
EZA-036	V121I
EZA-037	V47I, V238I, M242I
EZA-038	V238I
EZA-039	L234Y

* la numeración del aminoácido se realiza de acuerdo con la entrada "2EEK!" en el banco de datos de proteínas (Protein Data Bank (PDB))

Los polipéptidos de tripsina a modo de ejemplo se expresaron inicialmente como un polipéptido de zimógeno con el péptido de activación MEEDK (SEQ ID NO: 5) fusionado al extremo N-terminal.

5 **Ejemplo D: Estabilidad de formas mutantes y de tipo natural de tripsina I de bacalao del Atlántico, expresadas de forma recombinante**

Este ejemplo resume los resultados de la activación de 39 mutantes de tripsina recombinante expresados en *E. coli*. La actividad de los polipéptidos de tripsina recombinante (R-Tryp) fue activada por tripsina I de tipo natural purificada de bacalao del Atlántico (WT-Tryp) después de un periodo de incubación de 24 horas.

Materiales y métodos

Expresión de tripsinas recombinantes

15 Véase el Ejemplo C

Evaluación de la estabilidad

20 El experimento diseñado para el análisis de activación y estabilidad de las muestras recombinantes se llevó a cabo como sigue a continuación:

Día 1: Activación de tripsina recombinante

Las enzimas recombinantes (0,2 U/ml) se activaron con tripsina de tipo natural (0,2 U/ml) a temperatura ambiente durante 24 horas en una placa de microtitulación. Las muestras se mezclaron con Tris-HCl 20 mM, CaCl₂ 1 mM, glicerol al 50 %, pH 7,6 hasta un volumen final de 200 µl.

5 Día 2: Mediciones de actividad y estabilidad

Las enzimas recombinantes activadas se transfirieron a una nueva placa de microtitulación (II) y se mantuvieron en hielo para mantener estables las enzimas y detener el proceso de activación.

10 (a) Determinación de la actividad inicial A₀

La actividad de la enzima activada (A₀) se determinó en una nueva placa de microtitulación (III) mezclando 245 µl de Gly-Pro-Arg en tampón de ensayo, con 5 µl de enzima recombinante de la placa de microtitulación (II). Se siguió la absorbancia a 410 nm y la actividad se calculó de acuerdo con la siguiente fórmula:

15

$$\text{U/ml} = \mu\text{mol/l.s} = \frac{\text{Pendiente}_{410\text{nm}} * df * 60 * 10^3}{\epsilon^* l^*} \quad (1)$$

20 donde pendiente es la pendiente de la regresión lineal de la medición cinética de la actividad de la tripsina a 30 °C durante 200 segundos; df es el factor de dilución, 60 es la conversión de segundos a minutos, ε es el coeficiente de extensión igual a 8800 M⁻¹ cm⁻¹, l es la longitud de la trayectoria de la luz igual a 0,7109 cm, 10³ es la conversión de mol/l a µmol/ml.

(b) Inactivación por temperatura

25 Se transfirieron 100 µl de la enzima activada de la placa de microtitulación (II) a una nueva placa de microtitulación (IV) y se diluyó a 200 µl hasta una concentración final de glicerol al 50 %, pH 7,6. La placa (IV) se incubó a 60 °C durante 3,5 horas (WT-Tryp pierde un 90 % de la actividad inicial). La actividad restante se determinó como en (a).

30 Día 3: Autocatálisis

30 Se transfirieron 100 µl de la enzima activada de la placa de microtitulación (II) a una nueva placa de microtitulación (V) que contenía 100 µl de 0,1 U/ml de tripsina en glicerol al 25 % y tampón de ensayo, pH 7,6. La placa se incubó a 25 °C durante 8 horas (WT-Tryp pierde un 90 % de la actividad inicial). La actividad (A_{AX}) se determinó como se ha descrito en (a).

35

Resultados

40 En la tabla 4 (tripsina de bacalao de tipo natural recombinante, EZA-001, y treinta y ocho mutantes de la misma) se informa de actividad, termoestabilidad y autocatálisis de treinta y nueve polipéptidos de serina proteasa A modo de ejemplo. Existe una diferencia considerable en la actividad entre los mutantes. Varios mutantes expresaron una estabilidad de temperatura mejorada en comparación con la tripsina de tipo natural que solo tenía un 5 % de actividad restante y varios mutantes mostraron estabilidades autocatalíticas considerablemente mejoradas en comparación con la tripsina de tipo natural.

Tabla 4
Actividad de 39 polipéptidos de serina proteasa a modo de ejemplo

ID. de la muestra	Actividad inicial A0 (U/mg)	Termoestabilidad: actividad restante después de la inactivación a 60 °C, Ax (U/ml)	Estabilidad autocatalítica: actividad restante después de la inactivación a 25 °C, Ac (U/ml)	Termoestabilidad relativa (Ax/A0)	Estabilidad autocatalítica relativa (Ac/A0)
EZA001	0,52	0,10	0,07	0,20	0,13
EZA002	0,48	0,05	0,01	0,11	0,02
EZA003	0,52	0,09	0,05	0,18	0,09
EZA004	0,48	0,09	0,04	0,19	0,07
EZA005	0,36	0,07	0,02	0,19	0,06
EZA006	0,39	0,10	0,03	0,26	0,07
EZA007	0,30	0,10	0,01	0,33	0,04
EZA008	0,36	0,11	0,09	0,31	0,26
EZA009	0,35	0,06	0,03	0,16	0,09
EZA010	0,44	0,12	0,12	0,28	0,28
EZA011	0,36	0,10	0,11	0,28	0,31
EZA012	0,35	0,13	0,11	0,37	0,31
EZA013	0,36	0,07	0,05	0,20	0,13
EZA014	0,41	0,10	0,07	0,25	0,17
EZA015	0,39	0,09	0,11	0,24	0,27
EZA016	0,36	0,22	0,21	0,60	0,56
EZA017	0,35	0,14	0,15	0,41	0,42
EZA018	0,39	0,05	0,02	0,13	0,04
EZA019	0,37	0,10	0,10	0,27	0,27
EZA020	0,39	0,07	0,03	0,19	0,08
EZA021	0,38	0,11	0,09	0,30	0,23
EZA022	0,49	0,09	0,17	0,18	0,34
EZA023	0,39	0,18	0,16	0,47	0,41
EZA024	0,43	0,09	0,07	0,21	0,17
EZA025	0,39	0,17	0,14	0,43	0,37
EZA026	0,33	0,15	0,15	0,44	0,46
EZA027	0,34	0,10	0,06	0,30	0,17
EZA028	0,35	0,16	0,18	0,45	0,51
EZA029	0,35	0,16	0,16	0,46	0,45
EZA030	0,33	0,16	0,11	0,50	0,33
EZA031	0,40	0,14	0,15	0,35	0,36

EZA032	0,44	0,07	0,02	0,16	0,03
EZA033	0,42	0,12	0,10	0,27	0,24
EZA034	0,41	0,13	0,11	0,31	0,27
EZA035	0,42	0,12	0,16	0,29	0,38
EZA036	0,38	0,11	0,13	0,30	0,34
EZA037	0,36	0,10	0,16	0,27	0,44
EZA038	0,41	0,08	0,05	0,20	0,12
EZA039	0,38	0,10	0,04	0,26	0,11
Tipo natural	0,16	0,01	0,01	0,05	0,08

Ejemplo E: Medición de la actividad de formas mutadas recombinantes de tripsina I de bacalaoMateriales y métodos

5

Expresión de polipéptidos recombinantes10
10 Ejemplo C.

Los polipéptidos que corresponden a la secuencia de aminoácidos de tipo natural de tripsina I de bacalao del Atlántico y treinta y ocho versiones mutadas de la misma se produjeron usando los métodos que se describen en el

Activación15
15

La activación de las enzimas recombinantes (aproximadamente 0,01 mg/ml) se logró mediante la adición de tripsina de tipo natural (0,2 U/ml) a temperatura ambiente y se incubó durante 24 horas. La mezcla se preparó en Tris-HCl 20 mM, CaCl₂ 1 mM, glicerol al 50 %, pH 8,0 hasta un volumen final de 200 µl.

Ensayo de actividad para determinar constantes cinéticas20
20

El sustrato (Gly-Pro-Arg) se usó a concentraciones de 0,005-0,15 mM en tampón de ensayo que contenía DMSO al 1 %. Se pipetaron 245 µl de soluciones de sustrato en una placa de 96 pocillos. La reacción se inició añadiendo 5 µl de la mezcla de muestra (parte superior) y se monitorizó a 410 nm en un lector de placas SpectraMax. La medición cinética se realizó cada minuto de una ejecución continua de 15 minutos.

25

Resultados

Los resultados se muestran en la Tabla 5 que sigue a continuación.

Tabla 5

Muestra	Parámetro	Valor	Con respecto a WT-Trp
WT-Trp	Vmáx. (Kcat)	0,05372	100
(purificada)	Km	0,00125	100
	Vmáx. /Km	43,07	100
EZA-001	Vmáx.	0,05309	99
	Km	0,00087	70
	Vmáx. /Km	61,10	142
EZA-002	Vmáx.	0,05292	99
	Km	0,00110	88
	Vmáx. /Km	48,09	112

ES 2 890 555 T3

EZA-003	Vmáx.	0,05162	96
	Km	0,00050	40
	Vmáx. /Km	104,07	242
EZA-004	Vmáx.	0,04380	82
	Km	0,00123	99
	Vmáx. /Km	35,47	82
EZA-005	Vmáx.	0,05162	96
	Km	0,00094	75
	Vmáx. /Km	54,95	128
EZA-006	Vmáx.	0,05289	98
	Km	0,00095	76
	Vmáx. /Km	55,81	130
EZA-007	Vmáx.	0,05313	99
	Km	0,00114	91
	Vmáx. /Km	46,72	108
EZA-008	Vmáx.	0,05084	95
	Km	0,00083	67
	Vmáx. /Km	60,90	141
EZA-009	Vmáx.	0,05287	98
	Km	0,00087	70
	Vmáx. /Km	60,98	142
EZA-010	Vmáx.	0,05046	94
	Km	0,00085	68
	Vmáx. /Km	59,44	138
EZA-011	Vmáx.	0,05045	94
	Km	0,00077	62
	Vmáx. /Km	65,55	152
EZA-012	Vmáx.	0,04208	78
	Km	0,00101	81
	Vmáx. /Km	41,74302	97

ES 2 890 555 T3

EZA-013	Vmáx.	0,05006	93
	Km	0,00068	55
	Vmáx. /Km	73,65	171
EZA-014	Vmáx.	0,05177	96
	Km	0,00083	66
	Vmáx. /Km	62,64	145
EZA-015	Vmáx.	0,05060	94
	Km	0,00085	68
	Vmáx. /Km	59,36	138
EZA-016	Vmáx.	0,05378	100
	Km	0,00103	83
	Vmáx. /Km	51,99	121
EZA-017	Vmáx.	0,05457	102
	Km	0,00104	83
	Vmáx. /Km	52,53124	122
EZA-018	Vmáx.	0,05962	111
	Km	0,00198	159
	Vmáx. /Km	30,04	70
EZA-019	Vmáx.	0,05408	101
	Km	0,00115	92
	Vmáx. /Km	47,21	110
EZA-020	Vmáx.	0,04421	82
	Km	0,00095	76
	Vmáx. /Km	46,77	109
EZA-021	Vmáx.	0,05309	99
	Km	0,00128	103
	Vmáx. /Km	41,41	96
EZA-022	Vmáx.	0,05436	101
	Km	0,00119	95
	Vmáx. /Km	45,85	106
EZA-023	Vmáx.	0,05470	102

ES 2 890 555 T3

	Km	0,00137	110
	Vmáx. /Km	40,06	93
EZA-024	Vmáx.	0,05120	95
	Km	0,00098	78
	Vmáx. /Km	52,36	122
EZA-025	Vmáx.	0,05145	96
	Km	0,00090	72
	Vmáx. /Km	57,43	133
EZA-026	Vmáx.	0,05042	94
	Km	0,00084	68
	Vmáx. /Km	59,70	139
EZA-027	Vmáx.	0,05195	97
	Km	0,00094	76
	Vmáx. /Km	55,01	128
EZA-028	Vmáx.	0,04167	78
	Km	0,00076	61
	Vmáx. /Km	54,60	127
EZA-029	Vmáx.	0,05058	94
	Km	0,00091	73
	Vmáx. /Km	55,40	129
EZA-030	Vmáx.	0,05109	95
	Km	0,00080	65
	Vmáx. /Km	63,47	147
EZA-031	Vmáx.	0,05174	96
	Km	0,00103	83
	Vmáx. /Km	50,07	116
EZA-032	Vmáx.	0,06226	116
	Km	0,00246	197
	Vmáx. /Km	25,31	59
EZA-033	Vmáx.	0,05942	111
	Km	0,00166	133

ES 2 890 555 T3

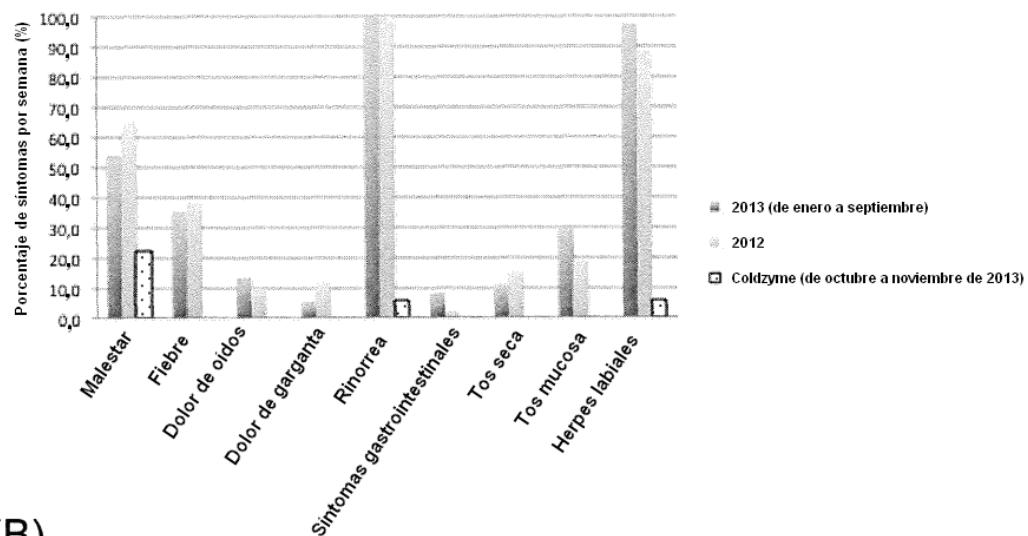
	Vmáx. /Km	35,80	83
EZA-034	Vmáx.	0,05672	106
	Km	0,00144	116
	Vmáx. /Km	39,29	91
EZA-035	Vmáx.	0,05807	108
	Km	0,00162	130
	Vmáx. /Km	35,79	83
EZA-036	Vmáx.	0,04887	91
	Km	0,00210	168
	Vmáx. /Km	23,28	54
EZA-037	Vmáx.	0,05754	107
	Km	0,00172	138
	Vmáx. /Km	33,54	78
EZA-038	Vmáx.	0,05786	108
	Km	0,00157	126
	Vmáx. /Km	36,74	85

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido que tiene actividad de proteasa para uso en el tratamiento o prevención de infecciones microbianas en un sujeto con una inmunodeficiencia
- 5 en donde el polipéptido comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, o un fragmento de al menos 15 aminoácidos contiguos de SEQ ID NO: 1, o una variante de la misma que tiene al menos un 90 % de identidad con SEQ ID NO: 1 que retiene la actividad de tripsina de dicha secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1
- 10 en donde el polipéptido se proporciona en una forma adecuada para administración a la mucosa de la boca y/o la faringe y en donde la infección microbiana se selecciona entre el grupo que consiste en infecciones secundarias de la boca y la faringe.
- 15 2. Un polipéptido para uso de acuerdo con la reivindicación 1 en donde la inmunodeficiencia es una inmunodeficiencia secundaria o adquirida.
- 20 3. Un polipéptido para uso de acuerdo con la reivindicación 1 en donde el sujeto tiene una inmunodeficiencia primaria.
- 25 4. Un polipéptido para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes en donde el polipéptido es para uso en el tratamiento o la prevención de rinorrea y/o infección fúngica de la cavidad oral y/o llagas en las encías.
- 30 5. Un polipéptido para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes en donde el polipéptido comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 1.
- 35 6. Un polipéptido para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 en donde el polipéptido comprende o consiste en un fragmento de la secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 1.
- 40 7. Un polipéptido para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 en donde el polipéptido comprende o consiste en una variante de la secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 1, en donde la variante tiene una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 95 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 1 o un fragmento de la misma.
- 45 8. Un polipéptido para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 y 7 en donde el polipéptido que tiene actividad de proteasa es una variante de SEQ ID NO: 1, que comprende uno o más aminoácidos mutados seleccionados entre el grupo que consiste en las posiciones de aminoácido E21, H25, H29, V47, K49, D50, L63, H71, H72, R74, N76, T79, Y82, S85, S87, S89, N98, I99, V121, M135, V138, M145, V148, D150, K154, L160, M175, S179, A183, L185, V212, Y217, P225, A229, V233, L234, V238, N240, Y241 y/o M242 o un fragmento de la misma que exhibe una actividad antimicrobiana.
- 50 9. Un polipéptido para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 y 7 a 9 en donde el polipéptido que tiene actividad de proteasa es una variante de SEQ ID NO: 1, que comprende una o más mutaciones de aminoácido seleccionadas entre el grupo que consiste en las posiciones de aminoácido E21T, H25Y, H29(Y/N), V47I, K49E, D50Q, L63I, H71D, H72N, R74(K/E), N76(T/L), T79(S/N), Y82F, S85A, S87(K/R), S89R, N98T, I99L, V121I, M135Q, V138I, M145(T/L/V/E/K), V148G, D150S, K154(T/V), L160(I/A), M175(K/Q), S179N, A183V, L185G, V212I, Y217(D/H/S), P225Y, A229V, V233N, L234Y, V238I, N240S, Y241N y/o M242I.

FIGURA 1

(A)



(B)

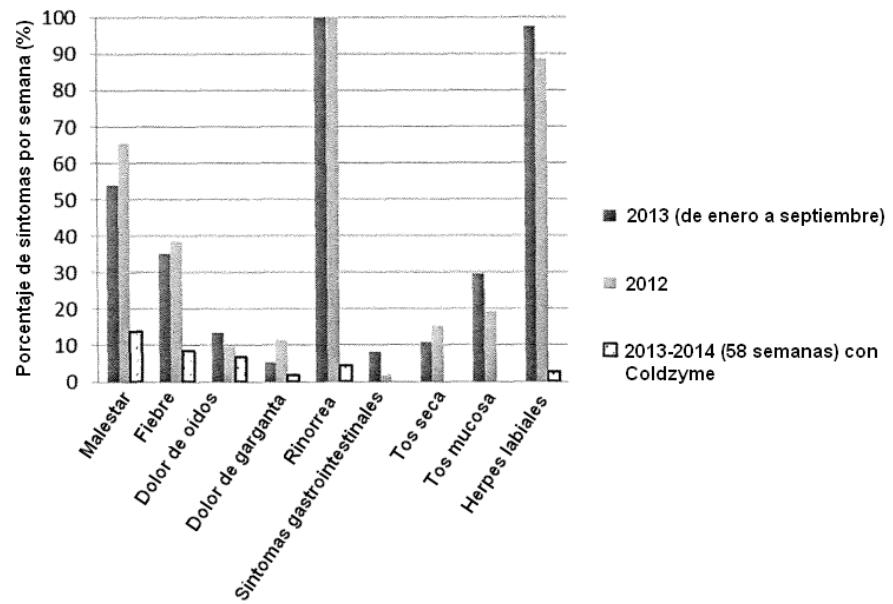
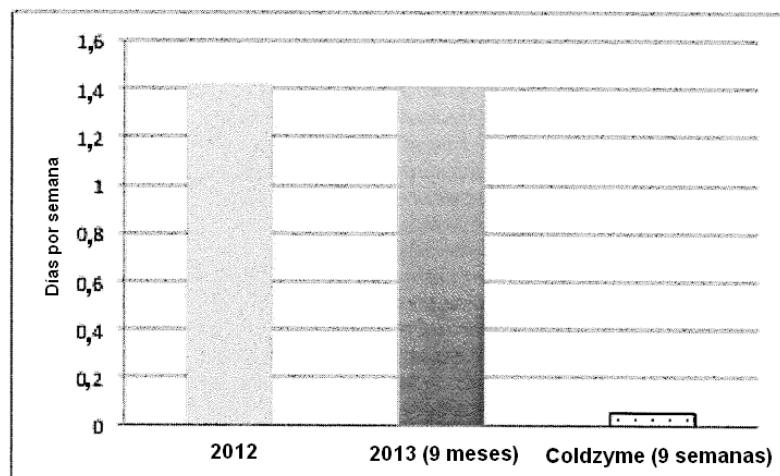


FIGURA 2

(A)



(B)

