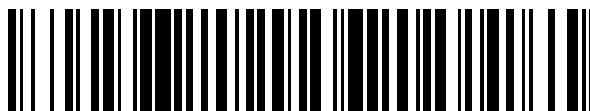


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 622 522**

51 Int. Cl.:

C12N 15/62 (2006.01)

C07K 14/81 (2006.01)

C07K 16/00 (2006.01)

A61K 38/57 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.08.2004** **E 12003146 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.02.2017** **EP 2520654**

54 Título: **Inhibidores de la actividad proteasa de serina y su uso en métodos y composiciones para el tratamiento de infecciones bacterianas**

30 Prioridad:

26.08.2003 US 497703 P

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

06.07.2017

73 Titular/es:

**THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF
COLORADO, A BODY CORPORATE (100.0%)
1800 Grant Street, 8th Floor
Denver, CO 80203, US**

72 Inventor/es:

SHAPIRO, LELAND

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 622 522 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

Inhibidores de la actividad proteasa de serina y su uso en métodos y composiciones para el tratamiento de infecciones bacterianas

Campo de la invención

- 5 La presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende una proteína de fusión, para uso en un método para tratar a un sujeto; una composición farmacéutica que comprende un ácido nucleico que codifica una proteína de fusión para uso en un método para tratar a un sujeto; y un ácido nucleico que codifica una proteína de fusión para uso como medicamento.

Antecedentes de la invención**10 Proteasas de serina**

Las proteasas de serina tienen un papel importante en la fisiología humana mediando en la activación de funciones vitales. Además de su función fisiológica normal, las proteasas de serina están implicadas en una serie de afecciones patológicas en los seres humanos. Las proteasas de serina se caracterizan por una tríada catalítica que consiste en ácido aspártico, histidina y serina en el sitio activo.

- 15 Los inhibidores de proteasas de serina de origen natural son generalmente, pero no siempre, polipéptidos y proteínas que se han clasificado en familias, basándose principalmente en el patrón de enlaces disulfuro y la homología de secuencia del sitio reactivo. Los inhibidores de proteasas de serina que incluyen el grupo conocido como serpinas, se han encontrado en microbios, en tejidos y fluidos de plantas, animales, insectos y otros organismos. Las actividades inhibitoras de proteasas se descubrieron primero en plasma humano por Fermi y Pemossi en 1894. Hasta la fecha, se han identificado al menos nueve proteínas distintas, bien caracterizadas, que comparten la capacidad de inhibir la actividad de diversas proteasas. Varios de los inhibidores se han agrupado juntos, a saber el inhibidor de proteasa α_1 -antitripsina, antitrombina III, antiquimotripsina, inhibidor de C1 y α_2 -antiplasmina, que están dirigidos contra diversas proteasas de serina, es decir, elastasa de leucocitos, trombina, catepsina G, quimotripsina, activadores del plasminógeno y plasmina. Estos inhibidores son miembros de la clase de inhibidores de proteasas α_1 -antitripsina. La proteína α_2 -macroglobulina inhibe miembros de las cuatro clases catalíticas: serina, cisteína, aspártico y metaloproteasas. Sin embargo, otros tipos de inhibidores de proteasas son específicos de la clase. Por ejemplo, el inhibidor de proteasa α_1 -antitripsina (también conocido como α_1 -antitripsina o AAT) y el inhibidor de la inter-alfa-tripsina, inhiben solo proteasas de serina, el inhibidor de proteasa α_1 -cisteína inhibe proteasas de cisteína, y la α_1 -anticolagenasa inhibe enzimas colagenolíticas de la clase metaloenzimas.

- 30 La elastasa de neutrófilos humana (NE) es una enzima proteolítica secretada por leucocitos polimorfonucleares como respuesta a una variedad de estímulos inflamatorios. La capacidad degradativa de NE, en circunstancias normales, está modulada por concentraciones en plasma relativamente altas de α_1 -antitripsina. Sin embargo, los neutrófilos estimulados producen una ráfaga de metabolitos de oxígeno activo, y algunos de los cuales (ácido hipocloroso, por ejemplo) son capaces de oxidar un residuo de metionina decisivo en la α_1 -antitripsina. Se ha observado que la α_1 -antitripsina oxidada tiene una potencia limitada como inhibidor de NB y se ha propuesto que la alteración de este equilibrio proteasa/antiproteasa permite que NE lleve a cabo sus funciones de degradación en entornos localizados y controlados.

- 40 La α -antitripsina es una glucoproteína de PM 51.000 con 417 aminoácidos y 3 cadenas laterales de oligosacáridos. La α_1 -antitripsina humana se denominó anti-tripsina debido a su capacidad descubierta inicialmente de inactivar la tripsina pancreática. La α_1 -antitripsina humana es una única cadena polipeptídica sin enlaces disulfuro internos y solo un único residuo de cisteína está ligado con cisteína o glutatión, normalmente de forma intermolecular, a través de un puente disulfuro. El sitio reactivo de la α_1 -antitripsina contiene un residuo de metionina, que es lábil frente a la oxidación después de la exposición al humo de tabaco o a otros contaminantes oxidantes. Tal oxidación reduce la actividad biológica de la α_1 -antitripsina; por lo tanto, la sustitución por otro aminoácido en esa posición, es decir, alanina, valina, glicina, fenilalanina, arginina o lisina, produce una forma de α_1 -antitripsina que es más estable. La α_1 -antitripsina se puede representar por la siguiente fórmula:

1 0 1 0 1 0 1 0 1 0

MPSSVSWGIL LAGLCCLVPV SLAEDPQGD A QKTDTSHH D QDHPTFNKIT

PNLAEFAFSL YRQLAHQSNS TNIFFSPVSI ATAFAMLSLG TKADTHDEIL 100

EGLNFNLTEI PEAQIHEGFQ ELLRTL NQPD SQLQLTTGNG LFLSEGLKLV

DKFLEDVKKL YHSEAFVNF GDHEEAKQOI NDYVEKGTQG KIVDLVKELD 200

RDTVFALVNY IFFK GKWERP FEVKDTEDED FHV DQVTVK VPMKRLGMF
 NIQHCKKLSS WVLLMKYLG NATAIFFLPDE GKQLHLENEL THDIITKFL E 300
 NEDRRSASLH LPKLSITGTY DLKSVLGQLG ITKVFSNGAD LSGVTEEAPL
 KLSKAVHKAV LTIDEKGTEA AGAMFLEAIP MSIPPEVKFN KPFVFLMIEQ 400
 NTKSPLFMGK VVNPTQK 417
 (SEQ ID NO:61)

Ciliberto, et al., en Cell 1985, 41, 531-540. La secuencia de aminoácidos decisiva cerca del extremo carboxiterminal de la α 1-antitripsina se muestra en negrita y subrayada y es relevante para esta invención (los detalles de la secuencia se pueden encontrar por ejemplo en el documento de Patente de EE.UU. nº 5.470.970).

5 La concentración plasmática normal de ATT oscila entre 1,3 a 3,5 mg/ml, a pesar de que puede comportarse como un reactivo de fase aguda y aumenta 3-4 veces durante la respuesta de un hospedador frente a una inflamación y/o una lesión de los tejidos, como durante el embarazo, infección aguda y tumores. Difunde fácilmente a los espacios tisulares y forma un complejo 1:1 con una proteasa diana, principalmente la elastasa de neutrófilos. Otras enzimas tales como tripsina, quimotripsina, catepsina G, plasmina, trombina, calicreína tisular y factor Xa, también pueden servir como sustratos. El complejo enzima/inhibidor se retira a continuación de la circulación mediante la unión a un receptor del complejo serpina-enzima (SEC) y se cataboliza en el hígado y el bazo. Los seres humanos con niveles circulantes de α 1-antitripsina inferiores al 15% de lo normal, son susceptibles de desarrollar una enfermedad pulmonar, por ejemplo, enfisema familiar, a una edad temprana. El enfisema familiar se asocia con bajas proporciones de α 1-antitripsina frente a proteasas de serina, particularmente elastasa. Por lo tanto, parece que este inhibidor representa una parte importante del mecanismo de defensa contra un ataque de las proteasas de serina.

15 La α 1-antitripsina es uno de los pocos inhibidores de proteasas de serina de mamíferos de origen natural que está aprobada actualmente para el tratamiento clínico de un desequilibrio de proteasas. La α 1-antitripsina terapéutica ha estado disponible comercialmente desde mediados de los años 80 y se prepara por varios métodos de purificación (véase, por ejemplo, Bollen et al., documento de EE.UU. nº 4.629.567; Thompson et al., documentos de Patente de EE.UU. nº 4.760.130; 5.616.693; WO 98/56821). La prolantina es una marca comercial de una variante purificada de α 1-antitripsina y actualmente está comercializada por Bayer Company (documento de Patente de EE.UU. nº 5.610.285 Lebing et al., 11 de marzo 1997). También se conocen variantes recombinantes no modificadas y mutantes de α 1-antitripsina producidas por métodos de ingeniería genética (documento de Patente de EE.UU. nº 4.711.848); también se conocen métodos de uso, por ejemplo, terapia génica/entrega de α 1-antitripsina (documento de Patente de EE.UU. nº 5.399.346 de French Anderson et al.).

20 Los dos mecanismos de acción celulares conocidos de las proteasas de serina son mediante efectos degradantes directos y mediante una activación de los receptores activados con proteínasa, acoplados a proteína G (PARs). El PAR se activa mediante la unión de la proteasa, seguida de hidrólisis de enlaces peptídicos específicos, con el resultado de que las nuevas secuencias N-terminales estimulan al receptor. Las consecuencias de la activación de PAR dependen del tipo de PAR que se estimula y de la célula o el tejido afectado y pueden incluir la activación de la fosfolipasa C beta, la activación de la proteína cinasa C y la inhibición de la adenilato cinasa (Dery, O. y Bunnett, N. W. Biochem Soc Trans 1999, 27, 246-254; Altieri, D. C. J. Leukoc Biol 1995, 58, 120-127; Dery, O. et al Am J. Physiol 1998, 274, C1429-C1452).

TB y MAC

35 *Mycobacterium* es un género de bacterias que son aerobias, en su mayoría de crecimiento lento, bastones ligeramente curvos o rectos, a veces ramificados y filamentosos, y se distinguen por una tinción ácido-alcohol resistente. Normalmente, las micobacterias son aerobias obligadas gram positivas. El género *Mycobacterium* incluye los organismos altamente patógenos que causan la tuberculosis (*M. tuberculosis* y algunas veces *M. bovis*) y la lepra (*M. leprae*). Sin embargo, existen muchas otras especies de micobacterias tales como *M. avium-intracellulare*, *M. chelonae* (también conocida como *borstelense* y *abscessus*), *M. africanum*, *M. marinum* (también conocida como *balnei* y *platypoecilus*), *M. buruli* (también conocida como *ulcerans*), *M. fortuitum* (también conocida como *giae*, *minetti* y *range*), *M. haemophilum*, *M. intracellulare*, *M. kansasii* (también conocida como *luciflavum*), *M. littorale* (también conocida como *xenopi*), *M. malmoense*, *M. marianum* (también conocida como *scrofulaceum* y *paraffinicum*), *M. simiae*, *M. szulgai* y *M. ulcerans*.

45 Las micobacterias que son patógenas para los animales, pero que no se cree que sean patógenas para los seres humanos, son las siguientes: *M. avium-intracellulare* (también conocida como *brunense*), *M. flavascens*, *M. lepraemurium*, *M. microti* y *M. paratuberculosis* (que es el agente causante de la enfermedad de Johne y tal vez de la enfermedad de Crohn). Las siguientes especies del género *Mycobacterium* se cree que no son patógenas: *M. gordonae* (también conocida como *aquae*), *M. gastri*, *M. phlei* (también conocida como *moelleri* y bacilo de timothy), *M. nonchromogenicum*, *M. smegmatis*, *M. terrae*, *M. triviale* y *M. vaccae*.

Además, ciertas micobacterias distintas de *M. tuberculosis* y *M. bovis* se conocen alternativamente como micobacterias no tuberculosas. Se dividen en cuatro grupos, también conocidos como grupos Runyon, basados en la pigmentación y la tasa de crecimiento. Cada grupo incluye varias especies. El Grupo I se refiere a fotocromógenos de crecimiento lento; el Grupo II se refiere a escotocromógenos de crecimiento lento; el Grupo III se refiere a no fotocromógenos de crecimiento lento; y el Grupo IV se refiere a micobacterias de crecimiento rápido. Las micobacterias no tuberculosas también se denominan micobacterias atípicas o anónimas.

La tuberculosis es una enfermedad infecciosa aguda o crónica causada por una infección con *M. tuberculosis*. La tuberculosis es una enfermedad importante en los países en desarrollo, así como un problema creciente en áreas desarrolladas del mundo, con aproximadamente 8 millones de nuevos casos y 3 millones de muertes cada año (véase, Styblo et al., Bull. Int. Union Tuberc. 56: 118-125 (1981). Aunque la infección puede ser asintomática durante un período de tiempo considerable, la enfermedad se manifiesta más comúnmente como una inflamación aguda de los pulmones, lo que produce fiebre y tos no productiva. Si se deja sin tratar, normalmente se producen complicaciones graves y muerte.

Aunque se sabe que la tuberculosis generalmente se puede controlar mediante una terapia prolongada con antibióticos, un tratamiento de este tipo no es suficiente para prevenir la propagación de la enfermedad. Los individuos infectados pueden ser asintomáticos, pero contagiosos durante algún tiempo. Además, aunque un cumplimiento del régimen de tratamiento específico es decisivo, el comportamiento del paciente frecuentemente es difícil de controlar. Los regímenes de tratamiento requieren frecuentemente de seis a doce meses de terapia ininterrumpida. Como resultado, algunos pacientes no completan el curso del tratamiento, lo que conduce a un tratamiento ineficaz y al desarrollo de resistencia a los antibióticos. Es necesaria una vacunación eficaz y un diagnóstico preciso y precoz de la enfermedad, con el fin de impedir la propagación de la tuberculosis. La vacunación con bacterias vivas sigue siendo el método más eficaz para inducir una inmunidad protectora. La micobacteria empleada de forma más común en la vacuna viva es el Bacillus Calmette-Guerin (BCG), una cepa no virulenta de *Mycobacterium bovis*. Algunos países, tales como los Estados Unidos, sin embargo, no vacunan a la población en general debido a problemas relativos a la seguridad y la eficacia de la vacuna BCG.

M. tuberculosis es un agente patógeno intracelular que infecta los macrófagos y es capaz de sobrevivir en el entorno hostil del fagolisosoma en los macrófagos. La mayoría de los bacilos inhalados son destruidos por macrófagos alveolares activados. Sin embargo, los bacilos supervivientes se multiplican en los macrófagos y se liberan después de la muerte celular, lo que señala la infiltración de linfocitos, monocitos y macrófagos en el sitio. La estimulación antigénica de los linfocitos T requiere una presentación a través de moléculas del MHC. La lisis de los macrófagos cargados con los bacilos está mediada por la respuesta inmune mediada por células con hipersensibilidad de tipo retardado (DTH) y da como resultado el desarrollo de una tuberosidad maciza caseosa que rodea el área de las células infectadas. Los bacilos de la tuberculosis poseen muchos antígenos de linfocitos T potenciales y algunos se han identificado ahora [Andersen 1994, Dan. Med. Bull. 41, 205]. Algunos de estos antígenos son secretados por las bacterias. Una DTH continuada licúa la tuberosidad, liberando de este modo los bacilos tuberculosos atrapados. La dosis grande de bacilos de tuberculosis extracelulares provoca más DTH, causando una lesión en los bronquios y la difusión por vía linfática, hematológica y bronquial y, eventualmente, permitiendo que los bacilos infecciosos se propaguen a través de la respiración.

La inmunidad mediada por células frente a la tuberculosis consiste en varios tipos de células efectoras inmunes. La activación de macrófagos a través de citocinas, tales como interferón-gamma, representa un medio eficaz para minimizar la multiplicación micobacteriana intracelular basada en los macrófagos. Sin embargo, esto no conduce a una erradicación completa de los bacilos. La adquisición de protección contra la tuberculosis requiere, además, linfocitos T. Entre ellos, los linfocitos T tanto de la estirpe CD8+ como CD4+ parecen ser particularmente importantes [Orme et al., 1993, J. Infect. Dis. 167,1481]. Estos linfocitos T secretan interferón-gamma como respuesta a las micobacterias, lo que es indicativo de una respuesta inmune Th 1, y poseen actividad citotóxica contra células diana incubadas con micobacterias. En estudios recientes que utilizan ratones que carecen de microglobulina beta-2 y CD8, se ha observado que las respuestas de linfocitos T citotóxicos (CTL) son cruciales para proporcionar una protección contra *M. tuberculosis* [Flynn et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 12013; Flynn et al., 1993, J. Exp. Med. 178, 2249; Cooper et al., 1993, J. Exp. Med. 178, 2243]. Por el contrario, parece que los linfocitos B no están involucrados, y una transferencia pasiva de anticuerpos anti-micobacterias no proporciona ninguna inmunidad protectora. Por lo tanto, un régimen de vacuna eficaz contra la tuberculosis debe desencadenar respuestas inmunes mediadas por células.

A pesar de que comúnmente se identifica solo como una infección pulmonar, la TB es bien conocida por afectar a muchas partes del cuerpo. Además de la TB pulmonar, ejemplos de otros focos de infección tuberculosa incluyen la TB miliar (TB hematológica o linfohematológica generalizada), la TB del sistema nervioso central, la TB pleural, la pericarditis tuberculosa, la TB genitourinaria, la TB del tracto gastrointestinal, la peritonitis tuberculosa, la TB de la glándulas suprarrenales, la TB del hígado, la TB de los huesos y las articulaciones (por ejemplo, la espondilitis tuberculosa o enfermedad de Pott), la linfadenitis tuberculosa y la TB de la boca, oído medio, laringe y árbol bronquial.

Una terapia convencional contra la TB incluye un tratamiento con regímenes que contienen pirazinamida, isoniazida, etambutol, estreptomina, rifampicina, rifabutina, claritromicina, ciprofloxacino, clofazamina, azitromicina,

etionamida, amikacina y resorcinomicina A. Para el tratamiento de una infección tuberculosa latente (inactiva), la isoniazida se puede utilizar sola. Sin embargo, el tratamiento inicial usual para la tuberculosis pulmonar incluye isoniazida en combinación con al menos otro fármaco, tal como etambutol, estreptomina, rifampicina o etionamida. La repetición de un tratamiento contra la tuberculosis pulmonar, normalmente implica combinaciones de fármacos que incluyen rifampicina y otros fármacos como los que se han indicado anteriormente. El desarrollo de una resistencia del agente causal frente a los fármacos antituberculosos, sobre todo la isoniazida, es bien conocido. La tuberculosis extrapulmonar también se trata usualmente con una combinación que incluye rifampicina y al menos uno de los otros tres fármacos mencionados.

Complejo Mycobacterium Avium (MAC)

M. avium y *M. intracellulare* son miembros del Complejo Mycobacterium Avium (MAC). *M. paratuberculosis* es una subespecie de *M. avium* y también se incluye generalmente en el MAC. Estas especies se han vuelto cada vez más importantes en los últimos años debido a la alta prevalencia de la infección con MAC diseminada en pacientes con SIDA. El complejo Mycobacterium avium se compone de 28 serovares (serotipos) que se distinguen basándose en sus características bioquímicas y de seroaglutinación (véase la revisión de Inderlied, et al. 1993. Clin. Microbiol. Rev. 6, 266-310). Dependiendo del método de clasificación, 10-12 de los 28 serovares están clasificados como pertenecientes a la especie *Mycobacterium avium*, y 10-12 pertenecen a la especie *Mycobacterium intracellulare*. Seis de los serovares de MAC todavía no se han clasificado definitivamente. Las infecciones con MAC actualmente representan aproximadamente el 50% de los cultivos aislados patógenos, identificados por laboratorios de micobacteriología y son más comunes entre pacientes con SIDA y otros pacientes inmunocomprometidos. Un diagnóstico precoz y un tratamiento de las infecciones con MAC pueden mejorar y prolongar la vida de las personas infectadas.

Ántrax y toxina del ántrax

La toxina del ántrax, producida por la bacteria *Bacillus anthracis* gram positiva aerobia en forma de bastoncillo, formadora de esporas, es el factor de virulencia tóxica secretado por este organismo. *B. anthracis* es considerada frecuentemente para uso como arma biológica, debido a la potencia de la exotoxina secretada y a la capacidad de la bacteria para formar esporas latentes que resisten unas condiciones ambientales duras. La esporulación permite un transporte y una distribución rápida de grandes cantidades de bacterias productoras de toxinas. La toxina es en realidad un material compuesto que consiste en 3 proteínas distintas, secretadas desde la bacteria. Las 3 proteínas son el antígeno protector (PA), el factor letal (LF) y el factor de edema (EF). Mientras que LF y EF dañan directamente las células y causan la enfermedad, el PA es el foco de esta descripción. El PA es crucial para la virulencia de la toxina del ántrax, ya que la molécula de PA está diseñada para introducir tanto LF como EF al interior de las membranas de las células. En ausencia de un transporte intracelular inducido con PA, la toxina del ántrax es incapaz de efectuar la destrucción de los tejidos, ya que LF y EF únicamente actúan desde dentro de la célula. La importancia del PA en la función de la toxina del ántrax está subrayada por el uso eficaz del PA como inmunógeno en la vacuna contra el ántrax. Mediante la generación de una respuesta inmune contra PA, la vacuna confiere protección contra la toxina del ántrax completa (3 componentes).

Un examen más detallado de la interacción entre el PA y las células hospedadoras atacadas por la toxina del ántrax es instructivo. El PA se secreta primero como un polipéptido monomérico de 83 kDa por *B. anthracis* en una forma grande y funcionalmente inactiva. Este PA inactivo se une a un receptor de mamífero en la superficie de las células hospedadoras. El receptor de PA se ha aislado y secuenciado recientemente, y se ha encontrado que posee regiones similares al factor von Willebrand. Después del acoplamiento en la superficie de las células hospedadoras, el PA interacciona con una proteasa presente en la superficie celular. La proteasa procesa la molécula grande e inactiva de PA en un fragmento más pequeño y activo de 63 kDa. El fragmento del extremo C-terminal de 63 kDa (PA63) permanece unido a la célula y el extremo N-terminal de 20 kDa (PA20) se disocia de PA63. La identidad de la proteasa ha sido el foco de esfuerzos investigativos limitados, y está mal caracterizada. Sin embargo, estudios previos han mostrado que la proteasa tiene características que sugieren que es una proteasa de serina obtenida a partir del hospedador. Un posible candidato de proteasa de serina observado en las publicaciones, se relaciona con furina (en sí misma, una proteasa de serina), pero otras proteasas de serina, tales como la elastasa, la proteinasa-3, la clostripaína o la tripsina son posibles alternativas (Molloy, S. S. et al. J Biol Chem 267, 16396-16402 (1992)). Esta escisión proteolítica y subsiguiente disociación de PA20 confieren dos nuevas propiedades a PA63: (1) la capacidad de oligomerizarse en una estructura disociable con SDS, heptamérica en forma de anillo, denominada preporo y (2) la capacidad de unirse a EF y LF. Los oligómeros que contienen PA63-EF, PA63-LF o una combinación de PA63-EF y PA63-LF son endocitados y transportados a un compartimiento ácido, en donde el preporo PA63 se inserta en la membrana y forma un poro. Durante o después de la formación del poro, EF y LF se translocan a través de la membrana endosómica dentro del citoplasma. EF es una adenilato ciclasa dependiente de calmodulina que puede proteger a las bacterias de la destrucción con fagocitos. LF es una metaloproteasa que puede destruir los macrófagos o, a concentraciones más bajas, inducir a los macrófagos para producir un exceso de citocinas, dando posiblemente como resultado la muerte del hospedador. Estos heptámeros actúan como vehículo de transporte para entregar LF y EF en el interior de la célula. Una vez dentro de la célula, LF y EF inician anomalías en la función celular.

Debido a algunas de las dificultades y deficiencias de la terapia convencional contra la tuberculosis, son deseables

nuevas modalidades terapéuticas contra otras infecciones micobacterianas y el ántrax.

5 El inventor da a conocer un nuevo método para el uso de inhibidores de proteasas de serina como agentes terapéuticos para el tratamiento de infecciones causadas por tuberculosis (TB) y el complejo Mycobacterium avium (MAC). Estos son agentes patógenos humanos intracelulares que implantan una infección y una latencia prolongada mediante infección y supervivencia dentro de macrófagos humanos. Por lo tanto, el bloqueo de la internalización de TB o MAC dentro de los macrófagos es un nuevo enfoque para la terapia contra estos agentes infecciosos. En un ensayo de infectividad, los inventores han mostrado que la α 1-antitripsina inhibe significativamente la infección con TB o MAC de macrófagos derivados de monocitos humanos (MDM).

10 Un enfoque novedoso para anular la acción de la toxina del ántrax es bloquear el acceso de la toxina al interior de la célula, al interferir con la acción de la proteasa serina obtenida a partir del hospedador que reside en la superficie celular.

Esta invención se dirige por tanto, a una necesidad experimentada desde hace tiempo de métodos seguros y eficaces para el tratamiento de la tuberculosis, otras infecciones micobacterianas, otras infecciones bacterianas gram positivas y gram negativas, y el ántrax.

15 El documento de solicitud de patente internacional WO 03/059935 se refiere a un método para separar una proteína de una o varias otras proteínas, usando la cromatografía con hidroxipatita.

20 El documento de patente de EE.UU. 6.287.817 se refiere a un conjugado proteico que comprende un anticuerpo dirigido a plgR y A₂AT que se puede transportar específicamente desde la superficie basolateral de las células epiteliales hasta la superficie apical y que, por tanto, es útil en la administración de una proteína terapéutica directamente en la superficie apical del epitelio.

El documento de solicitud de patente internacional WO 92/06706 se refiere a un método para la profilaxis o el tratamiento directo de enfermedades o lesiones con mastocitos implicados, que comprende administrar en el sitio de la enfermedad o la lesión, una cantidad eficaz de al menos un inhibidor de proteasa de serina.

Compendio de la invención

25 El problema subyacente de la presente invención se resuelve por la materia objeto de las reivindicaciones independientes adjuntas; las realizaciones preferidas se pueden tomar de las reivindicaciones dependientes adjuntas.

30 Más específicamente, el problema subyacente en la presente invención se resuelve en un primer aspecto mediante una composición farmacéutica que comprende un vehículo, excipiente o diluyente farmacéuticamente aceptable y una proteína de fusión, en donde la composición farmacéutica es para uso en un método para tratar a un sujeto que requiere una terapia con AAT o que tiene una infección bacteriana o que tiene una infección micobacteriana, en donde la proteína de fusión comprende alfa-1 antitripsina (AAT) de mamífero o un fragmento de péptido de la misma, en donde el fragmento de péptido consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada a partir del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 58 y SEQ ID NO: 59, y una región constante de inmunoglobulina, en donde el fragmento de péptido de AAT inhibe la actividad de la proteasa de serina.

40 Más específicamente, el problema subyacente en la presente invención se resuelve en un segundo aspecto mediante una composición farmacéutica que comprende un vehículo, un excipiente o un diluyente farmacéuticamente aceptable y un ácido nucleico que codifica una proteína de fusión, en donde la composición farmacéutica es para uso en un método para el tratamiento de un sujeto que requiere una terapia con AAT o que tiene una infección bacteriana o que tiene una infección micobacteriana, en donde la proteína de fusión comprende alfa-1 antitripsina (AAT) de mamífero o un fragmento de péptido de la misma, en donde el fragmento de péptido consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada a partir del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 58 y SEQ ID NO: 59, y una región constante de inmunoglobulina, en donde el fragmento de péptido de AAT inhibe la actividad de la proteasa de serina.

50 Más específicamente, el problema subyacente en la presente invención se resuelve en un tercer aspecto mediante un ácido nucleico que codifica una proteína de fusión para uso como medicamento, en donde el ácido nucleico codifica la proteína de fusión que comprende alfa-1 antitripsina (AAT) de mamífero o un fragmento de péptido de la misma, en donde el fragmento de péptido consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada a partir del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 58 y SEQ ID NO: 59, y una región constante de inmunoglobulina, en donde el fragmento de péptido de AAT inhibe la actividad de la proteasa de serina.

En una realización del primer, del segundo y del tercer aspecto, la alfa-1 antitripsina (AAT) de mamífero comprende alfa-1 antitripsina (AAT) de mamífero de origen natural.

55 En una realización del primer, del segundo y del tercer aspecto, la región constante de inmunoglobulina comprende

una región constante de IgG1 humana.

En una realización del primer, del segundo y del tercer aspecto, la región constante de IgG1 está modificada y la región constante de IgG1 modificada no se une al receptor de Fc y/o no inicia reacciones de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC).

- 5 En una realización del primer, del segundo y del tercer aspecto, la alfa-1 antitripsina (AAT) de mamífero o el fragmento de péptido de la misma se fusiona con el extremo amino-terminal o carboxilo-terminal de una región constante de inmunoglobulina.

En una realización del primer, del segundo y del tercer aspecto, la región constante de inmunoglobulina comprende la región Fc.

- 10 En una realización del primer, del segundo y del tercer aspecto, la región Fc de la inmunoglobulina es Fc de tipo silvestre o Fc mutante.

En una realización del tercer aspecto, el ácido nucleico es para uso en un método para tratar a un sujeto que requiere una terapia con AAT o que tiene una infección bacteriana o que tiene una infección micobacteriana.

- 15 En relación con las composiciones y el ácido nucleico que codifica una proteína de fusión para uso de acuerdo con la invención, la presente invención describe métodos para el tratamiento de infecciones bacterianas en un mamífero, que comprenden administrar a un sujeto que lo requiere una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende una sustancia que muestra actividad α 1-antitripsina de mamífero o de inhibidor de la proteasa de serina o un derivado funcional de la misma; y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

- 20 En una realización, las infecciones bacterianas que pueden ser tratadas o mejoradas usando las composiciones de la invención, son aquellas infecciones causadas por organismos bacterianos gram negativos que comprenden *N. gonorrhoeae*, *N. meningitidis*, *M. catarrhalis*, *H. influenzae*, *E. coli*, todas las especies de *Klebsiella*, todas las especies de *Enterobacter*, todas las especies de *Serratia*, todas las especies de *Salmonella*, todas las especies de *Shigella*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, todas las especies de *Providencia*, todas las especies de *Morganella*, todas las especies de *Citrobacter*, todas las especies de *Aeromonas*, todas las especies de *Acinetobacter*,
25 *Pseudomonas aeruginosa*, todas las especies de *Pasteurella*, *Pseudomonas cepacia*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Y. enterocolitica* y otras *Yersinioiosis*, todas las especies de *Legionella*, *P. multocida*, *H. ducreyiae*, todas las especies de *Chlamydia*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Mycoplasma hominis*, *Bacteroides fragilis*, *P. melaninogenica*, todas las especies de *Moraxella*, todas las especies de *Bordetella* o cualquier combinación de las mismas.

- 30 En otra realización, las infecciones bacterianas que pueden ser tratadas o mejoradas usando las composiciones y los métodos, son aquellas infecciones causadas por organismos bacterianos gram positivos que comprenden *C. tetani*, *C. botulinum*, *C. difficile*, Grupo A, B, C y G de *Streptococcus*, *Streptococcus pneumoniae*, grupo de *Streptococcus milleri*, *Streptococcus viridans*, todas las especies de *Listeria*, todas las especies de *Staphylococcus*,
35 *S. aureus* (MSSA), *S. aureus* (MRSA), *S. epidermidis*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, todas las especies de *Clostridium* incluyendo *C. diptheriae*, *C. jeikium*, todas las especies de *Rhodococcus*, todas las especies de *Leukonosoc* o cualquier combinación de las mismas.

- 40 En todavía otra realización, las infecciones bacterianas que pueden ser tratadas o mejoradas usando las composiciones y los métodos, son aquellas infecciones causadas por bacilos ácido-alcohol resistentes que comprenden *Mycobacterium tuberculosis* y micobacterias atípicas (*M. avium*, *M. intracellulare*, *M. kansasii*, *M. chelonae*, *M. fortuitum*, *M. scrofulaceum*, *M. ulcerans*, *M. leprae*, *M. xenopi*, *M. bovis*, *M. gordonae*, *M. haemophilum*, *M. marinum*, *M. genavense*, *M. avium e intracellulare* y *M. simiae*) o cualquier combinación de las mismas.

- 45 En relación con las composiciones y el ácido nucleico que codifica una proteína de fusión para uso de acuerdo con la invención, en este documento se describen métodos para el tratamiento de infecciones micobacterianas en un mamífero, que comprenden administrar a un sujeto que lo requiere una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende una sustancia que muestra actividad α 1-antitripsina de mamífero o de inhibidor de la proteasa de serina o un derivado funcional de la misma; y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

- 50 En una realización, la micobacteria que inhibe la infección de macrófagos comprende una micobacteria del género *Mycobacterium* que incluye *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. leprae*, *M. avium-intracellulare*, *M. chelonae* (también conocida como *borstelense* y *abscessus*), *M. africanum*, *M. Marinum* (también conocida como *balnei* y *platypoecilus*), *M. buruli* (también conocida como *ulcerans*), *M. fortuitum* (también conocida como *giae*, *minetti* y *ranae*), *M. haemophilum*, *M. intracellulare*, *M. kansasii* (también conocida como *luciflavum*), *M. littorale* (también conocida como *xenopi*), *M. malmoense*, *M. marianum* (también conocida como *scrofulaceum* y *paraffinicum*), *M. simiae*, *M. szulgai*, *M. ulcerans*, *M. avium* (también conocida como *brunense*), *M. flavascens*, *M. lepraemurium*, *M. microti* y *M. paratuberculosis* (que es el agente causante de la enfermedad de Johne), *M. gordonae* (también conocida como *aquae*), *M. gastris*, *M. phlei* (también conocida como *moelleri* y bacilo de timothy), *M. nonchromogenicum*, *M. smegmatis*, *M. terrae*, *M. triviale* y *M. vaccae* o cualquier combinación de las mismas.
55

En otra realización, la micobacteria que inhibe la infección de macrófagos comprende una micobacteria del género *Mycobacterium* que incluye micobacterias no tuberculosas que se dividen en cuatro grupos que comprenden los grupos Runyon, seleccionados a partir del grupo que consiste en el Grupo I (fotocromógenos de crecimiento lento), el Grupo II (escotocromógenos de crecimiento lento), el Grupo III (no fotocromógenos de crecimiento lento) y el Grupo IV (micobacterias de crecimiento rápido) o cualquier combinación de los mismos.

Por lo tanto, en un aspecto, la presente invención describe métodos de tratamiento de enfermedades micobacterianas que dependen de la infección de macrófagos, por lo que las composiciones y el ácido nucleico de la invención son para uso en tales métodos.

También se describe un método para inhibir una infección micobacteriana de los macrófagos, en el que las composiciones y el ácido nucleico de la invención son para uso en tal método, que comprende administrar a un mamífero susceptible a una infección micobacteriana de los macrófagos, una cantidad eficaz de una sustancia que muestra actividad alfa-1 antitripsina de mamífero o de inhibidor de la proteasa de serina. Sin estar limitados a la α 1-antitripsina, la sustancia puede ser un compuesto que inhibe la proteinasa-3, la catepsina G, la elastasa o cualquier otra proteasa de serina.

En una realización preferida, el agente que inhibe la infección micobacteriana de macrófagos derivados de monocitos humanos, comprende α 1-antitripsina. Además, los péptidos de interés son péptidos homólogos y análogos. Mientras que los homólogos son péptidos naturales con homología de secuencia, los análogos serán derivados de peptidilo, por ejemplo, derivados de aldehído o cetona de tales péptidos. Ejemplos típicos de análogos son TLCK o TPCK. Sin estar limitados a la α 1-antitripsina y a derivados peptídicos de α 1-antitripsina, se prefieren compuestos tales como oxadiazol, tiadiazol, CE-2072, UT-77 y peptoides de triazol.

El agente que inhibe la infección micobacteriana de macrófagos derivados de monocitos humanos, también puede ser un inhibidor de la actividad de la proteasa de serina, un inhibidor de la elastasa o un inhibidor de la proteinasa-3. El inhibidor de la actividad de la proteasa serina puede incluir, pero no está limitado a, moléculas orgánicas pequeñas, que incluyen moléculas de origen natural, sintéticas y biosintéticas, moléculas inorgánicas pequeñas que incluyen moléculas sintéticas y de origen natural, productos naturales que incluyen los producidos por plantas y hongos, péptidos, variantes de α 1-antitripsina, péptidos modificados químicamente y proteínas. Un inhibidor de la actividad de la proteasa de serina tiene la capacidad de inhibir la actividad proteolítica de tripsina, elastasa, calicreína y/u otras proteasas de serina.

También se describe un método para la prevención de una carencia de los niveles de alfa-1-antitripsina endógena funcional en un paciente susceptible a una infección micobacteriana de los macrófagos, que está mediada por actividad proteasa de serina o de tipo proteasa de serina endógena del hospedador, mediante el tratamiento con una composición farmacéutica en un vehículo farmacéuticamente aceptable que comprende cantidades eficaces de una sustancia que muestra actividad α 1-antitripsina de mamífero o inhibidora de la proteasa de serina. La composición farmacéutica puede ser un péptido o una molécula pequeña, que muestra actividad α 1-antitripsina de mamífero o inhibidora de la proteasa de serina.

En aún otro aspecto, la presente invención describe un método para prevenir un síntoma de ántrax en un sujeto que se piensa que tiene riesgo de exposición al *Bacillus anthracis*, que comprende administrar al sujeto una cantidad farmacéuticamente eficaz de una sustancia que muestra actividad α 1-antitripsina de mamífero o inhibidora de la proteasa de serina, en donde dicha sustancia con actividad α 1-antitripsina de mamífero o inhibidora de la proteasa de serina inhibe desde la superficie celular de la proteasa del hospedador, el procesamiento endógeno del PA grande inactivo en la molécula de PA más pequeño activo, y en donde si el sujeto está expuesto a *Bacillus anthracis*, se evita un síntoma de dicha exposición.

En otro aspecto, la presente invención describe un método para prevenir un síntoma de ántrax en un sujeto que se sospecha que ha estado expuesto a *Bacillus anthracis*, que comprende administrar al sujeto una cantidad farmacéuticamente eficaz de una sustancia que muestra actividad α 1-antitripsina de mamífero o inhibidora de la proteasa de serina, en donde dicha sustancia con actividad α 1-antitripsina de mamífero o inhibidora de la proteasa de serina inhibe desde la superficie celular de la proteasa del hospedador, el procesamiento endógeno del PA grande inactivo en la molécula de PA más pequeño activo, y en donde si el sujeto está expuesto a *Bacillus anthracis*, se evita un síntoma de dicha exposición.

En otro aspecto, la presente invención describe un método para mejorar un síntoma de ántrax en un sujeto que requiere dicha mejora, que comprende administrar al sujeto una cantidad farmacéuticamente eficaz de una sustancia que muestra actividad α 1-antitripsina de mamífero o inhibidora de la proteasa de serina, en donde dicha sustancia con actividad α 1-antitripsina de mamífero o inhibidora de la proteasa de serina inhibe desde la superficie celular de la proteasa del hospedador, el procesamiento endógeno del PA grande inactivo en la molécula de PA más pequeño activo.

En los métodos citados anteriormente, el síntoma de ántrax que se inhibe o se evita, se selecciona a partir del grupo que consiste en ulceración cutánea, edema y formación de escaras, o cualquier combinación de las mismas.

En una realización, los métodos descritos se utilizan para prevenir o mejorar un síntoma de ántrax cutáneo,

gastrointestinal y/o por inhalación. En una realización, los métodos de la presente invención se usan para prevenir o mejorar un síntoma de ántrax, seleccionado a partir del grupo que consiste en malestar general, fiebre, tos seca, mialgias y dolores pectorales, afectación de las vías aéreas, sudoración, ensanchamiento del mediastino en estudios radiográficos, edema de cuello y pecho, linfadenitis necrotizante del mediastino, edema no depresible, escaras, náuseas, vómitos, fiebre, dolor abdominal, diarrea con sangre, úlceras en la mucosa, linfadenitis hemorrágica mesentérica o cualquier combinación de los mismos

En aún otro aspecto, la presente invención describe un método para aliviar o mejorar el dolor o los síntomas asociados con una o varias de las enfermedades o indicaciones bacterianas identificadas anteriormente, enfermedades o indicaciones micobacterianas, en un mamífero que padece una cualquiera o varias de las enfermedades o indicaciones bacterianas identificadas anteriormente, enfermedades o indicaciones micobacterianas, que comprende administrar al mamífero que lo requiere una cantidad terapéuticamente eficaz que reduce el dolor o el síntoma, de una composición farmacéutica que comprende cantidades eficaces de una sustancia que muestra actividad α 1-antitripsina de mamífero o inhibidora de la proteasa de serina, ya sea sola o en combinación con uno o varios compuestos antiinflamatorios o agentes inmunomoduladores; y un vehículo o un excipiente farmacéuticamente aceptable, en donde dicha sustancia con actividad α 1-antitripsina de mamífero o inhibidora de la proteasa de serina es suficiente para inhibir o mejorar la enfermedad o la indicación bacteriana, la enfermedad o la indicación micobacteriana, por lo que las composiciones y el ácido nucleico de la invención son para uso en tal método.

En una realización, la reducción o la inhibición del dolor y/o los síntomas asociados con una o varias de cada una de las indicaciones micobacterianas, infecciones bacterianas citadas anteriormente, es del orden de aproximadamente 10-20% de reducción o de inhibición. En otra realización, la reducción o la inhibición del dolor es del orden de 30-40%. En otra realización, la reducción o la inhibición del dolor es del orden de 50-60%. En aún otra realización, la reducción o la inhibición del dolor asociado con cada una de las indicaciones citadas, es del orden de 75-100%. Se entiende en el presente documento que los intervalos citados también incluyen todas aquellas cantidades porcentuales específicas dentro del intervalo citado. Por ejemplo, el intervalo desde aproximadamente 75 a 100% también incluye desde 76 hasta 99%, 77 a 98%, etc., sin enumerar de hecho cada intervalo específico dentro del mismo.

Por consiguiente, el aspecto general de la presente descripción es proporcionar compuestos que muestran actividad inhibidora frente a proteasas de serina. Por lo tanto, se debe reconocer que esta invención se puede aplicar al control de la actividad catalítica de las proteasas de serina, en cualquier situación adecuada, incluyendo, pero no necesariamente limitada a, medicina, biología, agricultura y fermentación microbiana.

Un aspecto es proporcionar inhibidores de proteasas de serina clínicamente aceptables, con utilidad reconocida y que muestran una actividad relativamente alta a concentraciones relativamente bajas.

En una realización, la α 1-antitripsina utilizada en los métodos y las composiciones de la presente invención, comprende Aralast[®] (Baxter), Zemaira[®] (Aventis Behring), Prolastin[®] (Bayer), Aprotonin[®] o Trasilol[®] (Bayer Pharmaceutical Corporation) y Ulinistatin[®] (Ono Pharmaceuticals, Inc.) o cualquier combinación de los mismos.

La presente invención proporciona métodos para tratar terapéutica o profilácticamente infecciones bacterianas en un sujeto, por lo que las composiciones y el ácido nucleico de la invención son para uso en tales métodos.

El método para tratar terapéuticamente infecciones bacterianas o micobacterianas comprende la etapa de administrar cantidades farmacéuticamente eficaces de una sustancia que muestra actividad α 1-antitripsina de mamífero o de inhibidor de la proteasa de serina o un derivado de la misma, al sujeto después de la aparición de la enfermedad bacteriana o micobacteriana.

El método para tratar profilácticamente infecciones bacterianas o micobacterianas comprende la etapa de administrar cantidades farmacéuticamente eficaces de una sustancia que muestra actividad α 1-antitripsina de mamífero o de inhibidor de la proteasa de serina o un derivado de la misma, al sujeto antes de la aparición de la enfermedad bacteriana o micobacteriana.

La metodología inhibe la infección bacteriana o la infección micobacteriana de macrófagos.

Para cada uno de los métodos citados anteriormente, la cantidad terapéuticamente eficaz de una o varias sustancias que muestran actividad α 1-antitripsina de mamífero o inhibidora de la proteasa de serina o un derivado funcional de la misma, se puede administrar a un sujeto que la requiere en combinación con una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o varios fármacos antimicobacterianos y/o compuestos antiinflamatorios y/o una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o varios agentes inmunomoduladores.

En ciertas realizaciones del método, el compuesto antiinflamatorio o el fármaco inmunomodulador comprende interferón; derivados de interferón que comprenden betaseron, beta-interferón; derivados de prostanos que comprenden iloprost, cicaprost; glucocorticoides que comprenden cortisol, prednisolona, metilprednisolona, dexametasona; inmunosupresores que comprenden ciclosporina A, FK-506, metoxsaleno, talidomida, sulfasalazina, azatioprina, metotrexato; inhibidores de lipoxigenasa que comprenden zileutón, MK-886, WY-50295, SC-45662, SC-

41661A, BI-L-357; antagonistas de leucotrieno; derivados de péptidos que comprenden ACTH y análogos de los mismos; receptores solubles de TNF; anticuerpos de TNF; receptores solubles de interleucinas, otras citocinas, proteínas de linfocitos T; anticuerpos contra receptores de interleucinas, otras citocinas, proteínas de linfocitos T; y calcipotrioles y análogos de los mismos tomados solos o en combinación.

- 5 La presente invención también describe el uso combinado de la composición farmacéutica que muestra actividad α 1-antitripsina de mamífero o inhibidora de la proteasa de serina, en combinación con una o varias composiciones antibacterianas o antivirales o cualquier combinación de las mismas, para el tratamiento de una cualquiera de las enfermedades bacterianas o micobacterianas mencionadas anteriormente o cualquier combinación de las mismas.

10 En cada uno de los métodos citados anteriormente, la sustancia con actividad α 1-antitripsina de mamífero o inhibidora de la proteasa de serina puede formar parte de un polipéptido de fusión, en donde dicho polipéptido de fusión comprende α 1-antitripsina de mamífero o una sustancia con actividad inhibidora de la proteasa de serina y una secuencia de aminoácidos heteróloga a dicha α 1-antitripsina de mamífero o sustancia inhibidora de la actividad proteasa de serina.

15 En ciertas realizaciones, el polipéptido de fusión contemplado para uso en los métodos comprende una región constante de inmunoglobulina humana, tal como, por ejemplo, una región constante de IgG1 humana, que incluye una región constante modificada de IgG1 humana, en donde la región constante de IgG1 no se une al receptor de Fc y/o no inicia reacciones de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC).

20 En aún otras realizaciones, el polipéptido de fusión contemplado para uso en los métodos, puede comprender adicionalmente una secuencia de aminoácidos que es útil para la identificación, el seguimiento o la purificación del polipéptido de fusión, por ejemplo, el polipéptido de fusión puede comprender además una secuencia marcadora FLAG o HIS. El polipéptido de fusión puede comprender además un sitio de escisión proteolítica que se puede utilizar para eliminar la secuencia de aminoácidos heteróloga de la α 1-antitripsina de mamífero o la sustancia con actividad inhibidora de proteasa de serina. En cada una de las composiciones y métodos citados anteriormente de la invención, el agente que inhibe la infección bacteriana, la infección micobacteriana de macrófagos derivados de monocitos humanos o el ántrax, comprende α 1-antitripsina. Además, los péptidos de interés son péptidos homólogos y análogos. Mientras que los homólogos son péptidos naturales con homología de secuencia, los análogos serán derivados de peptidilo, por ejemplo, derivados de aldehídos o cetonas de tales péptidos. Ejemplos típicos de análogos son TLCK o TPCK. Sin limitarse a la α 1-antitripsina y los derivados peptídicos de α 1-antitripsina, se prefieren compuestos tales como oxadiazol, tiadiazol, CE-2072, UT-77 y peptoides de triazol.

30 En otras realizaciones, el agente que inhibe la infección bacteriana, la infección micobacteriana de macrófagos derivados de monocitos humanos y/o el ántrax, también puede ser un inhibidor de la actividad proteasa de serina, un inhibidor de la elastasa o un inhibidor de la proteinasa-3. El inhibidor de la actividad proteasa de serina puede incluir, pero no está limitado a las mismas, moléculas orgánicas pequeñas, incluyendo moléculas de origen natural, sintéticas y biosintéticas, moléculas inorgánicas pequeñas que incluyen moléculas sintéticas y de origen natural, productos naturales que incluyen los producidos por plantas y hongos, péptidos, variantes de α 1-antitripsina, péptidos modificados químicamente y proteínas. Un inhibidor de la actividad proteasa de serina tiene la capacidad de inhibir la actividad proteolítica de tripsina, elastasa, calicreína y/u otras proteasas de serina.

40 En una realización, el péptido puede estar protegido o derivatizado de diversas maneras, por ejemplo, mediante acilación N-terminal, amidación C-terminal, ciclación, etc. En una realización específica, el extremo N-terminal del péptido está acetilado.

Los péptidos de interés son péptidos homólogos y análogos. Si bien los homólogos son péptidos naturales con homología de secuencia, los análogos serán derivados de peptidilo, por ejemplo, derivados de aldehído o cetona de tales péptidos. Sin limitarse a AAT y a derivados peptídicos de AAT, se prefieren compuestos tales como oxadiazol, tiadiazol y triazol y sustancias que comprenden ciertos ésteres de fenilendialcanoato.

45 En cada uno de los métodos mencionados anteriormente, la sustancia con actividad α 1-antitripsina de mamífero o inhibidora de la proteasa de serina contemplada para uso dentro de los métodos, comprende adicionalmente una serie de péptidos que comprenden péptidos de aminoácidos carboxiterminales correspondientes a AAT. Estos pentapéptidos pueden estar representados por una fórmula general (I): I-A-B-C-D-E-F-G-H-II, en la que I es Cys o está ausente; A es Ala, Gly, Val o está ausente; B es Ala, Gly, Val, Ser o está ausente; C es Ser, Thr o está ausente; D es Ser, Thr, Ans, Glu, Arg, Ile, Leu o está ausente; E es Ser, Thr, Asp o está ausente; F es Thr, Ser, Asn, Gln, Lys, Trp o está ausente; G es Tyr o está ausente; H es Thr, Gly, Met, Met(O), Cys, Thr o Gly; y II es Cys, un grupo amida, un grupo amida sustituido, un grupo éster o está ausente, en donde los péptidos comprenden al menos 4 aminoácidos y sales fisiológicamente aceptables de los mismos. Entre esta serie de péptidos, varios son igualmente aceptables incluyendo FVFLM (SECUENCIA ID NO. 1), FVFAM (SECUENCIA ID NO. 2), FVALM (SECUENCIA ID NO. 3), FVFLA (SECUENCIA ID NO. 4), FLVFI (SECUENCIA ID NO. 5), FLMII (SECUENCIA ID NO. 6), FLFVL (SECUENCIA ID NO. 7), FLFVV (SECUENCIA ID NO. 8), FLFLI (SECUENCIA ID NO. 9), FLFFI (SECUENCIA ID NO. 10), FLMFI (SECUENCIA ID NO. 11), FMLLI (SECUENCIA ID NO.12), FIIMI (SECUENCIA ID NO. 13), FLFCI (SECUENCIA ID NO. 14), FLFAV (SECUENCIA ID NO. 15), FVYLI (SECUENCIA ID NO. 16), FAFLM (SECUENCIA ID NO. 17), AVFLM (SECUENCIA ID NO. 18) y cualquier combinación de los mismos.

En aún otra realización, estos péptidos pueden estar representados por una fórmula general (II): NT-X1-X2-X3-X4-X5-CT o una sal fisiológicamente aceptable de la misma, en donde NT comprende un residuo de aminoácido situado en el extremo N-terminal del péptido, incluyendo C, un grupo acetilo o un grupo succinilo, siempre que NT también pueda estar ausente; X1 comprende un residuo de aminoácido, incluyendo F o A; X2 comprende un residuo de aminoácido, incluyendo C, V, L, M, I, A, C o S; X3 comprende un residuo de aminoácido, incluyendo F, A, V, M, L, I, Y o C; X4 comprende un residuo de aminoácido, incluyendo L, A, F, I, V, M, C, G o S; X5 comprende un residuo de aminoácido, incluyendo M, A, I, L, V, F o G; y CT comprende un residuo de aminoácido situado en el extremo C-terminal del péptido, incluyendo C, un grupo amida, un grupo amida sustituido o un grupo éster, siempre que CT también pueda estar ausente, y en donde el residuo de aminoácido puede tener una configuración L-estereoisomérica o D-estereoisomérica. Estos péptidos comprenden al menos 5 aminoácidos y sales fisiológicamente aceptables de los mismos. Los aminoácidos en la fórmula están abreviados con el código de 1 letra y el correspondiente de 3 letras, del modo siguiente: Alanina es A o Ala; Arginina R o Arg, Asparagina N o Asn; Ácido aspártico D o Asp; Cisteína C o Cys; Glutamina Q o Gln; Ácido glutámico E o Glu; Glicina G o Gly; Histidina H o His; Isoleucina I o Ile; Leucina L o Leu; Lisina K o Lys; Metionina M o Met; Fenilalanina F o Phe; Prolina P o Pro; Serina S o Ser; Treonina T o Thr; Triptófano W o Trp; Tirosina Y o Tyr; y Valina V o Val.

En cada uno de los métodos citados anteriormente, la sustancia con actividad α 1-antitripsina de mamífero o inhibidora de la proteasa de serina contemplada para uso en los métodos, comprende adicionalmente una serie de péptidos que comprenden péptidos de aminoácidos correspondientes a porciones o fragmentos de AAT. Por ejemplo, y no a modo de limitación, los péptidos de aminoácidos correspondientes a 10 fragmentos de aminoácidos de AAT se contemplan específicamente para uso en la composición y los métodos de la presente invención. En particular, los péptidos de aminoácidos MPSSVSWGIL (SECUENCIA ID NO. 19); LAGLCCLVPV (SECUENCIA ID NO. 20) SLAEDPQGDA (SECUENCIA ID NO. 21); AQKTDTSHHH (SECUENCIA ID NO. 22); QDHPTFNKIT (SECUENCIA ID NO. 23); PNLAEFAFSL (SECUENCIA ID NO. 24); YRQLAHQSNS (SECUENCIA ID NO. 25); TNIFFSPVSI (SECUENCIA ID NO. 26); ATAFAMLSLG (SECUENCIA ID NO. 27); TKADTHDEIL (SECUENCIA ID NO. 28); EGLNLFNLTEI (SECUENCIA ID NO. 29); PEAQIHEGFQ (SECUENCIA ID NO. 30); ELLRTLNLQPD (SECUENCIA ID NO. 31); SQLQLTTGNG (SECUENCIA ID NO. 32); LFLSEGLKLV (SECUENCIA ID NO. 33); DKFLEDVKKL (SECUENCIA ID NO. 34); YHSEAFVNF (SECUENCIA ID NO. 35); GDHEEAKKQI (SECUENCIA ID NO. 36); NDYVEKGTQG (SECUENCIA ID NO. 37); KIVDLVKELD (SECUENCIA ID NO. 38); RDTVFAVNY (SECUENCIA ID NO. 39); IFFKGKWERP (SECUENCIA ID NO. 40); FEVKDTEDED (SECUENCIA ID NO. 41); FHVDQVTTVK (SECUENCIA ID NO. 42); VPMMKRLGMF (SECUENCIA ID NO. 43); NIQHCKKLSS (SECUENCIA ID NO. 44); WVLLMKYLG (SECUENCIA ID NO. 45); ATAIFFLPDE (SECUENCIA ID NO. 46); GKQLHLENEL (SECUENCIA ID NO. 47); THDITTKFLE (SECUENCIA ID NO. 48); NEDRRSASLH (SECUENCIA ID NO. 49); LPKLSITGTY (SECUENCIA ID NO. 50); DLKSVLGQLG (SECUENCIA ID NO. 51); ITKVFSNGAD (SECUENCIA ID NO. 52); LSGVTEEAPL (SECUENCIA ID NO. 53); KLSKAVHKAV (SECUENCIA ID NO. 54); LTIDEKGTEA (SECUENCIA ID NO. 55); AGAMFLEAIP (SECUENCIA ID NO. 56); MSIPPEVKFN (SECUENCIA ID NO. 57); KPFVFLMIEQ (SECUENCIA ID NO. 58); NTKSPLFMGK (SECUENCIA ID NO. 59); VVNPTQK (SECUENCIA ID NO. 60) o cualquier combinación de los mismos. Se pretende específicamente que los péptidos de AAT citados, contemplados para uso en las composiciones y los métodos, también incluyan cualquiera y todos los péptidos de AAT específicos, distintos de los péptidos de AAT de 10 aminoácidos de SEQ ID NO: 61, representados anteriormente. Por ejemplo, aunque los aminoácidos 1-10, los aminoácidos 11-20, los aminoácidos 21-30, etc. de los péptidos de AAT de SEQ ID NO: 61 se han mencionado en el presente documento, se entiende que el alcance de las composiciones y los métodos de uso de los mismos, incluye de forma específica todas las combinaciones posibles de péptidos de AAT, tales como los aminoácidos 2-12, los aminoácidos 3-13, 4-14, etc. de SEQ ID NO: 61, así como cualquiera y todos los fragmentos de péptidos de AAT correspondientes para seleccionar aminoácidos de SEQ ID NO: 61, sin citar realmente para ello cada péptido específico de AAT de SEQ ID NO: 61. Por tanto, a modo de ilustración, y no a modo de limitación, los solicitantes en el presente documento tienen derecho de posesión de las composiciones basadas en cualquiera y todas las variantes de péptidos de AAT, basándose en la secuencia de aminoácidos representada en SEQ ID NO: 61 y el uso de tales composiciones en el método de la presente invención.

La AAT y los compuestos activos similares, contemplados para uso en las composiciones y los métodos se pueden identificar por una serie de ensayos en los que un compuesto (AAT) mostrará actividad inhibidora frente a un control en un ensayo. Uno de estos ensayos comprende bloquear la infección de macrófagos derivados de monocitos humanos en un modelo *in vitro* de infección, tal y como se describe con detalle en el Ejemplo 1 de la explicación detallada de esta descripción.

En una realización, con respecto al uso de las composiciones y los métodos para prevenir o mejorar un síntoma causado por *Bacillus anthracis*, *Corynebacterium diphtheriae* o *Pseudomonas aeruginosa*, están excluidos específicamente del alcance de la presente invención aquellos inhibidores de endoproteasa de furina que comprenden una variante de α 1-antitripsina que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende los aminoácidos de la molécula de α 1-antitripsina natural, excepto que la secuencia en la posición 355-358 de la proteína natural (-Ala-Ile-Pro-Met-) se cambia a la nueva secuencia -Arg-X-X-Arg-, en la que X es cualquier aminoácido, en las posiciones 355-358 de la secuencia de aminoácidos de α 1-antitripsina natural, como se describe en los documentos de Patentes de EE.UU. nº 5.604.201 y 6.022.855.

También se excluyen específicamente del alcance de las composiciones y los métodos para prevenir o mejorar un

síntoma causado por *Bacillus anthracis*, *Corynebacterium diphtheriae* o *Pseudomonas aeruginosa*, las variantes Portland de α 1-antitripsina, en donde la secuencia de aminoácidos en las posiciones 355-358 de la secuencia de aminoácidos de Portland de α 1-antitripsina es -Arg-Ile-Pro-Arg-, tal y como se describe en los documentos de Patentes de EE.UU. n° 5.604.201. Y 6.022.855.

- 5 También se excluyen específicamente del alcance de las composiciones y los métodos para prevenir o mejorar un síntoma causado por *Bacillus anthracis*, *Corynebacterium diphtheriae* o *Pseudomonas aeruginosa*, los péptidos que tienen secuencias de aminoácidos de aproximadamente 4 a aproximadamente 100 aminoácidos de longitud que comprenden la secuencia de aminoácidos -Arg-Xaa-Xaa-Arg-, en donde cada Xaa es cualquier aminoácido, tal y como se describe en los documentos de Patentes de EE.UU. n° 5.604.201 y 6.022.855.
- 10 En aún otra realización, con respecto al uso de las composiciones y los métodos para prevenir o mejorar un síntoma del ántrax, se excluyen específicamente del alcance de la presente invención aquellos inhibidores de la endoproteasa de furina que comprenden HexArg, tal y como se describe en Miroslav S. Sarac et al. (Infection and Immunity, enero de 2004, pág. 602-605, vol. 72, n° 1 Protection against Anthrax Toxemia by Hexa-D-Arginine In Vitro and In Vivo).
- 15 La invención describe además composiciones farmacéuticas que comprenden tales agentes.

Las dosis preferidas para administración pueden estar en cualquier lugar dentro de un intervalo entre aproximadamente 10 ng y aproximadamente 10 mg por ml o mg de la formulación. La cantidad terapéuticamente eficaz de péptidos o fármacos de AAT que tienen actividades similares a las de AAT se pueden medir también en concentraciones molares y pueden oscilar entre aproximadamente 1 nM y aproximadamente 10 mM. La formulación también se contempla en combinación con un vehículo farmacéutica o cosméticamente aceptable. Las dosis precisas se pueden establecer mediante ensayos clínicos de rutina bien conocidos, sin una experimentación indebida.

20

En un aspecto de la invención, las composiciones farmacéuticas de la presente invención se administran por vía oral, sistémica, a través de un implante, por vía intravenosa, tópica, intratecal, intracraneal, intraventricular, mediante inhalación o por vía nasal.

25

En ciertas realizaciones de las composiciones y el ácido nucleico que codifica una proteína de fusión para uso de acuerdo con la presente invención, el sujeto o el mamífero es un ser humano.

En otras realizaciones de las composiciones y del ácido nucleico que codifica una proteína de fusión para uso de acuerdo con la presente invención, el sujeto o el mamífero es un mamífero veterinario y/o domesticado.

- 30 Por tanto se han esbozado, más bien en términos generales, las características importantes de la invención con el fin de que su descripción detallada subsiguiente se pueda entender mejor, y con el fin de que la presente contribución pueda ser mejor apreciada. Hay características adicionales de la invención que se describirán a continuación.

A este respecto, antes de explicar con detalle al menos una realización de la invención, ha de entenderse que la invención no está limitada en su aplicación a los detalles tal como se exponen en la siguiente descripción y las figuras. La presente invención puede tener otras realizaciones y se pueden poner en práctica y llevar a cabo de varias maneras. Además, se debe entender que la terminología y la fraseología que se emplea en el presente documento tienen el fin de describir y no deben considerarse como limitantes.

35

Breve descripción de los dibujos

- 40 La FIG. 1 ilustra el efecto de la alfa-1-antitripsina (AAT) y un mimético de AAT sobre una infección con el complejo mycobacterium avium (MAC) de macrófagos derivados de monocitos humanos (n = 4).

La FIG. 2 ilustra el efecto de la alfa-1-antitripsina (AAT) y un mimético de AAT sobre TNF α inducido con el complejo mycobacterium avium (MAC) en macrófagos derivados de monocitos humanos.

- 45 La FIG. 3 ilustra el efecto de la alfa-1-antitripsina (AAT) y un mimético de AAT sobre TNF α inducido con el complejo mycobacterium avium (MAC) en macrófagos derivados de monocitos humanos: experimento de evolución temporal (n = 1).

Las FIGs. 4A-4H ilustran el mecanismo de la toxina de *Bacillus anthracis* y el método por el cual los inhibidores de la proteasa de serina neutralizan la toxina.

- 50 La FIG. 5 ilustra el efecto de la alfa-1-antitripsina sobre la producción de interleucina-1 beta estimulada en sangre humana completa.

Descripción detallada de la invención

Métodos convencionales

De acuerdo con la presente invención se pueden emplear técnicas convencionales de biología molecular, microbiología y ADN recombinante dentro de la experiencia de la técnica. Tales técnicas se explican por completo en la bibliografía. Véase, por ejemplo, Sambrook, Fritsch y Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, segunda edición 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.; *Animal Cell Culture*, R.I. Freshney, compilador, 1986).

Métodos terapéuticos

La presente invención describe métodos para el tratamiento de infecciones micobacterianas, que comprenden administrar a un sujeto que lo requiere una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende una cantidad eficaz de una sustancia que muestra actividad α 1-antitripsina de mamífero o inhibidora de la proteasa de serina o un derivado funcional de la misma; y un excipiente farmacéuticamente aceptable, por lo que las composiciones y el ácido nucleico que codifica una proteína de fusión son para uso en los mismos.

De acuerdo con los métodos descritos en este documento, se inhibe una infección micobacteriana de los macrófagos para obtener beneficios terapéuticos importantes.

Por lo tanto, la administración de una dosificación de la composición de la invención, es decir, α 1-antitripsina o un fragmento, un derivado o un análogo de la misma, puede ser beneficiosa para el tratamiento de enfermedades o trastornos micobacterianos. En un aspecto preferido, el agente es un análogo de α 1-antitripsina que puede cruzar la barrera hematoencefálica, lo que permitiría una administración intravenosa u oral. Muchas estrategias están disponibles para el cruce de la barrera hematoencefálica, incluyendo, pero no limitadas a, incrementar la naturaleza hidrófoba de una molécula; introducir la molécula como un conjugado de un vehículo, tal como la transferrina, dirigir a un receptor en la barrera hematoencefálica; y similares. En otra realización, el agente se puede administrar por vía intracraneal o, más directamente, por vía intraventricular. En aún otra realización, el agente se puede administrar por medio de inhalación o por vía nasal.

En una realización adicional, los métodos y las composiciones son útiles en el tratamiento terapéutico de enfermedades o trastornos micobacterianos del sistema inmune. En aún otra realización adicional, las enfermedades se pueden prevenir mediante una administración a tiempo del agente de la invención como un agente profiláctico, antes de la aparición de los síntomas o signos, o antes de la aparición de síntomas o signos graves de una enfermedad micobacteriana. Por lo tanto, un paciente que tiene riesgo de padecer una enfermedad micobacteriana particular, se puede tratar con inhibidores de la proteasa de serina, por ejemplo, (benciloxicarbonil)-L-valil-N-[1-(3-(5-(3-trifluorometilbencil)-1,2,4-oxadiazolil)carbonil)-2-(S)-metilpropil]-L-prolinamida; como medida de precaución.

La dosis eficaz del agente y el régimen de tratamiento apropiado pueden variar con la indicación y el estado del paciente, y la naturaleza de la propia molécula, por ejemplo, su semivida *in vivo* y el nivel de actividad. Estos parámetros son fácilmente abordados por un experto ordinario en la técnica y se pueden determinar con una experimentación de rutina.

Las dosis preferidas para la administración pueden ser cualquiera dentro de un intervalo entre aproximadamente 0,01 mg y aproximadamente 20 mg por ml de líquido biológico del paciente tratado. La cantidad terapéuticamente eficaz de α 1-antitripsina, péptidos o fármacos que tienen actividades similares a la α 1-antitripsina o a los péptidos, se puede medir también en concentraciones molares y puede variar entre aproximadamente 1 nM a aproximadamente 2 mM.

Inhibidores de la proteasa de serina

Se ha de entender que la presente invención no se limita a los ejemplos descritos en el presente documento, y otras proteasas de serina conocidas en la técnica se pueden utilizar dentro de las limitaciones de la invención. Por ejemplo, un experto en la técnica puede seleccionar fácilmente inhibidores tal y como se describe en el documento WO 98/24806, que describe oxadiazol, tiadiazol y triazol sustituidos como inhibidores de la proteasa de serina. El documento de patente de EE.UU. n° 5.874.585 da a conocer compuestos heterocíclicos sustituidos, útiles como inhibidores de proteasas de serina; que incluyen: (benciloxicarbonil)-L-valil-N-[1-(3-(5-(3-trifluorometilbencil)-1,2,4-oxadiazolil)carbonil)-2-(S)-metilpropil]-L-prolinamida; (benciloxicarbonil)-L-valil-N-[1-(3-(5-(2-feniletíl)-1,2,4-oxadiazolil)carbonil)-2-(S)-metilpropil]-L-prolinamida; (benciloxicarbonil)-L-valil-N-[1-(3-(5-(2-metoxibencil)-1,2,4-oxadiazolil)carbonil)-2-(S)-metilpropil]-L-prolinamida; (benciloxicarbonil)-L-valil-N-[1-(3-(5-(trifluorometil)-1,2,4-oxadiazolil)carbonil)-2-(S)-metilpropil]-L-prolinamida; (benciloxicarbonil)-L-valil-N-[1-(3-(5-(metil)-1,2,4-oxadiazolil)carbonil)-2-(S)-metilpropil]-L-prolinamida; (benciloxicarbonil)-L-valil-N-[1-(3-(5-(difluorometil)-1,2,4-oxadiazolil)carbonil)-2-(S)-metilpropil]-L-prolinamida; (benciloxicarbonil)-L-valil-N-[1-(3-(5-(bencil)-1,2,4-oxadiazolil)carbonil)-2-(S)-metilpropil]-L-prolinamida; (benciloxicarbonil)-L-valil-N-[1-(3-(5-(3-metoxibencil)-1,2,4-oxadiazolil)carbonil)-2-(S)-metilpropil]-L-prolinamida; (benciloxicarbonil)-L-valil-N-[1-(3-(5-(2,6-difluorobencil)-1,2,4-oxadiazolil)carbonil)-2-(S)-metilpropil]-L-prolinamida; (benciloxicarbonil)-L-valil-N-[1-(3-(5-(trans-estiril)-1,2,4-oxadiazolil)carbonil)-2-(S)-metilpropil]-L-prolinamida; (benciloxicarbonil)-L-valil-N-[1-(3-(5-(trans-4-trifluorometilstil)-

1,2,4-oxadiazolil]carbonil)-2-(S)-metilpropil]-L-prolinamida; (benciloxicarbonil)-L-valil-N-[1-(3-(5-(trans-4-metoxiestiril)-1,2,4-oxadiazolil]cabonil)-2-(S)-metilpropil]-L-prolinamida; (benciloxicarbonil)-L-valil-N-[1-(3-(5-(3-tienilmetil)-1,2,4-oxadiazolil]carbonil)-2-(S)-metilpropil]-L-prolinamida; (benciloxicarbonil)-L-valil-N-[1-(3-(5-(fenil)-1,2,4-oxadiazolil]carbonil)-2-(S)-metilpropil]-L-prolinamida; y (benciloxicarbonil)-L-valil-N-[1-(3-(5-(3-fenilpropil)-1,2,4-oxadiazolil]carbonil)-2-(S)-metilpropil]-L-prolinamida. El documento de Patente de EE.UU. n° 5.216.022 describe otras moléculas pequeñas útiles para la práctica de esta invención, que incluyen: benciloxicarbonil-L-valil-N-[1-(2-[5-(3-metilbencil)-1,3,4-oxadiazolil]carbonil)-2-(S)-metilpropil]-L-prolinamida (también conocida como CE-2072), benciloxicarbonil-L-valil-N-[1-(2-(3-metilbencil)-1,3,4-oxadiazolil]carbonil)-2-(S)-metilpropil]-L-prolinamida; benciloxicarbonil-L-valil-N-[1-(2-(5-(metil)-1,3,4-oxadiazolil]carbonil)-2-(S)-metilpropil]-L-prolinamida; benciloxicarbonil)-L-valil-N-[1-(2-(5-(3-trifluorometilbencil)-1,3,4-oxadiazolil]carbonil)-2-(S)-metilpropil]-L-prolinamida; (benciloxicarbonil)-L-valil-N-[1-(2-(5-(4-dimetilaminobencil)-1,3,4-oxadiazolil]carbonil)-2-(S)-metilpropil]-L-prolinamida; benciloxicarbonil)-L-valil-N-[1-(2-(5-(1-naptilenil)-1,3,4-oxadiazolil]carbonil)-2-(S)-metilpropil]-L-prolinamida; (benciloxicarbonil)-L-valil-N-[1-(3-(5-(3,4-metilendioxbencil)-1,2,4-oxadiazolil]carbonil)-2-(S)-metilpropil]-L-prolinamida; benciloxicarbonil)-L-valil-N-[1-(3-(5-(3,5-dimetilbencil)-1,2,4-oxadiazolil]carbonil)-2-(S)-metilpropil]-L-prolinamida; (benciloxicarbonil)-L-valil-N-[1-(3-(5-(3,5-dimetilbencil)-1,2,4-oxadiazolil]carbonil)-2-(S)-metilpropil]-L-prolinamida; (benciloxicarbonil)-L-valil-N-[1-(3-(5-(3,5-dimetilbencil)-1,2,4-oxadiazolil]carbonil)-2-(S)-metilpropil]-L-prolinamida; (benciloxicarbonil)-L-valil-N-[1-(3-(5-(3,5-ditrifluorometilbencil)-1,2,4-oxadiazolil]carbonil)-2-(S)-metilpropil]-L-prolinamida; (benciloxicarbonil)-L-valil-N-[1-(3-(5-(3-metilbencil)-1,2,4-oxadiazolil]carbonil)-2-(S)-metilpropil]-L-prolinamida; (benciloxicarbonil)-L-valil-N-[1-(3-(5-(bifenilmetil)-1,2,4-oxadiazolil]carbonil)-2-(S)-metilpropil]-L-prolinamida; (benciloxicarbonil)-L-valil-N-[1-(3-(5-(4-fenilbencil)-1,2,4-oxadiazolil]carbonil)-2-(S)-metilpropil]-L-prolinamida; (benciloxicarbonil)-L-valil-N-[1-(3-(5-(3-fenilbencil)-1,2,4-oxadiazolil]carbonil)-2-(S)-metilpropil]-L-prolinamida; (benciloxicarbonil)-L-valil-N-[1-(3-(5-(3-fenoxibencil)-1,2,4-oxadiazolil]carbonil)-2-(S)-metilpropil]-L-prolinamida; (benciloxicarbonil)-L-valil-N-[1-(3-(5-(ciclohexilmetil)-1,2,4-oxadiazolil]carbonil)-2-(S)-metilpropil]-L-prolinamida; (benciloxicarbonil)-valil-N-[1-(3-(5-(3-trifluorometildimetilmetil)-1,2,4-oxadiazolil]carbonil)-2-(S)-metilpropil]-L-prolinamida; (benciloxicarbonil)-L-valil-N-[1-(3-(5-(1-naptilmetil)-1,2,4-oxadiazolil]carbonil)-2-(S)-metilpropil]-L-prolinamida; (benciloxicarbonil)-L-valil-N-[1-(3-(5-(3-piridilmetil)-1,2,4-oxadiazolil]carbonil)-2-(S)-metilpropil]-1-prolinamida; (benciloxicarbonil)-L-valil-N-[1-(3-(5-(3,5-difenilbencil)-1,2,4-oxadiazolil]carbonil)-2-(S)-metilpropil]-L-prolinamida; (benciloxicarbonil)-L-valil-N-[1-(3-(5-(4-dimetilaminobencil)-1,2,4-oxadiazolil]carbonil)-2-(S)-metilpropil]-L-prolinamida; 2-(5-[(benciloxicarbonil)amino]-6-oxo-2-(4-fluorofenil)-1,6-dihidro-1-pirimidinil]-N-[1-(3-(5-(3-trifluorometilbencil)-1,2,4-oxadiazolil]carbonil)-2-(S)-metilpropil]acetamida; 2-(5-amino-6-oxo-2-(4-fluorofenil)-1,6-dihidro-1-pirimidinil]-N-[1-(3-(5-(3-trifluorometilbencil)-1,2,4-oxadiazolil]carbonil)-2-(S)-metilpropil]acetamida; 2-(5-amino-6-oxo-2-(4-fluorofenil)-1,6-dihidro-1-pirimidinil]-N-[1-(3-(5-(3-trifluorometilbencil)-1,2,4-oxadiazolil]carbonil)-2-(S)-metilpropil]acetamida; 2-(5-amino-6-oxo-2-(4-fluorofenil)-1,6-dihidro-1-pirimidinil]-N-[1-(2-(5-(3-metilbencil)-1,3,4-oxadiazolil]carbonil)-2-(S)-metilpropil]acetamida; (pirrol-2-carbonil)-N-(bencil)glicil-N-[1-(2-(5-(3-metilbencil)-1,3,4-oxadiazolil]carbonil)-2-(S)-metilpropil]amida; (pirrol-2-carbonil)-N-(bencil)glicil-N-[1-(3-(5-(3-trifluorometilbencil)-1,2,4-oxadiazolil]carbonil)-2-(S)-metilpropil]amida; (2S,5S)-5-amino-1,2,4,5,6,7-hexahidroazepino-[3,2,1]-indol-4-ona-carbonil-N-[1-(2-(5-(3-metilbencil)-1,3,4-oxadiazolil]carbonil)-2-(S)-metilpropil]amida; BTD-[1-(2-(5-(3-metilbencil)-1,3,4-oxadiazolil]carbonil)-2-(S)-metilpropil]amida; (R,S)-3-amino-2-oxo-5-fenil-1,4-benzodiazepin-N-[1-(2-(5-(3-metilbencil)-1,3,4-oxadiazolil]carbonil)-2-(S)-metilpropil]acetamida; (benciloxicarbonil)-L-valil-2-L-(2,3-dihidro-1H-indol)-N-[1-(2-(5-(3-metilbencil)-1,3,4-oxadiazolil]carbonil)-2-(S)-metilpropil]amida; (benciloxicarbonil)-L-valil-2-L-(2,3-dihidro-1H-indol)-N-[1-(2-(5-(3-metilbencil)-1,3,4-oxadiazolil]carbonil)-2-(S)-metilpropil]amida; 3-(S)-(benciloxicarbonil)amino]-epsilon-lactama-N-[1-(2-(5-(3-metilbencil)-1,3,4-oxadiazolil]carbonil)-2-(S)-metilpropil]acetamida; sal de ácido trifluoroacético de 3-(S)-(amino)-epsilon-lactama-N-[1-(2-(5-(3-metilbencil)-1,3,4-oxadiazolil]carbonil)-2-(S)-metilpropil]acetamida; 3-(S)-[4-morfolino carbonil-butanoil]amino]-epsilon-lactama-N-[1-(2-(5-(3-metilbencil)-1,3,4-oxadiazolil]carbonil)-2-(R,S)-metilpropil]acetamida; 6-[4-fluorofenil]-epsilon-lactama-N-[1-(2-(5-(3-metilbencil)-1,3,4-oxadiazolil]carbonil)-2-(S)-metilpropil]acetamida; 2-(2-(R,S)-fenil-4-oxotiazolidin-3-il]-N-[1-(2-(5-(3-metilbencil)-1,3,4-oxadiazolil]carbonil)-2-(S)-metilpropil]acetamida; 2-(2-(B,S)-fenil-4-oxotiazolidin-3-il]-N-[1-(2-(5-(3-metilbencil)-1,3,4-oxadiazolil]hidroximetil)-2-(S)-metilpropil]acetamida; 2-(2-(R,S)-bencil-4-oxotiazolidin-3-il]-N-[1-(2-(5-(3-metilbencil)-1,3,4-oxadiazolil]carbonil)-2-(S)-metilpropil]acetamida; 2-(2-(R,S)-bencil-4-oxotiazolidin-3-iloxido]-N-[1-(3-(5-(3-trifluorometilbencil)-1,2,4-oxadiazolil]carbonil)-2-(R,S)-metilpropil]acetamida; (1-benzoil-3,8-quinazolindiona)-N-[1-(2-(5-(3-metilbencil)-1,3,4-oxadiazolil]carbonil)-2-(S)-metilpropil]acetamida; (1-benzoil-3,6-piperazinadiona)-N-[1-(2-(5-(3-metilbencil)-1,3,4-oxadiazolil]carbonil)-2-(S)-metilpropil]acetamida; (1-fenil-3,6-piperazinadiona)-N-[1-(2-(5-(3-metilbencil)-1,3,4-oxadiazolil]carbonil)-2-(S)-metilpropil]acetamida; [(1-fenil-3,6-piperazinadiona)-N-[1-(3-(5-(3-trifluorometilbencil)-1,2,4-oxadiazolil]carbonil)-2-(S)-metilpropil]acetamida; 3-[(benciloxicarbonil)amino]-quinolin-2-ona-N-[1-(2-(5-(3-metilbencil)-1,3,4-oxadiazolil]carbonil)-2-(S)-metilpropil]acetamida; 3-[(benciloxicarbonil)amino]-7-piperidinil-quinolin-2-ona-N-[1-(2-(5-(3-metilbencil)-1,3,4-oxadiazolil]carbonil)-2-(S)-metilpropil]acetamida; 3-(carbometoxi-quinolin-2-ona)-N-[1-(2-(5-(3-metilbencil)-1,3,4-oxadiazolil]carbonil)-2-(S)-metilpropil]acetamida; 3-(amino-quinolin-2-ona)-N-[1-(2-(5-(3-metilbencil)-1,3,4-oxadiazolil]carbonil)-2-(S)-metilpropil]acetamida; 3-[(4-morfolino)aceto]amino-quinolin-2-ona-N-[1-(2-(5-(3-metilbencil)-1,3,4-oxadiazolil]carbonil)-2-(S)-metilpropil]acetamida; 3,4-dihidro-quinolin-2-ona-N-[1-(2-(5-(3-metilbencil)-1,3,4-oxadiazolil]carbonil)-2-(S)-metilpropil]acetamida; 1-acetil-3-(4-fluorobenciliden)piperazin-2,5-diona-N-[1-(2-(5-(3-metilbencil)-1,3,4-oxadiazolil]carbonil)-2-(S)-metilpropil]acetamida; 1-acetil-3-(4-dimetilamino benciliden)piperazin-2,5-diona-N-[1-(2-(5-(3-metilbencil)-1,3,4-oxadiazolil]carbonil)-2-(S)-metilpropil]acetamida; 1-acetil-3-(4-carbometoxibenciliden)piperazin-2,5-diona-N-[1-(2-(5-(3-metilbencil)-1,3,4-oxadiazolil]carbonil)-2-(S)-metilpropil]acetamida; 1-acetil-3-[(4-piridil]metil]piperazin-2,5-diona-N-[1-(2-(5-(3-metilbencil)-1,3,4-oxadiazolil]caxbonil)-2-(S)-metilpropil]acetamida; 4-[1-bencil-3-(R)-bencil-piperazin-2,5-diona]-N-[1-(2-[5-(3-

metilbencil)-1,3,4-oxadiazolil]carbonil)-2-metilpropil]acetamida; 4-[1-bencil-3-(S)-bencil-piperazin-2,5,-diona]-N-[1-(2-(5-(3-metilbencil)-1,3,4-oxadiazolil]carbonil)-2-(S)-metilpropil]acetamida; 4-[1-bencil-3(R)-bencilpiperazin-2,5-diona]-N-[1-(3-(5-(3-trifluorometilbencil)-1,2,4-oxadiazolil]carbonil)-2-(S)-metilpropil]acetamida; 4-[1-bencil-3-(S)-bencilpiperazin-2,5,-diona]-N-[1-(3-(5-(3-trifluorometilbencil)-1,2,4-oxadiazolil]carbonil)-2-(S)-metilpropil]acetamida; 4-[1-bencil-3-(S)-bencilpiperazin-2,5,-diona]-N-[1-(3-(5-(2-dimetilaminoetil)-1,2,4-oxadiazolil]carbonil)-2-(S)-metilpropil]acetamida; 4-[1-metil-3-(R,S)-fenilpiperazin-2,5,-diona]-N-[1-(3-(5-(3-trifluorometilbencil)-1,2,4-oxadiazolil]carbonil)-2-(S)-metilpropil]acetamida; 4-[[metil-3-(R,S)-fenilpiperazin-2,5,-diona]-N-[1-(2-(5-(3-metilbencil)-1,3,4-oxadiazolil]carbonil)-2-(S)-metilpropil]acetamida; 4-[1-(4-morfolinoetil)-3-(R)-bencilpiperazin-2,5,-diona]-N-[1-(2-(5-(3-metilbencil)-1,3,4-oxadiazolil]carbonil)-2-(S)-metilpropil]acetamida; 5-(R,S)-fenil-2,4-imidazolidindiona-N-[1-(2-(5-(3-metilbencil)-1,3,4-oxadiazolil]carbonil)-2-(S)-metilpropil]acetamida; 5-(R)-bencil-2,4-imidazolidindiona-N-[1-(2-(5-(3-metilbencil)-1,3,4-oxadiazolil]carbonil)-2-(S)-metilpropil]acetamida 5-(S)-bencil-2,4-imidazolidindiona-N-[1-(2-(5-(3-metilbencil)-1,3,4-oxadiazolil]carbonil)-2-(S)-metilpropil]acetamida; 5-(S)-bencil-2,4-imidazolidindiona-N-[1-(3-(5-(3-trifluorometilbencil)-1,2,4-oxadiazolil]carbonil)-2-(S)-metilpropil]acetamida; 5-(R)-bencil-2,4-imidazolidindiona-N-[1-(3-(5-(3-trifluorometilbencil)-1,2,4-oxadiazolil]carbonil)-2-(S)-metilpropil]acetamida; 1-bencil-4-(R)-bencil-2,5-imidazolidindiona-N-[1-(2-(5-(3-metilbencil)-1,3,4-oxadiazolil]carbonil)-2-(S)-metilpropil]acetamida; y 1-bencil-4-(R)-bencil-2,S-imidazolidindiona-N-[1-(3-(5-(3-trifluorometilbencil)-1,2,4-oxadiazolilo]carbonil)-2-(S)-metilpropil]acetamida, entre otras.

Del mismo modo, el documento de patente de EE.UU. nº 5.869.455 da a conocer derivados N-sustituidos; el documento de patente de EE.UU. nº 5.861.380 cetoinhibidores y dicetoinhibidores de proteasas que contienen sistemas de anillos; el documento de patente de EE.UU. nº 5.807.829 análogos tripeptoides de inhibidores de proteasas de serina; el documento de patente de EE.UU. nº 5.801.148 análogos de prolina inhibidores de proteasas de serina; el documento de patente de EE.UU. nº 5.618.792 compuestos heterocíclicos sustituidos útiles como inhibidores de proteasas de serina. Se contemplan otras moléculas igualmente ventajosas, que se pueden usar en lugar de α 1-antitripsina o en combinación con α 1-antitripsina, tal como en el documento WO 98/20034 que describe inhibidores de proteasa de serina procedentes de pulgas. Sin limitarse a esta sola referencia, un experto en la técnica puede emplear fácilmente y sin experimentación indebida compuestos tales como los del documento WO98/23565, que describe compuestos de aminoguanidina y alcoxiguanidina útiles para inhibir proteasas de serina; el documento WO98/50342 describe compuestos de bis-aminometilcarbonilo útiles para el tratamiento de trastornos de proteasas de cisteína y serina; el documento WO98/50420 derivados de aminoácidos cíclicos y de otros, útiles para enfermedades relacionadas con la trombina; el documento WO 97/21690 derivados que contienen D-aminoácidos; el documento WO 97/10231 inhibidores que contienen un grupo cetometileno de proteasas de serina y cisteína; el documento WO 97/03679 inhibidores que contienen fósforo de proteasas de serina y cisteína; el documento WO 98/21186 inhibidores de benzotiazol y heterocíclicos relacionados de proteasas de serina; el documento WO 98/22619 describe una combinación de inhibidores que se unen al sitio P de proteasas de serina con sitio quelante de cationes divalentes; el documento WO 98/22098 una composición que inhibe la conversión de la subfamilia de pro-enzimas CPP32 incluyendo la caspasa 3 (CPP32/Yama/Apopain); el documento WO 97/48706 pirrolo-pirazin-dionas; el documento WO 97/33996 bikunina placentaria humana (recombinante) como inhibidor de la proteasa de serina; el documento WO 98/46597 una molécula que contiene un aminoácido complejo para el tratamiento de infecciones y afecciones víricas descritas anteriormente.

Otros compuestos que tienen actividad inhibidora de proteasa de serina son igualmente adecuados y eficaces para uso en los métodos, incluyendo pero no limitados a: derivados de tetrazol como se describen en el documento WO 97/24339; derivados de ácido guanidinobenzoico como se describen en el documento WO 97/37969 y en varios documentos de patente de EE.UU. nº 4.283.418; 4.843.094; 4.310.533; 4.283.418; 4.224.342; 4.021.472; 5.376.655; 5.247.084; y 5.077.428; derivados de fenilsulfonilamida representados por una fórmula general en el documento WO 97/45402; nuevos derivados de sulfuro, sulfóxido y sulfona representados por una fórmula general en el documento WO 97/49679; nuevos derivados de amidino representados por una fórmula general en el documento WO 99/41231; otros derivados de amidinofenol como se describen en los documentos de patente de EE.UU. nº 5.432.178; 5.622.984; 5.614.555; 5.514.713; 5.110.602; 5.004.612; y 4.889.723, entre muchos otros.

Enfermedades micobacterianas abordadas por la invención

Las enfermedades o trastornos micobacterianos específicos para los cuales son beneficiosas las composiciones y el ácido nucleico que codifica una fusión, así como los métodos terapéuticos para inhibir la infección con micobacterias de macrófagos de la invención, incluyen, pero no se limitan a, aquellas enfermedades o trastornos micobacterianos causados por micobacterias del género *Mycobacterium*, que incluyen *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. leprae*, *M. avium-intracellulare*, *M. chelonae* (también conocida como *borstelense* y *abscessus*), *M. africanum*, *M. Marinium* (también conocida como *balnei* y *Platypoecilus*), *M. Buruli* (también conocida como *ulcerans*), *M. fortuitum* (también conocida como *giae*, *Minetti* y *ranae*), *M. haemophilum*, *M. intracellulare*, *M. kansasii* (también conocida como *luciflavum*), *M. littorale* (también conocida como *xenopi*), *M. malmoense*, *M. marianum* (también conocida como *scrofulaceum* y *paraffinicum*), *M. simiae*, *M. szulgai*, *M. ulcerans*, *M. avium* (también conocida como *brunense*), *M. flavescens*, *M. lepraemurium*, *M. microti* y *M. paratuberculosis* (que es el agente causante de la enfermedad de Johne y una posible causa de la enfermedad de Crohn), *M. gordonae* (también conocida como *aquae*), *M. gastri*, *M. phlei* (también conocida como *moelleri* y como bacilo de timothy), *M. nonchromogenicum*, *M. smegmatis*, *M. terrae*, *M. triviale* y *M. vaccae*.

En otra realización, la micobacteria que inhibe la infección de macrófagos comprende una micobacteria del género *Mycobacterium* que incluye micobacterias no tuberculosas que se dividen en cuatro grupos que comprenden los grupos Runyon, seleccionados a partir del grupo que consiste en el Grupo I (fotocromógenos de crecimiento lento), el Grupo II (escotocromógenos de crecimiento lento), el Grupo III (no fotocromógenos de crecimiento lento) y el Grupo IV (micobacterias de crecimiento rápido).

Bacillus anthracis y toxina del ántrax

La toxina del ántrax, producida por la bacteria *Bacillus anthracis* gram positiva, aerobia en forma de bastoncillo, formadora de esporas, es el factor de virulencia tóxica secretado por este organismo. *B. anthracis* es considerada frecuentemente para uso como arma biológica, debido a la potencia de la exotoxina secretada, y a la capacidad de la bacteria para formar esporas latentes que resisten unas condiciones ambientales duras. La esporulación permite un transporte y distribución rápida de grandes cantidades de bacterias productoras de toxinas. La toxina es en realidad un material compuesto que consiste en 3 proteínas distintas, secretadas desde la bacteria. Las 3 proteínas son el antígeno protector (PA), el factor letal (LF) y el factor de edema (EF). Mientras que LF y EF dañan directamente las células y se piensa que causan la enfermedad debido a la exposición de la toxina del ántrax, el PA es el foco de esta descripción. El PA es crucial para la virulencia de la toxina del ántrax, ya que la molécula de PA está diseñada para introducir tanto LF como EF al interior de las membranas de las células. En ausencia de un transporte intracelular inducido con PA, la toxina del ántrax es incapaz de efectuar la destrucción de los tejidos, ya que LF y EF únicamente actúan desde dentro de la célula. La importancia del PA en la función de la toxina del ántrax está subrayada por el uso eficaz del PA como inmunógeno en la vacuna contra el ántrax. Mediante la generación de una respuesta inmune contra PA, la vacuna confiere protección contra la toxina del ántrax completa (3 componentes).

Un examen más detallado de la interacción entre el PA y las células hospedadoras atacadas por la toxina del ántrax es instructivo. El PA se secreta primero por *B. anthracis* en una forma grande y funcionalmente inactiva. Este PA inactivo se une a un receptor en la superficie de las células hospedadoras. El receptor de PA se ha aislado y secuenciado recientemente, y se ha encontrado que posee regiones similares al factor von Willebrand. Después del acoplamiento en la superficie de las células hospedadoras, el PA interacciona con una proteasa presente en la superficie celular. La proteasa corta (procesa) la molécula grande e inactiva de PA en un fragmento más pequeño y activo. La identidad de esta proteasa ha sido el foco de esfuerzos investigativos limitados, y está mal caracterizada. Sin embargo, estudios previos han mostrado que la proteasa tiene características que sugieren que es una proteasa de serina obtenida a partir del hospedador. Un posible candidato de proteasa de serina observado en las publicaciones, se relaciona con furina (en sí misma, una proteasa de serina), pero otras proteasas de serina, tales como la elastasa, la proteinasa-3 o la tripsina son posibles alternativas. Una vez procesada por la acción de la o las proteasas de serina de la superficie celular, las moléculas de PA activadas se autoensamblan en grupos de 7 (heptámeros) en la superficie celular. Estos heptámeros actúan como un vehículo de transporte para entregar LF y EF en el interior de la célula. Una vez dentro de la célula, LF y EF inician anomalías en la función celular.

Un enfoque novedoso para anular la acción de la toxina del ántrax es bloquear el acceso de la toxina al interior de la célula. El presente inventor ha mostrado, en extensos estudios previos de laboratorio (Leland Shapiro et al. Facet 2000 vol 15:115-122, y datos no publicados del Dr. Leland Shapiro), que las proteasas de serina que residen en la superficie celular se pueden neutralizar por la acción de varios tipos de moléculas que inhiben la función de las proteasas de serina. El inhibidor endógeno natural más importante de las proteasas de serina es alfa-1-antitripsina (AAT). Es de destacar que los niveles de AAT se reducen en los vasos linfáticos, y que la producción de toxina del ántrax y las manifestaciones de la enfermedad se originan desde el interior de los vasos linfáticos. Es posible que la producción de la toxina se produzca en los tejidos linfáticos, ya que las cantidades reducidas de AAT proporcionan un microambiente favorable para mejorar la función de la proteasa de serina. Se espera que tales condiciones aumenten la producción de toxina del ántrax activada. Por lo tanto, administrar al sujeto una cantidad farmacéuticamente eficaz de una sustancia que muestra actividad α 1-antitripsina de mamífero o de inhibidor de la proteasa de serina, sirve para atenuar o abolir la actividad de la toxina del ántrax, mediante el bloqueo de la actividad de la proteasa de serina obtenida a partir del hospedador, que reside en la superficie celular. Esto anulará el procesamiento en la superficie celular del PA grande inactivo en el fragmento de PA activo menor. Por lo tanto, al interferir con la actividad de la proteasa de serina del hospedador, se interrumpirá la capacidad del heptámero PA63 para formar el preporo y, en última instancia, el poro. Al desarmar la toxina del ántrax utilizando este enfoque novedoso (véanse las Figuras 4A-4H) se obtienen varias ventajas, en comparación con enfoques alternativos a modo de ejemplo y no de limitación:

1. La inhibición de la proteasa de serina, como una estrategia para tratar una infección con ántrax, es muy probable que sea resistente a una mutación bacteriana debido a la presión selectiva. Eligiendo dirigir o inhibir las proteasas de serina originarias de la célula hospedadora, la molécula diana es inalterable.

2. Los inhibidores sintéticos de proteasas de serina (miméticos de tipo AAT) se pueden desarrollar y han sido desarrollados (véase, *infra*, CE-2072). Un agente farmacéutico de este tipo se puede formular en forma de pastilla en el ámbito de consumo oral o se puede formular como un inhalador para el tratamiento del ántrax mediante inhalación.

3. Los agentes disponibles en el mercado, ya aprobados para uso alternativo en el ser humano, funcionarán como un tratamiento para el ántrax. Estos agentes se utilizan actualmente para indicaciones distintas de la toxicidad del ántrax, e incluyen AAT inyectable, preparaciones de plasma, aprotinina y otros (American J. Of Resp Critical Care Med 1998, VII 158: 49-59). Una posible ejemplificación de esta invención puede tener una aplicación práctica inmediata. Los inhibidores de proteasas de serina han sido administrados a los pacientes mediante inhalación. Dado que la forma más letal de infección con ántrax es la invasión pulmonar, un agente inhalado (AAT natural o un mimético sintético de tipo AAT/u otro inhibidor de proteasas de serina) puede ser especialmente útil debido a las elevadas concentraciones locales, la facilidad de administración del fármaco y la falta de efectos secundarios (ya que la administración no es sistémica). Este modo de administración dirigida de los fármacos puede aumentar la actividad del inhibidor de la proteasa serina dentro de los vasos linfáticos pulmonares y mediastínicos, que son los principales sitios en donde se piensa que el ántrax inicia una enfermedad fulminante.

4. Al neutralizar la toxina del ántrax, se interrumpe la causa directa de la enfermedad en los individuos infectados. Los antibióticos, por otra parte, no se dirigen a la actividad de la toxina, y no pueden afectar a la toxina producida antes de la destrucción de las bacterias. Esta invención contempla específicamente la inhibición de proteasas de serina de células hospedadoras, junto con la administración de uno o varios antibióticos antibacterianos. Los antibióticos detendrán adicionalmente la producción de toxinas, evitando el crecimiento de las bacterias y/o destruyendo la fuente bacteriana de la toxina.

5. Este enfoque de la terapia del ántrax es probablemente seguro. Existe una extensa experiencia clínica en el uso de AAT inyectable para el tratamiento de pacientes con una carencia genética de AAT. No se han detectado efectos adversos a largo plazo hasta la fecha (American J. Of Resp Critical Care Med 1998, VII 158: 49-59; Wencker et al. Chest 2001 119:737-744). Por otra parte, un inhibidor de molécula pequeña de la proteasa de serina del hospedador ha sido administrado a pacientes con la enfermedad de Kawasaki (Ulinistatin, Onto pharmaceuticals), con un excelente historial de seguridad y tolerabilidad. Además, la inhibición de las proteasas de serina del hospedador para el tratamiento de la infección con ántrax solo requerirá un curso de tratamiento corto, minimizando de este modo cualquier problema potencial por una exposición a largo plazo a la AAT o a miméticos de tipo AAT/u otros inhibidores de la proteasa serina.

6. También se pueden emplear receptores de ántrax solubles (Bradley et al. Nature 2001 vol. 414), lisis con bacteriófagos de organismos de ántrax (Schuch et al. Nature 2002 vol. 418 884-889), componentes de la toxina del ántrax mutantes dominantes negativo (Sellman et al. Science 2001 VI 292: 695-697) e inhibidores polivalentes (Mourez et al Nature Biotech 2001 Vol. 19:958-961) junto con los métodos basados en el ántrax de la presente invención.

Por lo tanto, de cara a lo anterior, la presente invención describe métodos para prevenir un síntoma de ántrax en un sujeto sospechoso de haber estado expuesto o que se piensa que tiene riesgo de exposición a *Bacillus anthracis*, que comprenden administrar al sujeto una cantidad farmacéuticamente eficaz de una sustancia que muestra actividad α 1-antitripsina de mamífero o de inhibidor de la proteasa de serina. La presente invención también describe un método para mejorar un síntoma de ántrax en un sujeto que requiere dicha mejora, que comprende administrar al sujeto una cantidad farmacéuticamente eficaz de una sustancia que muestra actividad α 1-antitripsina de mamífero o de inhibidor de la proteasa de serina.

En cada uno de los métodos citados anteriormente, los síntomas clínicos del ántrax se pueden inhibir o prevenir mediante la administración de una sustancia que muestra actividad α 1-antitripsina de mamífero o de inhibidor de la proteasa de serina.

Síntomas clínicos del ántrax

El ántrax tiene lugar como tres entidades clínicas generales: formas por i) inhalación, ii) cutánea y iii) gastrointestinal.

i) El ántrax por inhalación es la forma más mortal de la enfermedad, y es la que tiene más probabilidad de estar implicada en una disputa o un accidente con armas biológicas. Por lo general, una persona infectada inhala las esporas de ántrax por casualidad o durante un ataque con armas biológicas. Después de un período de incubación de 1-6 días, se produce una enfermedad bifásica. Inicialmente, hay malestar/ fiebre/tos seca/mialgias y dolores pectorales no específicos. La segunda fase se produce 2-3 días después de la primera fase, y consiste en una progresión de los hallazgos no específicos constitucionales mencionados anteriormente, una adición de compromiso ventilatorio, sudoración, ampliación del mediastino en estudios radiográficos y edema del cuello y el pecho. Esta etapa de la enfermedad se caracteriza por una linfadenitis mediastínica necrotizante. Esta segunda etapa de la enfermedad puede progresar rápidamente a un choque y muerte al cabo de 2 días, y se han descrito tasas de mortalidad de hasta el 80%. El mecanismo de la muerte en modelos animales parece ser una producción incrementada de citocinas proinflamatorias, especialmente BL-1. Es de señalar, en relación con la descripción de la presente invención, que el tejido linfático carece de actividad inhibitoria de proteasa de serina en comparación con otros tejidos del cuerpo. La implicación es que la toxina del ántrax se activa de forma selectiva en regiones del cuerpo (sistema linfático), en donde hay un desequilibrio en la función de la proteasa de serina/anti-proteasa de serina que favorece la actividad de la

proteasa de serina. Una realización preferida para el uso de la presente invención para tratar el ántrax por inhalación, es administrar grandes cantidades de un inhibidor de la proteasa de serina (natural o sintético) mediante inhalación. Esto dará lugar a un cambio en el equilibrio de la proteasa de serina/inhibidor de la proteasa de serina en los tejidos linfáticos pulmonares y mediastínicos frente a la actividad antiproteasa. Esto dará como resultado el bloqueo del evento de procesamiento en la superficie celular que se requiere para la actividad de la toxina del ántrax.

ii) El ántrax cutáneo es la forma más frecuente (>95%) de infección con ántrax en los seres humanos. Después de una exposición a las esporas del ántrax, las regiones de piel desnuda (cortes, abrasiones, etc.), presentan un entorno que permite que los organismos del ántrax emerjan desde el estado de spora, para crecer y replicarse y producir la toxina del ántrax. Al cabo de 1 semana, en la zona de inoculación del ántrax se desarrolla una pápula indolora. Las vesículas se forman después en o cerca de la pápula durante los siguientes 1-2 días, seguidas en breve por el desarrollo de fiebre y malestar general, y un edema no de picadura que rodea la lesión de la piel que se debe a la actividad de la toxina. La lesión original (frecuentemente entonces una vesícula) se rompe para formar una ulceración necrótica y ampliación, esto da como resultado la formación de la escara que caracteriza una infección por ántrax cutáneo. En ausencia de terapia, esta enfermedad tiene un 20% de mortalidad. Para aquellos que se recuperan, la escara se desprende en 1-2 semanas. Una realización preferida para el tratamiento del ántrax cutáneo, es la administración de un inhibidor de la proteasa de serina (natural o sintético en una preparación tópica/crema. La terapia con inhibidor de proteasa de serina parenteral también se puede coadministrar en el caso de que surjan síntomas sistémicos, o tal terapia parenteral se puede administrar profilácticamente para el ántrax que aparece de forma clínica que está localizado en la piel.

iii) El ántrax gastrointestinal aparece después de la ingestión de esporas del ántrax. Después de 2-5 días, se desarrollan náuseas/vómitos/fiebre y dolor abdominal. Una diarrea con sangre sobreviene rápidamente, y se manifiesta un "abdomen agudo". La patología dentro del abdomen incluye úlceras en la mucosa. También se desarrolla una linfadenitis mesentérica hemorrágica, y esto es de nuevo compatible con una activación selectiva de la toxina del ántrax en microentornos que carecen de inhibidor de la proteasa de serina. Esta enfermedad tiene una tasa de mortalidad del 50%.

Proteínas aisladas para uso en las composiciones y métodos de la invención

Un aspecto de la invención se refiere a proteínas aisladas y a porciones biológicamente activas de las mismas, así como a fragmentos polipeptídicos adecuados para uso como inmunógenos para generar anticuerpos dirigidos contra un polipéptido. En una realización, el polipéptido natural se puede aislar a partir de células o fuentes de tejido a través de un esquema de purificación apropiado, usando técnicas de purificación de proteínas convencionales. En otra realización, los polipéptidos se producen por técnicas de ADN recombinante. De forma alternativa a la expresión recombinante, un polipéptido de la invención se puede sintetizar químicamente usando técnicas de síntesis de péptidos convencionales.

También se conocen variantes modificadas y no mutantes recombinantes de alfa1-antitripsina, producidas por métodos de ingeniería genética (documento de Patente de EE.UU. n° 4.711.848). La secuencia de nucleótidos de alfa1-antitripsina humana y otras variantes de alfa1-antitripsina humana se han descrito en el documento de solicitud internacional publicada n° WO 86/00.337. Esta secuencia de nucleótidos se puede utilizar como material de partida para generar todas las variantes de aminoácidos de AAT y fragmentos de aminoácidos representados en este documento, empleando técnicas de ADN recombinante y métodos conocidos por los expertos en la técnica.

Una proteína "aislada" o "purificada" o una porción biológicamente activa de la misma está sustancialmente exenta de material celular u otras proteínas contaminantes procedentes de la fuente de células o tejido, a partir de la cual se obtiene la proteína, o está sustancialmente exenta de precursores químicos u otros productos químicos cuando se sintetiza químicamente. La expresión "sustancialmente exenta de material celular" incluye preparaciones de proteína en donde la proteína se separa de los componentes celulares de las células a partir de los cuales se aísla o se produce recombinantemente. Por lo tanto, la proteína que está sustancialmente exenta de material celular incluye preparaciones de proteína que tienen menos de aproximadamente 30%, 20%, 10% o 5% (en peso seco) de proteína heteróloga (también referida en esta memoria como "proteína contaminante"). Cuando la proteína o una porción biológicamente activa de la misma se produce de forma recombinante, de forma preferible también está sustancialmente exenta de medio de cultivo, es decir, el medio de cultivo representa menos de aproximadamente 20%, 10% o 5% del volumen de la preparación de proteína. Cuando la proteína se produce por síntesis química, de forma preferible está sustancialmente exenta de precursores químicos u otros productos químicos, es decir, está separada de los precursores químicos u otros productos químicos que están implicados en la síntesis de la proteína. Por consiguiente, tales preparaciones de la proteína tienen menos de aproximadamente 30%, 20%, 10%, 5% (en peso seco) de precursores o compuestos químicos distintos del polipéptido de interés.

Las porciones biológicamente activas de un polipéptido incluyen polipéptidos que comprenden secuencias de aminoácidos suficientemente idénticas u obtenidas a partir de la secuencia de aminoácidos de la proteína (por ejemplo, la secuencia de aminoácidos mostrada en cualquiera de SEQ ID NOS: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43,

44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60), que incluye menos aminoácidos que la proteína de longitud completa, y muestran al menos una actividad de la proteína de longitud completa correspondiente. Por lo general, las porciones biológicamente activas comprenden un dominio o un motivo con al menos una actividad de la proteína correspondiente. Una porción biológicamente activa de una proteína puede ser un polipéptido que tiene, por ejemplo, 10, 25, 50, 100 o más aminoácidos de longitud. Además, otras porciones biológicamente activas, en las que se delecionan otras regiones de la proteína, se pueden preparar por técnicas recombinantes y se evalúan en relación con una o varias de las actividades funcionales de la forma natural de un polipéptido.

Los polipéptidos preferidos tienen la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NOS: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59 y 60. Otras proteínas útiles son sustancialmente idénticas (por ejemplo, al menos aproximadamente 45%, preferiblemente 55%, 65%, 75%, 85%, 95% o 99%) a cualquiera de SEQ ID NOS: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59 y 60, y conservan la actividad funcional de la proteína de origen natural correspondiente, aunque difieren en la secuencia de aminoácidos debido a una variación alélica natural o mutagénesis.

Para determinar el porcentaje de identidad de dos secuencias de aminoácidos o de dos ácidos nucleicos, las secuencias se alinean con el fin de una comparación óptima (por ejemplo, se pueden introducir huecos en la secuencia de una primera secuencia de aminoácidos o de ácido nucleico para tener una alineación óptima con una segunda secuencia de aminoácidos o de ácido nucleico). Los residuos de aminoácidos o nucleótidos en las posiciones de aminoácidos o posiciones de nucleótidos correspondientes se comparan a continuación. Cuando una posición en la primera secuencia está ocupada por el mismo residuo de aminoácido o nucleótido que en la posición correspondiente en la segunda secuencia, entonces las moléculas son idénticas en esa posición. El porcentaje de identidad entre las dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias (es decir, el % de identidad = n° de posiciones idénticas/ n° total de posiciones (por ejemplo, posiciones solapantes) x 100). En una realización, las dos secuencias tienen la misma longitud.

La determinación del porcentaje de identidad entre dos secuencias se puede lograr utilizando un algoritmo matemático. Un ejemplo preferido no limitante de un algoritmo matemático utilizado para la comparación de dos secuencias, es el algoritmo de Karlin y Altschul (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264-2268, modificado como en Karlin y Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. 90:5873-5877. Un algoritmo de este tipo se incorpora en los programas NBLAST y XBLAST de Altschul et al. (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410. Las búsquedas de nucleótidos en BLAST se pueden realizar con el programa NBLAST, puntuación = 100, longitud de palabra = 12, para obtener secuencias de nucleótidos que son homólogas a una molécula de ácido nucleico. Las búsquedas de proteínas en BLAST se pueden realizar con el programa XBLAST, puntuación = 50, longitud de palabra = 3 para obtener secuencias de aminoácidos que son homólogas a una molécula de proteína. Para obtener alineaciones con huecos con fines comparativos, se puede emplear Gapped BLAST como se describe en Altschul et al. (1997) Nucleic Acids Res. 25:3389-3402. Como alternativa, PSI-Blast se puede utilizar para realizar una búsqueda iterada que detecta relaciones distantes entre moléculas (Id.). Cuando se utilizan los programas BLAST, Gapped BLAST y PSI-BLAST, los parámetros por defecto de los programas respectivos (por ejemplo, XBLAST y NBLAST) se pueden utilizar. Véase <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

Otro ejemplo preferido, no limitante de un algoritmo matemático utilizado para la comparación de secuencias, es el algoritmo de Myers y Miller, CABIOS (1989). Un algoritmo de este tipo se incorpora en el programa ALIGN (versión 2.0) que es parte del paquete de programas de alineación de secuencias CGC. Cuando se utiliza el programa ALIGN para comparar secuencias de aminoácidos, se puede utilizar una tabla de residuos en peso PAM120, una penalización por longitud de hueco de 12 y una penalización por hueco de 4. Algoritmos adicionales para el análisis de secuencias son conocidos en la técnica e incluyen ADVANCE y ADAM como se describen en Torellis y Robotti (1994) Comput. Appl. Biosci. 10:3-5; y FASTA descrito en Pearson y Lipman (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. 85:2444-8. Dentro de FASTA, ktup es una opción de control que establece la sensibilidad y la velocidad de la búsqueda. Si ktup = 2, se encuentran regiones similares en las dos secuencias que se están comparando, examinando parejas de residuos alineados; si ktup = 1, se examinan aminoácidos alineados individuales. ktup se puede ajustar a 2 o 1 para las secuencias de proteínas o de 1 a 6 para secuencias de ADN. El valor por defecto, si ktup no se especifica, es 2 para las proteínas y 6 para el ADN. Para una descripción adicional de los parámetros de FASTA, véase <http://bioweb.pasteur.fr/docs/Man/man/fasta.1.html#sect2>.

El porcentaje de identidad entre dos secuencias se puede determinar usando técnicas similares a las descritas anteriormente, permitiendo huecos o sin permitirlos. Al calcular el porcentaje de identidad, solo se cuentan las coincidencias exactas.

La presente invención también se refiere a variantes de los polipéptidos. Tales variantes tienen una secuencia de aminoácidos alterada que puede actuar como agonista (mimético) o como antagonista. Las variantes se pueden generar por mutagénesis, por ejemplo, mutación puntual discreta o truncamiento. Un agonista puede conservar sustancialmente las mismas, o un subconjunto, de las actividades biológicas de la forma natural de la proteína. Un antagonista de una proteína puede inhibir una o varias de las actividades de la forma natural de la proteína, por ejemplo, mediante una unión competitiva a un miembro de una cascada de señalización celular, aguas abajo o

aguas arriba, que incluye la proteína de interés. Por lo tanto, los efectos biológicos específicos pueden ser provocados por un tratamiento con una variante de función limitada. El tratamiento de un sujeto con una variante que tiene un subconjunto de las actividades biológicas de la forma natural de la proteína, puede tener menos efectos secundarios en un sujeto con respecto al tratamiento con la forma natural de la proteína.

5 Las variantes de una proteína que actúan como agonistas (miméticos) o como antagonistas, se pueden identificar mediante un escrutinio de bancos combinatorios de mutantes, por ejemplo, mutantes por truncamiento, en busca de la proteína para la actividad agonista o antagonista. En una realización, un banco diversificado de variantes se genera por mutagénesis combinatoria a nivel de ácido nucleico y se codifica en una genoteca diversificada. Un banco diversificado de variantes se puede producir, por ejemplo, ligando enzimáticamente una mezcla de
10 oligonucleótidos sintéticos en secuencias de genes, de tal manera que un conjunto degenerado de secuencias de proteínas potenciales se puede expresar como polipéptidos individuales o, alternativamente, como un conjunto de proteínas de fusión más grandes (por ejemplo, para la visualización en fase). Existe una variedad de métodos que se pueden utilizar para producir bancos de variantes potenciales de los polipéptidos de la invención, a partir de una secuencia de oligonucleótidos degenerada. Los métodos para sintetizar oligonucleótidos degenerados se conocen en la técnica (véanse, por ejemplo, Narang (1983) *Tetrahedron* 39:3; Itakura et al. (1984) *Annu. Rev. Biochem.*
15 53:323; Itakura et al. (1984) *Science* 198:1056; Ike et al. (1983) *Nucleic Acid Res.* 11:477).

Además, los bancos de fragmentos de la secuencia codificante de un polipéptido se pueden utilizar para generar una población diversificada de polipéptidos para escrutar y seleccionar posteriormente las variantes. Por ejemplo, un banco de fragmentos de secuencias codificantes se puede generar mediante el tratamiento de un fragmento de PCR
20 bicatenario de la secuencia codificante de interés, con una nucleasa en condiciones en las que el mellado se produce solo aproximadamente una vez por molécula, desnaturalizando el ADN bicatenario, renaturalizando el ADN para formar ADN bicatenario que puede incluir parejas sentido/antisentido de diferentes productos mellados, eliminando porciones monocatenarias de los dúplex formados de nuevo mediante tratamiento con nucleasa S1 y ligando el banco de fragmentos resultante en un vector de expresión. Mediante este método, se puede obtener un banco de expresión que codifica fragmentos N-terminales e internos de diversos tamaños de la proteína de interés.

Se conocen varios métodos en la técnica para escrutar productos génicos de bancos combinatorios preparados por mutaciones puntuales o truncamiento, y para el escrutinio de genotecas de ADNc en busca de productos génicos que tienen una propiedad seleccionada. Las técnicas empleadas más ampliamente, que son susceptibles de un análisis de rendimiento elevado, para el escrutinio de genotecas de genes grandes, incluyen típicamente la
30 clonación de la genoteca en vectores de expresión replicables, la transformación de células apropiadas con la genoteca de vectores resultante y la expresión de los genes combinatorios en condiciones en las cuales la detección de una actividad deseada facilita el aislamiento del vector que codifica el gen cuyo producto se había detectado. La mutagénesis recursiva de conjunto (REM), una técnica que mejora la frecuencia de mutantes funcionales en las genotecas, se puede utilizar en combinación con los ensayos de escrutinio para identificar variantes de una proteína (Arkin y Yourvan (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:7811-7815; Delgrave et al. (1993) *Protein Engineering*
35 6(3):327-331).

Un polipéptido aislado o un fragmento del mismo, se puede utilizar como un inmunógeno para generar anticuerpos usando técnicas convencionales para la preparación de anticuerpos monoclonales y policlonales. El polipéptido o la proteína de longitud completa se pueden utilizar o, alternativamente, la invención describe fragmentos de péptidos
40 antigénicos para uso como inmunógenos. El péptido antigénico de una proteína comprende al menos 8 (preferiblemente 10, 15, 20 o 30) residuos de aminoácidos de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NOs: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59 y 60, e incluye un epítipo de la proteína, de tal manera que un anticuerpo generado contra el péptido forma un complejo inmune específico con la
45 proteína.

Proteínas de fusión para uso en las composiciones y los métodos

En cada uno de los aspectos mencionados anteriormente y las realizaciones de la invención, los polipéptidos de fusión también se contemplan específicamente en el presente documento.

En una realización, los polipéptidos de fusión de la invención se producen mediante técnicas de ADN recombinante. De forma alternativa a la expresión recombinante, un polipéptido de fusión de la invención se puede sintetizar
50 químicamente usando técnicas de síntesis de péptidos convencionales. La presente invención también proporciona composiciones que comprenden un polipéptido de fusión de la invención y un vehículo, excipiente o diluyente farmacéuticamente aceptable.

En cada uno de los métodos citados anteriormente, la α 1-antitripsina de mamífero o una sustancia inhibidora de la actividad de la proteasa de serina puede formar parte de un polipéptido de fusión, en donde dicho polipéptido de fusión comprende α 1-antitripsina de mamífero o una sustancia inhibidora de la actividad de la proteasa de serina y una secuencia de aminoácidos heteróloga a dicha α 1-antitripsina de mamífero o sustancia inhibidora de la actividad de la proteasa de serina.

Entre los polipéptidos de fusión particulares de la invención se encuentran, por ejemplo, polipéptidos de fusión que comprenden la secuencia de aminoácidos de la α 1-antitripsina representada a continuación en SEQ ID NO: 61.

1 01 01 01 01 0

MPSSVSWGIL LAGLCCLVPV SLAEDPQGDA AQKTDTSHHH
 QDHPTFNKIT

PNLAEFASL YRQLAHQSNS TNIFFSPVSI ATAFAMLSLG TKADTHDEL

100

EGLNFNLTET PEAQIHEGFQ ELLRTLNPQD SQLQLTTGNG LFLSEGLKLV
 DKFLEDVKKL YHSEAFVNF GDHBEAKKQI NDYVEKGTQG

KIVDLVKELD 200

RDTVFALVNY IFFKGKWERP FEVKDTEDED FHVDQVTTVK
 VPMMKRLGMF

NIHQCKLSS WVLLMKYLG NATAIFFLPDE GKLOHLENEL THDIITKFL

300

NEDRRSASLH LPKLSITGTY DLKSVLGQLG ITKVFSNGAD LSGVTEEAPL
 KLSKAVHKAV LTIDEKGTEA AGAMFLEAIP MSIPPEVKFN KPFVFLMIEQ

400

NTKSPLFMGK VVNPTQK 417
 (SEQ ID NO: 61)

5 Los polipéptidos de fusión de la invención pueden ser aquellos en los que la secuencia de aminoácidos heteróloga comprende una región constante de inmunoglobulina humana, tal como una región constante de IgG1 humana, que incluye una región constante modificada de IgG1 humana, en donde la región constante de IgG1 no se une al receptor de Fc y/o no inicia reacciones de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC).

10 En particular, en una realización, la proteína de fusión comprende una secuencia heteróloga que es una secuencia obtenida a partir de un miembro de la familia de proteínas inmunoglobulinas, por ejemplo, comprende una región constante de inmunoglobulina, por ejemplo, una región constante de inmunoglobulina humana tal como una región constante de IgG1 humana. La proteína de fusión, por ejemplo, puede comprender una porción de una α 1-antitripsina de mamífero o un polipéptido inhibidor de la actividad proteasa de serina fusionado con el extremo amino-terminal o carboxilo-terminal de una región constante de inmunoglobulina, como se describe, por ejemplo, en el documento de patente de EE.UU. n° 5.714.147, patente de EE.UU. n° 5.116.964, patente de EE.UU. n° 5.514.582, y patente de EE.UU. n° 5.455.165. En aquellas realizaciones en las que todo o una parte de un polipéptido de la invención se fusiona con secuencias obtenidas a partir de un miembro de la familia de proteínas inmunoglobulinas, la región FcR de la inmunoglobulina puede ser de tipo silvestre o mutada. En ciertas realizaciones, es deseable utilizar una proteína de fusión de inmunoglobulina que no interaccione con un receptor de Fc y no inicie reacciones de ADCC. En tales casos, la secuencia heteróloga de inmunoglobulina de la proteína de fusión se puede mutar para inhibir tales reacciones. Véanse, por ejemplo, los documentos de patente de EE.UU. n° 5.985.279 y WO 98/06248.

20 La secuencia de aminoácidos heteróloga de los polipéptidos de fusión utilizada como parte de la presente invención, también puede comprender una secuencia de aminoácidos útil para la identificación, el seguimiento o la purificación del polipéptido de fusión, por ejemplo, puede comprender una secuencia marcadora FLAG o His. El polipéptido de fusión puede comprender además una secuencia de aminoácidos que contiene un sitio de escisión proteolítica que, por ejemplo, puede ser útil para la eliminación de la secuencia de aminoácidos heteróloga de la α 1-antitripsina o un inhibidor de un derivado de proteasa de serina o una secuencia mimética del polipéptido de fusión.

25 En particular, la secuencia heteróloga de aminoácidos de los polipéptidos de fusión de la presente invención también puede comprender una secuencia de aminoácidos útil para la identificación, el seguimiento o la purificación del polipéptido de fusión, por ejemplo, puede comprender una secuencia marcadora FLAG (véase, por ejemplo, Hoop, T. P. et al., Bio/Technology 6,1204-1210 (1988); Prickett, K. S. et al., BioTechniques 7, 580-589 (1989)) o un

30

marcador His (Van Reeth, T. et al., *BioTechniques* 25, 898-904 (1998)). El polipéptido de fusión puede comprender además una secuencia de aminoácidos que contiene un sitio de escisión proteolítica que, por ejemplo, puede ser útil para la eliminación de la secuencia de aminoácidos heteróloga de la α 1-antitripsina de mamífero o de la secuencia polipeptídica de la actividad de un inhibidor de la proteasa de serina del polipéptido de fusión.

5 En aún otra realización, la α 1-antitripsina de mamífero o la proteína de fusión del polipéptido con actividad similar a un inhibidor de la proteasa de serina comprende una proteína de fusión GST en donde la α 1-antitripsina de mamífero o del polipéptido con actividad de inhibidor de la proteasa de serina se fusiona con el extremo C-terminal de las secuencias de GST. Una proteína de fusión de este tipo puede facilitar la purificación de un polipéptido recombinante de la invención. En las realizaciones en las que se emplea una estructura artificial de fusión con un
10 marcador GST, FLAG o His en la construcción de la α 1-antitripsina de mamífero o las proteínas de fusión del polipéptido con actividad de inhibidor de la proteasa de serina, los sitios de escisión proteolítica se pueden introducir opcionalmente en la unión del resto de fusión y la α 1-antitripsina de mamífero o el polipéptido con actividad de inhibidor de la proteasa de serina, para permitir la separación de la α 1-antitripsina de mamífero o el polipéptido con actividad de inhibidor de la proteasa de serina, del resto de fusión, después de la purificación de la α 1-antitripsina de
15 mamífero o el polipéptido con actividad de inhibidor de la proteasa de serina. Tales enzimas, y sus secuencias de reconocimiento cognadas, incluyen, por ejemplo, sin limitación, Factor Xa, trombina y enterocinasa. Los vectores de expresión de fusión típicos incluyen pGEX (Pharmacia Biotech Inc.; Smith y Johnson (1988) *Gene* 67:31-40), pMAL (New England Biolabs, Beverly, Mass.) y pRIT5 (Pharmacia, Piscataway, N.J.) que se pueden usar para fusionar la glutatión S-transferasa (GST), la proteína que se une a maltosa E o la proteína A, respectivamente, con la α 1-antitripsina de mamífero o la proteína del polipéptido con actividad de inhibidor de la proteasa de serina diana.
20

Los vectores de expresión se pueden diseñar de forma rutinaria para la expresión de un polipéptido de fusión en células procariotas (por ejemplo, *E. coli*) o células eucariotas (por ejemplo, células de insecto (utilizando vectores de expresión de baculovirus), células de levadura o células de mamífero). Las células hospedadoras adecuadas se describen adicionalmente en Goeddel, *supra*. Alternativamente, el vector de expresión recombinante se puede transcribir y traducir *in vitro*, por ejemplo, utilizando secuencias reguladoras del promotor T7 y la polimerasa T7.
25

La expresión de proteínas en procariotas se lleva a cabo lo más frecuentemente en *E. coli* con vectores que contienen promotores constitutivos o inducibles que dirigen la expresión de proteínas de fusión o no fusión. Los vectores de fusión añaden una cantidad de aminoácidos a una proteína codificada en ellos, normalmente en el extremo amino-terminal de la proteína recombinante. Tales vectores de fusión sirven por regla general para tres
30 fines: 1) aumentar la expresión de la proteína recombinante; 2) incrementar la solubilidad de la proteína recombinante; y 3) ayudar en la purificación de la proteína recombinante actuando como ligando en una purificación por afinidad. Frecuentemente, en los vectores de expresión de fusión, se introduce un sitio de escisión proteolítica en la unión del resto de fusión y la proteína recombinante para permitir una separación de la proteína recombinante desde el resto de fusión, después de la purificación de la proteína de fusión. Tales enzimas, y sus secuencias de reconocimiento cognadas, incluyen Factor Xa, trombina y enterocinasa. Los vectores de expresión de fusión típicos incluyen pGEX (Pharmacia Biotech Inc; Smith y Johnson (1988) *Gene* 67:31-40), pMAL (New England Biolabs, Beverly, MA) y pRIT5 (Pharmacia, Piscataway, NJ) que fusionan la glutatión S-transferasa (GST), la proteína que se une a maltosa E o la proteína A, respectivamente, con la proteína recombinante diana.
35

Ejemplos de vectores de expresión de no fusión de *E. coli*, adecuados e inducibles, incluyen pTrc (Amann et al., (1988) *Gene* 69:301-315) y pET 11d (Studier et al., *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology* 185, Academic Press, San Diego, California (1990) 60-89). La expresión del gen diana a partir del vector pTrc se basa en la transcripción de una polimerasa de ARN del hospedador a partir de un promotor de fusión trp-lac híbrido. La expresión del gen diana a partir del vector pET 11d se basa en la transcripción a partir de un promotor de fusión T7 gn10-lac mediada por una polimerasa de ARN viral coexpresada (T7 gn1). Esta polimerasa viral es suministrada por
40 cepas hospedadoras BL21(DE3) o HMS174(DE3) a partir de un profago residente que alberga un gen T7 gn1 bajo el control transcripcional del promotor lacUV 5.
45

Una estrategia para maximizar la expresión de la proteína recombinante en *E. coli*, es expresar la proteína en una bacteria hospedadora con capacidad alterada para escindir proteolíticamente la proteína recombinante (Gottesman, *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology* 185, Academic Press, San Diego, California (1990) 119-128).
50 Otra estrategia es alterar la secuencia de ácido nucleico del ácido nucleico que se va a insertar en un vector de expresión, de modo que los codones individuales para cada aminoácido sean los utilizados preferentemente en *E. coli* (Wada et al. (1992) *Nucleic Acids Res.* 20:2111-2118). Una alteración de este tipo de las secuencias de ácido nucleico se puede llevar a cabo mediante técnicas de síntesis de ADN convencionales.

En otra realización, el vector de expresión es un vector de expresión de levadura. Ejemplos de vectores para la expresión en la levadura *S. cerevisiae* incluyen pYepSec1 (Baldari et al. (1987) *EMBO J.* 6:229-234), pMFa (Kurjan y Herskowitz, (1982) *Cell* 30:933-943), pJRY88 (Schultz et al. (1987) *Gene* 54:113-123), pYES2 (Invitrogen Corporation, San Diego, CA) y pPicZ (Invitrogen Corp, San Diego, CA).
55

Alternativamente, el vector de expresión es un vector de expresión de baculovirus. Los vectores de baculovirus disponibles para la expresión de proteínas en células de insecto cultivadas (por ejemplo, células Sf 9) incluyen la serie pAc (Smith et al. (1983) *Mol. Cell Biol.* 3:2156-2165) y la serie pVL (Lucklow y Summers (1989) *Virology*
60

170:31-39).

En aún otra realización, un ácido nucleico se expresa en células de mamífero utilizando un vector de expresión de mamífero. Ejemplos de vectores de expresión de mamífero incluyen pCDM8 (Seed (1987) Nature 329:840) y pMT2PC (Kaufman et al. (1987) EMBO J. 6:187-195). Cuando se utiliza en células de mamífero, las funciones de control del vector de expresión se proporcionan frecuentemente mediante elementos reguladores víricos. Por ejemplo, los promotores usados comúnmente se obtienen a partir de poliovirus, adenovirus 2, citomegalovirus y virus de simio 40. Para otros sistemas de expresión adecuados tanto para células procariotas como eucariotas, véanse los capítulos 16 y 17 de Sambrook *et al.*, *supra*.

En otra realización, el vector de expresión de mamífero recombinante es capaz de dirigir la expresión del ácido nucleico, preferentemente en un tipo de célula particular (por ejemplo, los elementos reguladores específicos de tejido se utilizan para expresar el ácido nucleico). Elementos reguladores específicos de tejido son conocidos en la técnica. Ejemplos no limitantes de promotores específicos de tejido adecuados incluyen el promotor de albúmina (específico del hígado; Pinkert et al. (1987) Genes Dev. 1:268-277), promotores específicos linfoides (Calame e Eaton (1988) Adv. Immunol. 43:235-275), en particular promotores de receptores de linfocitos T (Winoto y Baltimore (1989) EMBO J. 8:729-733) e inmunoglobulinas (Banerji et al. (1983.) Cell 33:729-740; Queen y Baltimore (1983) Cell 33:741-748), promotores específicos de neuronas (por ejemplo, el promotor de neurofilamentos; Byrne y Ruddle (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:5473-5477), promotores específicos del páncreas (Edlund et al. (1985) Science 230:912-916) y promotores específicos de la glándula mamaria (por ejemplo, promotor de lactosuero; documento de patente de EE.UU. nº 4.873.316 y publicación de Solicitud Europea nº 264.166). Los promotores regulados por el desarrollo están también incluidos, por ejemplo, los promotores *hox* murinos (Kessel y Gruss (1990) Science 249: 374-379) y el promotor de alfa-fetoproteína (Campes y Tilghman (1989) Genes Dev. 3:537-546).

Una célula hospedadora puede ser cualquier célula procariota (por ejemplo, *E. coli*) o eucariota (por ejemplo, células de insecto, células de levadura o de mamífero).

El ADN del vector se puede introducir en células procariotas o eucariotas mediante técnicas convencionales de transformación o transfección. Tal como se utiliza en esta memoria, los términos "transformación" y "transfección" se entiende que se refieren a una variedad de métodos reconocidos en la técnica para introducir ácido nucleico extraño en una célula hospedadora, incluyendo la coprecipitación con fosfato de calcio o cloruro de calcio, la transfección mediada por dextrano DEAE, la lipofección o la electroporación. Los métodos adecuados para transformar o transfectar células hospedadoras se pueden encontrar en Sambrook, et al. (*supra*), y otros manuales de laboratorio.

Terapias de combinación para el tratamiento de enfermedades micobacterianas y ántrax utilizando las composiciones, el ácido nucleico que codifica una proteína de fusión y métodos.

En cada uno de los aspectos y realizaciones mencionadas anteriormente, las terapias de combinación distintas de las enumeradas anteriormente, también están específicamente contempladas en el presente documento. En particular, las composiciones de la presente invención se pueden administrar con uno o varios antibióticos macrólidos o no macrólidos, agentes antibacterianos, antifúngicos, agentes antivirales y agentes antiparasitarios, fármacos o agentes antiinflamatorios o inmunomoduladores.

Ejemplos de antibióticos macrólidos que se pueden utilizar en combinación con la composición de la presente invención incluyen, entre otros, los siguientes compuestos antibióticos microlídicos sintéticos, semisintéticos o de origen natural: metimicina, neometimicina, YC-17, litorina, eritromicina A a F, oleandomicina, roxitromicina, diritromicina, fluritromicina, claritromicina, davercina, azitromicina, josamicina, kitasamicina, espiramicina, midecamicina, rokitamicina, miokamicina, lankacidina y los derivados de estos compuestos. Por lo tanto, la eritromicina y los compuestos derivados de eritromicina pertenecen a la clase general de antibióticos conocidos como "macrólidos". Ejemplos de eritromicina y de compuestos de tipo eritromicina preferidos incluyen: eritromicina, claritromicina, azitromicina y troleandomicina.

Antibióticos adicionales, distintos de los antibióticos macrólidos descritos anteriormente, que son adecuados para uso en los métodos descritos en este documento incluyen, por ejemplo, cualquier molécula que tiende a prevenir, inhibir o destruir seres vivos y, como tal y tal como se usa en esta memoria, incluyen agentes antibacterianos, antifúngicos, agentes antivirales y agentes antiparasitarios. Estos agentes se pueden aislar a partir de un organismo que produce el agente o adquirir a partir de una fuente comercial (por ejemplo, una compañía farmacéutica, como Eli Lilly, Indianapolis, Ind.; Sigma, St. Louis, Mo.).

Por ejemplo, el antibiótico anti-TB isoniácida (hidrazida de ácido isonicotínico) es eficaz frecuentemente, pero la isoniazida causa frecuentemente hepatitis grave, a veces mortal. El riesgo de hepatitis se incrementa con la edad del paciente. Además, la isoniazida causa neuropatía periférica en algunos receptores de una manera relacionada con la dosis. La rifampicina, otro antibiótico usado para tratar la TB, se debe utilizar junto con otro fármaco tal como la isoniazida. Este requisito de una terapia de combinación con rifampicina se aplica al tratamiento inicial, así como a la repetición del tratamiento de la TB pulmonar.

Por lo general, la isoniácida, rifampicina, etambutol y etionamida se administran por vía oral. La estreptomina se suele administrar por vía intramuscular. La amikacina se administra por vía intramuscular o intravenosa. La

clofazimina, que también se utiliza para el tratamiento de la lepra, se administra por vía oral.

La amikacina es un antibiótico aminoglucósido semisintético obtenido a partir de la kanamicina A. Para su preparación, véase el documento de Patente de EE.UU. n° 3.781.268. Para una revisión, véase Kerridge, *Pharmacological and Biochemical Properties of Drug Substances* 1:125-153, M. E. Goldberg, compilador (1977). La amikacina se administra generalmente por vía intramuscular o intravenosa. Para obtener una información adicional, incluyendo farmacología clínica, indicaciones, efectos secundarios y dosis, consulte Physicians Desk, 42 ed. (1988) en las páginas 744-746 (en lo sucesivo, PDR).

La clofazimina es un agente antibacteriano también conocido como LAMPRENE.RTM. Para su preparación, véase Barry, et al., *Nature* 179:1013 (1957). Para una revisión, véase Karat, et al., *Brit. Med. J.* 3:175 (1971). La clofazimina se administra en general por vía oral. Para obtener una información adicional, incluyendo farmacología clínica, precauciones y dosificaciones, véase el PDR en la página 982.

La etionamida es un agente antibacteriano también conocido como AMIDAZINE.RTM. y TRECATOR.RTM. Véase el documento de patente británica n° 800.250. Este fármaco se suele administrar por vía oral. Para más información, incluyendo las precauciones y las dosificaciones, véase el PDR en la página 2310.

La ciprofloxacina es un agente antibacteriano sintético de amplio espectro para uso oral. También se conoce como CIPRO.RTM. Se suele administrar en dosificaciones diarias totales de 500 a 1.000 miligramos que por lo general se administran en 2 dosis iguales en 24 horas. Para más información, véase el PDR (1989) en las páginas 1441-1443. Otro miembro de esta clase de antibióticos fluoroquinolonas incluye ofloxacina, levofloxacina, troveofloxacina, pefloxacina, gatifloxacina y moxifloxacina.

Otros ejemplos de agentes antibióticos antibacterianos incluyen, pero no se limitan a, penicilinas, cefalosporinas, carbacefems, cefamicinas, carbapenems, monobactamas, aminoglucósidos, glucopéptidos, quinolonas, tetraciclinas, macrólidos, oxazalidionas y fluoroquinolonas. Ejemplos de agentes antibióticos incluyen, pero no se limitan a, Penicilina G (Registro CAS n°: 61-33-6); Meticilina (Registro CAS n°: 61-32-5); Nafcilina (Registro CAS n°: 147-52-4); Oxacilina (Registro CAS n°: 66-79-5); Cloxacilina (Registro CAS n°: 61-72-3); Dicloxacilina (Registro CAS n°: 3116-76-5); Ampicilina (Registro CAS n°: 69-53-4); Amoxicilina (Registro CAS n°: 26787-78-0); Ticarcilina (Registro CAS n°: 34787-01-4); Carbenicilina (Registro CAS n°: 4697-36-3); Mezlocilina (Registro CAS n°: 51481-65-3); Azlocilina (Registro CAS n°: 37091-66-0); Piperacilina (Registro CAS n°: 61477-96-1); Imipenem (Registro CAS n°: 74431-23-5); Aztreonam (Registro CAS n°: 78110-38-0); Cefalotina (Registro CAS n°: 153-61-7); Cefazolina (Registro CAS n°: 25953-19-9); Cefaclor (Registro CAS n°: 70356-03-5); Formiato sódico de cefamandol (Registro CAS n°: 42540-40-9); Cefoxitina (Registro CAS n°: 35607-66-0); Cefuroxima (Registro CAS n°: 55268-75-2); Cefonicida (Registro CAS n°: 61270-58-4); Cefmetazol (Registro CAS n°: 56796-20-4); Cefotetán (Registro CAS n°: 69712-56-7); Cefprozil (Registro CAS n°: 92665-29-7); Loracarbef (Registro CAS n°: 121961-22-6); Cefetamet (Registro CAS n°: 65052-63-3); Cefoperazona (Registro CAS n°: 62893-19-0); Cefotaxima (Registro CAS n°: 63527-52-6); Ceftriaxona (Registro CAS n°: 68401-81-0); Ceftriaxona (Registro CAS n°: 73384-59-5); Ceftazidima (Registro CAS n°: 72558-82-8); Cefepima (Registro CAS n°: 88040-23-7); Cefixima (Registro CAS n°: 79350-37-1); Cefpodoxima (Registro CAS n°: 80210-62-4); Cefsulodina (Registro CAS n°: 62587-73-9); Fleroxacina (Registro CAS n°: 79660-72-3); Ácido nalidíxico (Registro CAS n°: 389-08-2); Norfloxacina (Registro CAS n°: 70458-96-7); Ciprofloxacina (Registro CAS n°: 85721-33-1); Ofloxacina (Registro CAS n°: 82419-36-1); Enoxacina (Registro CAS n°: 74011-58-8); Lomefloxacina (Registro CAS n°: 98079-51-7); Cinoxacina (Registro CAS n°: 28657-80-9); Doxiciclina (Registro CAS n°: 564-25-0); Minociclina (Registro CAS n°: 10118-90-8); Tetraciclina (Registro CAS n°: 60-54-8); Amikacina (Registro CAS n°: 37517-28-5); Gentamicina (Registro CAS n°: 1403-66-3); Kanamicina (Registro CAS n°: 8063-07-8); Netilmicina (Registro CAS n°: 56391-56-1); Tobramicina (Registro CAS n°: 32986-56-4); Estreptomina (Registro CAS n°: 57-92-1); Azitromicina (Registro CAS n°: 83905-01-5); Claritromicina (Registro CAS n°: 81103-11-9); Eritromicina (Registro CAS n°: 114-07-8); Estolato de eritromicina (Registro CAS n°: 3521-62-8); Succinato etílico de eritromicina (Registro CAS n°: 41342-53-4); Glucoheptonato de eritromicina (Registro CAS n°: 23067-13-2); Lactobionato de eritromicina (Registro CAS n°: 3847-29-8); Estearato de eritromicina (Registro CAS n°: 643-22-1); Vancomicina (Registro CAS n°: 1404-90-6); Teicoplanina (Registro CAS n°: 61036-64-4); Cloranfenicol (Registro CAS n°: 56-75-7); Clindamicina (Registro CAS n°: 18323-44-9); Trimetoprim (Registro CAS n°: 738-70-5); Sulfametoxazol (Registro CAS n°: 723-46-6); Nitrofurantoina (Registro CAS n°: 67-20-9); Rifampicina (Registro CAS n°: 13292-46-1); Mupirocina (Registro CAS n°: 12650-69-0); Metronidazol (Registro CAS n°: 443-48-1); Cefalexina (Registro CAS n°: 15686-71-2); Roxitromicina (Registro CAS n°: 80214-83-1); Coamoxiclavuanato; combinaciones de Piperacilina y Tazobactam; y sus sales, ácidos, bases diversas y otros derivados.

Los agentes antifúngicos incluyen, pero no se limitan a, caspofungina, clorhidrato de terbinafina, nistatina, anfotericina B, griseofulvina, ketoconazol, nitrato de miconazol, flucitosina, fluconazol, itraconazol, clotrimazol, ácido benzoico, ácido salicílico y sulfuro de selenio.

Los agentes anti-virales incluyen, pero no se limitan a, valganciclovir, clorhidrato de amantadina, rimantadina, aciclovir, famciclovir, foscarnet, ganciclovir sódico, idoxuridina, ribavirina, sorivudina, trifluridina, valaciclovir, vidarabina, didanosina, estavudina, zalcitabina, zidovudina, interferón alfa y edoxudina.

Los agentes antiparasitarios incluyen, pero no se limitan a, piretrinas/butóxido de piperonilo, permetrina, iodoquinol,

metronidazol, citrato de dietilcarbamazina, piperazina, pamoato de pirantel, mebendazol, tiabendazol, praziquantel, albendazol, proguanil, inyección de gluconato de quinidina, sulfato de quinina, fosfato de cloroquina, clorhidrato de mefloquina, fosfato de primaquina, atovacuona, cotrimoxazol (sulfametoxazol/trimetoprim) e isetionato de pentamidina.

- 5 En otro aspecto, en el método descrito en el presente documento, se puede, por ejemplo, complementar la composición mediante la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o varios fármacos o agentes antiinflamatorios o inmunomoduladores. Por "fármacos o agentes inmunomoduladores", se entiende, por ejemplo, agentes que actúan sobre el sistema inmune, directa o indirectamente, por ejemplo, mediante una estimulación o supresión de una actividad celular de una célula en el sistema inmune, por ejemplo, linfocitos T, linfocitos B, macrófagos o células presentadoras de antígenos (APC) o que actúan sobre componentes externos del sistema inmune que, a su vez, estimulan, suprimen o modulan el sistema inmune, por ejemplo, hormonas, agonistas o antagonistas de receptores y neurotransmisores; los inmunomoduladores pueden ser, por ejemplo, inmunosupresores o inmunoestimulantes. Por "fármacos antiinflamatorios", se entiende, por ejemplo, agentes que tratan respuestas inflamatorias, es decir, una reacción tisular frente a una lesión, por ejemplo, agentes que tratan el sistema inmune, vascular o linfático.

Los fármacos o agentes antiinflamatorios o inmunomoduladores adecuados para uso en esta invención incluyen, pero no se limitan a, derivados de interferón, por ejemplo, betaserón, interferón beta; derivados de prostano, por ejemplo, compuestos descritos en el documento PCT/DE93/0013, por ejemplo, iloprost, cicaprost; glucocorticoides, por ejemplo, cortisol, prednisolona, metilprednisolona, dexametasona; inmunosupresores, por ejemplo, ciclosporina A, FK-506, metoxsaleno, talidomida, sulfasalazina, azatioprina, metotrexato; inhibidores de lipoxigenasa, por ejemplo, zileutón, MK-886, WY-50295, SC-45662, SC-41661A, BI-L-357; antagonistas de leucotrienos, por ejemplo, compuestos descritos en los documentos DE 40091171 de solicitud de patente alemana P 42 42 390.2; WO 9201675; SC-41930; SC-50605; SC-51146; LY 255283 ((D. K. Herron et al., FASEB J. 2: Abstr. 4729,1988); LY 223982 (D. M. Gapinski et al. J. Med. Chem. 33: 2798-2813, 1990); U-75302 y análogos, por ejemplo, descritos por J. Morris et al., Tetrahedron Lett. 29: 143-146, 1988, C. E. Burgos et al., Tetrahedron Lett. 30: 5081-5084, 1989; B. M. Taylor et al., Prostaglandins 42: 211-224, 1991; compuestos descritos en el documento de Patente de EE.UU. n° 5.019.573; ONO-LB-457 y análogos, por ejemplo, descritos por K. Kishikawa et al., Adv. Prostagl. Thrombox. Leukotriene Res. 21:407-410, 1990; M. Konno et al., Adv. Prostagl. Thrombox. Leukotriene Res. 21: 411-414, 1990; WF-11605 y análogos, por ejemplo, descritos en el documento de Patente de EE.UU. n° 4.963.583; compuestos descritos en los documentos WO 9118601, WO 9118879; WO 9118880, WO 9118883, sustancias antiinflamatorias, por ejemplo, NPC 16570, NPC 17923 descritas por L. Noronha-Blab. et al., Gastroenterology 102 (Supl.): A 672,1992; NPC 15669 y análogos descritos por R. M. Burch et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA 88: 355-359, 1991; S. Pou et al., Biochem. Pharmacol. 45: 2123-2127, 1993; derivados de péptidos, por ejemplo, ACTH y análogos; receptores solubles de TNF; anticuerpos de TNF; receptores solubles de interleucinas, otras citocinas, proteínas de linfocitos T; anticuerpos contra receptores de interleucinas, otras citocinas y proteínas de linfocitos T.

Los agentes terapéuticos se pueden usar para el tratamiento de sujetos animales o pacientes y, más preferiblemente, mamíferos, incluyendo seres humanos, así como mamíferos tales como primates no humanos, perros, gatos, caballos, vacas, cerdos, cobayas y roedores.

Modos de administración

- 40 Los modos de administración de los diferentes agentes terapéuticos empleados en la invención se ejemplifican a continuación. Sin embargo, los agentes se pueden administrar a través de cualquiera entre una variedad de vías que incluyen: mediante inyección (por ejemplo, subcutánea, intramuscular, intravenosa, intraarterial, intraperitoneal), mediante infusión intravenosa continua, de forma cutánea, dental, transdérmica, oral (por ejemplo, comprimido, píldora, medicamento líquido), por medio de bombas osmóticas implantadas (por ejemplo, Alza Corp.), mediante un supositorio o una pulverización de aerosol.

Los inhibidores de la proteasa de serina basados en péptidos se pueden preparar por cualquier método de síntesis adecuado, tal como se ha descrito originalmente en Merrifield, J. Am. Chem. Soc., 85, p 2149 (1963). Los péptidos sintéticos que presentan una actividad inhibidora frente a las proteasas de serina y los métodos para preparar y usar los mismos, se describen, por ejemplo, en los documentos de patente de EE.UU. n° 4.829.052, 5.157.019 de Glover; patente de EE.UU. n° 5.420.110 de Miller; patente de EE.UU. n° 4.963.654 de Katunuma.

Los expertos en la técnica de síntesis bioquímica reconocerán que para cantidades de péptidos a escala comercial, tales péptidos se preparan preferiblemente usando técnicas de ADN recombinante, técnicas sintéticas o derivatización química de péptidos sintetizados biológica o químicamente.

- 55 Los compuestos descritos en el presente documento se utilizan como agentes terapéuticos en el tratamiento de un estado fisiológico (especialmente patológico) causado, en su totalidad o en parte, por una actividad excesiva de la proteasa de serina. Los péptidos se pueden administrar como péptidos libres o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos. Los términos utilizados en el presente documento se ajustan a los encontrados en Budavari, Susan (compilador), "The Merck Index" An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals; Merck & Co., Inc. La expresión "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a aquellas sales de adición de ácido o complejos metálicos

de los péptidos que no afectan de manera significativa o adversamente a las propiedades terapéuticas (por ejemplo, eficacia, toxicidad, etc.) de los péptidos. Los péptidos se deben administrar a los individuos como una composición farmacéutica que, en la mayoría de los casos, incluirá el péptido y/o sales farmacéuticas del mismo con un vehículo farmacéuticamente aceptable. La expresión "vehículo farmacéuticamente aceptable" se refiere a aquellos vehículos sólidos y líquidos que no afectan de manera significativa o adversa a las propiedades terapéuticas de los péptidos.

Las composiciones farmacéuticas que contienen péptidos se pueden administrar a individuos, particularmente a seres humanos, ya sea por vía intravenosa, subcutánea, intramuscular, intranasal, oral, tópica, transdérmica, parenteral, gastrointestinal, transbronquial y transalveolar. La administración tópica se lleva a cabo a través de una crema, gel, enjuague, etc., aplicado tópicamente, que contiene cantidades terapéuticamente eficaces de inhibidores de proteasas de serina. La administración transdérmica se lleva a cabo mediante la aplicación de una crema, enjuague, gel, etc., capaz de permitir que los inhibidores de proteasas de serina penetren a través de la piel y entren en el torrente sanguíneo. Las vías parenterales de administración incluyen, pero no se limitan a, inyección directa tal como intravenosa, intramuscular, intraperitoneal o subcutánea. Las rutas gastrointestinales de administración incluyen, pero no se limitan a, ingestión y rectal. Las vías de administración transbronquial y transalveolar incluyen, pero no se limitan a, inhalación, ya sea a través de la boca o por vía intranasal y la inyección directa en una vía aérea, tal como mediante traqueotomía, traqueostomía, tubo endotraqueal o dosis medida o inhalador continuo. Además, se pueden emplear bombas osmóticas para la administración. La dosificación necesaria variará con la afección particular que se va a tratar, el método de administración y la tasa de aclaramiento de la molécula desde el cuerpo.

Aunque los compuestos descritos en este documento y/o sus derivados se pueden administrar como productos químicos puros, es preferible presentar el ingrediente activo como una composición farmacéutica. De este modo, la invención describe adicionalmente el uso de una composición farmacéutica que comprende uno o varios compuestos y/o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, junto con, por lo tanto, uno o varios vehículos farmacéuticamente aceptables y, opcionalmente, otros ingredientes terapéuticos y/o profilácticos. El o los vehículos deben ser aceptables en el sentido de ser compatibles con los otros ingredientes de la composición y no ser perjudiciales para el receptor de los mismos.

Las composiciones farmacéuticas incluyen las adecuadas para una administración oral o parenteral (incluyendo intramuscular, subcutánea, cutánea, por inhalación e intravenosa). Las composiciones se pueden presentar convenientemente, en su caso, en formas de dosificación unitarias discretas y se pueden preparar por cualquiera de los métodos bien conocidos en la técnica de farmacia. Tales métodos incluyen la etapa de asociar el compuesto activo con vehículos líquidos, matrices sólidas, vehículos semisólidos, vehículos sólidos finamente divididos o combinaciones de los mismos, y luego, si es necesario, conformando el producto en el sistema de administración deseado.

Las composiciones farmacéuticas adecuadas para una administración oral se pueden presentar como formas de dosificación unitarias discretas, tales como cápsulas de gelatina duras o blandas, sellos o comprimidos, conteniendo cada uno una cantidad predeterminada del ingrediente activo; en forma de polvo o como gránulos; como una solución, una suspensión o como una emulsión. El ingrediente activo también se puede presentar como un bolo, electuario o pasta. Los comprimidos y las cápsulas para administración oral pueden contener excipientes convencionales, tales como agentes aglutinantes, cargas, lubricantes, desintegrantes o agentes humectantes. Los comprimidos se pueden revestir de acuerdo con métodos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, con revestimientos entéricos.

Las preparaciones líquidas orales pueden estar en forma, por ejemplo, de una suspensión acuosa u oleosa, soluciones, emulsiones, jarabes o elixires, o se pueden presentar como un producto seco para constituir con agua u otro vehículo adecuado antes del uso. Tales preparaciones líquidas pueden contener aditivos convencionales tales como agentes de suspensión, agentes emulsionantes, vehículos no acuosos (que pueden incluir aceites comestibles) o conservantes. Los compuestos también se pueden formular para una administración parenteral (por ejemplo, mediante inyección, por ejemplo, inyección de bolo o infusión continua) y se pueden presentar en forma de dosis unitaria en ampollas, jeringas precargadas, recipientes de infusión de bolo pequeño o en recipientes de dosis múltiples con un conservante añadido. Las composiciones pueden estar en formas tales como suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos oleosos o acuosos, y pueden contener agentes de formulación tales como de suspensión, estabilizantes y/o dispersantes. Alternativamente, el ingrediente activo puede estar en forma de polvo, obtenido mediante aislamiento aséptico de un sólido estéril o mediante liofilización de la solución, para constituir con un vehículo adecuado, por ejemplo, agua estéril, exenta de pirógenos, antes del uso.

Para la administración tópica en la epidermis, los compuestos se pueden formular como pomadas, cremas o lociones, o como el ingrediente activo de un parche transdérmico. Los sistemas de administración transdérmica adecuados se describen, por ejemplo, en Fisher et al. (documento de Pat. de EE.UU. n° 4.788.603) o Bawas et al. (documentos de Patente de EE.UU. n° 4.931.279, 4.668.504 y 4.713.224). Los ungüentos y las cremas se pueden formular, por ejemplo, con una base acuosa u oleosa con la adición de agentes espesantes y/o gelificantes adecuados. Las lociones se pueden formular con una base acuosa u oleosa y en general también contendrán uno o varios agentes emulsionantes, agentes estabilizantes, agentes dispersantes, agentes de suspensión, agentes espesantes o agentes colorantes. El ingrediente activo también se puede administrar a través de iontoforesis, por

ejemplo, como se describe en los documentos de Patente de EE.UU. n° 4.140.122, 4.383.529 o 4.051.842. Son posibles al menos dos tipos de liberación en estos sistemas. La liberación mediante difusión tiene lugar cuando la matriz no es porosa. El compuesto farmacéuticamente eficaz se disuelve y difunde a través de la propia matriz. La liberación mediante flujo microporoso tiene lugar cuando el compuesto farmacéuticamente eficaz es transportado a través de una fase líquida en los poros de la matriz.

Las composiciones adecuadas para una administración tópica en la boca incluyen formas de dosificación unitarias tales como pastillas para chupar que comprenden el ingrediente activo en una base aromatizada, normalmente sacarosa y goma arábiga o tragacanto; pastillas que comprenden el ingrediente activo en una base inerte tal como gelatina y glicerina o sacarosa y acacia; geles mucoadherentes y enjuagues bucales que comprenden el ingrediente activo en un vehículo líquido adecuado.

Cuando se desea, las composiciones descritas anteriormente se pueden adaptar para proporcionar una liberación sostenida del ingrediente activo empleado, por ejemplo, mediante una combinación de las mismas con ciertas matrices de polímero hidrófilo, por ejemplo, que comprenden geles naturales, geles poliméricos sintéticos o mezclas de los mismos.

Las composiciones farmacéuticas también pueden contener otros adyuvantes tales como agentes aromatizantes, colorantes, antimicrobianos o conservantes.

Se apreciará además que la cantidad del compuesto, o de una sal activa o un derivado del mismo, requerida para uso en el tratamiento, variará no solo con la sal particular seleccionada, sino también con la vía de administración, la naturaleza de la afección que se está tratando y la edad y el estado del paciente, y se seleccionará, en última instancia, a discreción del médico encargado.

Una composición farmacéutica contiene un vehículo aceptable, farmacéuticamente adecuado como se ha definido anteriormente. Estas composiciones pueden estar en forma de soluciones, suspensiones, comprimidos, píldoras, cápsulas, polvos, formulaciones de liberación sostenida y similares. Los vehículos farmacéuticos adecuados se describen en Remington's Pharmaceutical Sciences 1990, págs. 1519-1675, Gennaro, A. R., compilador, Mack Publishing Company, Easton, Pa. Las moléculas inhibidoras de la proteasa de serina de la invención se pueden administrar en liposomas o polímeros (véase, Langer, R. Nature 1998, 392, 5). Tales composiciones contendrán una cantidad terapéutica eficaz del compuesto activo junto con una cantidad adecuada de vehículo, con el fin de proporcionar la forma para una administración apropiada al sujeto.

En general, el compuesto se administra convenientemente en una forma de dosificación unitaria; por ejemplo, que contiene de 5 a 2000 mg, convenientemente de 10 a 1000 mg, más convenientemente de 50 a 500 mg de ingrediente activo por forma de dosificación unitaria.

Los niveles en sangre deseables se pueden mantener mediante una infusión continua para proporcionar aproximadamente 0,01-5,0 mg/kg/h o mediante infusiones intermitentes que contienen aproximadamente 0,4-20 mg/kg del o de los ingredientes activos. Tampones, conservantes, antioxidantes y similares se pueden incorporar según se requiera.

La dosis deseada se puede presentar convenientemente en una dosis única o como dosis divididas, administradas a intervalos apropiados, por ejemplo, tal como dos, tres, cuatro o más subdosis al día. La subdosis en sí misma se puede dividir adicionalmente, por ejemplo, en una cantidad de administraciones discretas, espaciadas libremente, tales como inhalaciones múltiples desde un insufador o mediante aplicación de una pluralidad de gotas en el ojo.

Los niveles de dosificación reales de ingredientes activos en las composiciones farmacéuticas pueden variar de modo que se obtiene una cantidad del o de los compuestos activos que es eficaz para lograr la respuesta terapéutica deseada para un paciente, composiciones y modo de administración particulares. El nivel de dosificación seleccionado dependerá de la actividad del compuesto farmacéutico particular o del análogo del mismo, la vía de administración, la gravedad de la afección a tratar y el estado y la historia médica previa del paciente que está siendo tratado. Sin embargo, está dentro de la experiencia de la técnica comenzar con dosis del compuesto farmacéutico a niveles inferiores a los requeridos para lograr el efecto terapéutico deseado y aumentar gradualmente la dosificación hasta que se consiga el efecto deseado.

Las composiciones farmacéuticas se pueden usar tanto en medicina veterinaria como en terapia humana. La magnitud de una dosis profiláctica o terapéutica de la composición farmacéutica en el tratamiento agudo o crónico del dolor asociado con las enfermedades o indicaciones mencionadas anteriormente, variará con la gravedad de la afección a tratar y la vía de administración. La dosis y quizás la frecuencia de la dosis, también variarán según la edad, el peso corporal y la respuesta del paciente individual. En general, el intervalo de dosis diaria total de la composición farmacéutica está generalmente entre aproximadamente 1 a aproximadamente 100 mg, preferiblemente desde aproximadamente 1 a aproximadamente 20 mg, y más preferiblemente desde aproximadamente 1 a aproximadamente 10 mg de compuesto activo por kilogramo de peso corporal por día, administrados a un paciente mamífero. Si se desea, la dosis diaria eficaz se puede dividir en múltiples dosis para fines de administración, por ejemplo, de dos a cuatro dosis separadas al día.

Alternativamente, el intervalo de dosis diaria total del ingrediente activo de esta invención se mantiene para que sea suficiente para aumentar la concentración sérica del inhibidor de proteasas en 10-100 micromolar.

5 En este documento se entiende que, al mencionar tales rangos especificados, los rangos citados también incluyen todas aquellas cantidades del intervalo de la dosis entre el intervalo citado. Por ejemplo, en el intervalo de aproximadamente 1 a 100, se entiende que incluye 2 a 99, 3-98, etc., sin mencionar realmente cada intervalo específico. Las cantidades reales preferidas del ingrediente activo variarán con cada caso, de acuerdo con la especie de mamífero, la naturaleza y la gravedad de la afección particular que se va a tratar, y el método de administración.

10 También se entiende que las dosis dentro de esos intervalos, pero que no se mencionan explícitamente, tales como 30 mg, 50 mg, 75 mg, etc., están incluidas en los intervalos establecidos, ya que son cantidades ligeramente fuera de los límites indicados del intervalo.

Las cantidades reales preferidas del ingrediente activo variarán con cada caso, de acuerdo con la especie de mamífero, la naturaleza y la gravedad de la afección particular que se va a tratar, y el método de administración.

15 En general, las composiciones farmacéuticas se administran periódicamente a un paciente individual según sea necesario para mejorar los síntomas de la enfermedad particular que se está tratando. La duración del tiempo durante el cual se administran las composiciones y la dosificación total, variarán necesariamente con cada caso, de acuerdo con la naturaleza y la gravedad de la afección particular que se va a tratar y el estado físico del sujeto o del paciente que recibe tal tratamiento.

20 Se recomienda además que los niños, los pacientes mayores de 65 años y aquellos con una función renal o hepática deteriorada, reciban inicialmente dosis bajas, y que luego se valoren basándose en la o las respuestas individuales o niveles en sangre. En algunos casos, puede ser necesario emplear dosificaciones fuera de estos intervalos, como será evidente para los expertos ordinarios en la técnica. Además, se observa que el especialista o el médico del tratamiento sabrá, solo con una experimentación rutinaria, cómo y cuándo interrumpir, ajustar o terminar la terapia conjuntamente con la respuesta individual del paciente.

25 Las dosificaciones útiles de los compuestos de la presente invención se pueden determinar mediante la comparación de su actividad *in vitro* y su actividad *in vivo* en modelos animales. Los métodos para la extrapolación de las dosificaciones eficaces en ratones y otros animales, en los seres humanos son conocidos en la técnica; por ejemplo, véase el documento de Patente de EE.UU. n° 4.938.949.

Ejemplos

30 Los siguientes ejemplos específicos se proporcionan para auxiliar mejor al lector en relación con varios aspectos de la práctica de la presente invención. Ya que estos ejemplos específicos son meramente ilustrativos, no se debe interpretar en modo alguno que nada de las siguientes descripciones sea limitante de la invención. Tales limitaciones se definen, por supuesto, únicamente por las reivindicaciones acompañantes.

Ejemplo Uno

35 Efecto de α 1-antitripsina sobre una infección con Complejo *Mycobacterium Avium* (MAC) de macrófagos derivados de monocitos humanos

40 1. Los organismos con TB o MAC se suspendieron a una concentración de un estándar de McFarland. Un McFarland se define como un grado de turbidez de organismos suspendidos en un líquido que coincide con el de una parte alícuota estándar. La turbidez de una muestra que es equivalente a la del estándar de McFarland representa aproximadamente 10^7 bacilos/ml. La duración óptima de un cultivo de prueba es de aproximadamente 10-12 días de bacilos cultivados en medio Middlebrook 7H9 (= medio micobacteriano).

45 2. Infección de las células. Las células infectadas eran macrófagos humanos derivados de monocitos (MDM). Los MDM se aislaron a partir de células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC) que se obtuvieron a partir de sangre heparinizada de voluntarios sanos, mediante centrifugación de la sangre heparinizada sobre una almohadilla de Ficol-Hypaque. Las PBMC aisladas se dividieron en partes alícuotas en placas de cultivo tisular de poliestireno y se permitió que los monocitos se adhirieran X 2 horas ($0,5 \times 10^6$ PBMC se añadieron a cada pocillo, de las cuales aproximadamente 10 a 20% eran monocitos). Los experimentos se realizaron en placas con o sin cubreobjetos de vidrio estériles, redondos en el fondo de los pocillos (véase a continuación). Solo la población de monocitos dentro de las PBMC se adhiere a las placas en estas condiciones. A continuación, se lavaron los pocillos (para eliminar los linfocitos no adherentes) y se incubaron en medio de nuevo aporte X 10-12 días (medio = RPMI + 10% de suero de ternera fetal + 100 unidades/ml de penicilina G), lo que permite la maduración de los monocitos en macrófagos. El volumen de medio en cada pocillo era de 1,0 ml. Después el medio se retiró de cada pocillo de MDM, y los pocillos se rellenaron con medio solo (control), con AAT o con ala-ala-pro-val-clorometil cetona (un inhibidor sintético de la proteasa de serina similar a AAT) (Bachem, Inc.), y los pocillos se incubaron durante 3,0 h. A continuación, los MDM en cada pocillo se infectaron con MAC (cepa de *Mycobacterium avium* 9141) o TB (cepa H37RV) en una

proporción de bacilos micobacterianos/célula de 1×10^6 . Después de 1 h de incubación (para permitir que las micobacterias se unan a las superficies de MDM), se retiró el material sobrenadante y se guardó para ensayos de citocinas. Los pocillos se lavaron después dos veces (con una solución 1:1 de RPMI y solución salina),

5 A continuación, se realizaron dos ensayos independientes para cuantificar la infección micobacteriana de los macrófagos derivados de monocitos humanos:

a. Observación directa y recuento del número de células infectadas en cada pocillo

10 Para estos experimentos, los MDM infectados con micobacterias se cultivaron en pocillos de una placa de cultivo tisular de poliestireno que tenía cubreobjetos de vidrio redondos estériles, insertados en el fondo de los pocillos. Ya que los MDM se habían sembrado inicialmente sobre estos cubreobjetos, los MDM se adherían a las superficies de los cubreobjetos. Después de la incubación con MAC o TB, los pocillos se lavaron dos veces (como se ha indicado anteriormente) y después se fijaron X 1 h utilizando glutaraldehído. Las micobacterias se tiñeron después, utilizando una tinción de micobacterias (Zeihl-Nielsson) sin dañar las células. El número de células infectadas se cuantificó ópticamente y los datos se expresaron como un porcentaje del número total de MDM en cada pocillo.

b. Recuento de colonias

15 Después de lavar dos veces las células infectadas (véase arriba), las células en pocillos paralelos que no contenían cubreobjetos se lisaron usando 1,0 ml de tampón de lisis por pocillo durante 5,0 min (0,25% de tampón de lisis sDKF).

20 Después de lisar los MDM infectados (véase más arriba), el fluido del lisado se diluyó 1:1 con 1,0 ml de medio 7H9. La suspensión de micobacterias se diluyó en serie 1:10 en 1% (vol/vol) de medio 7H9 y agua estéril. Las suspensiones micobacterianas diluidas se agitaron en vórtice y después 0,5 ml de la suspensión de cada parte alícuota se sembró en placas sobre medio de micobacterias (medio 7H9 sólido). Este líquido que contenía micobacterias se cultivó a continuación. Las placas se incubaron durante 10-12 días para MAC y durante 21-24 días para la tuberculosis, y se hizo un recuento del número de colonias de micobacterias.

Resultados:

25 Tuberculosis

Datos de la observación directa

	Control de MDM (sin AAT) ^a	MDM expuestos a AAT (5,0 mg/ml)
Experimento 1	20%	4%
Experimento 2	17%	6%

^a porcentaje de células infectadas con m. tuberculosis.

Datos del recuento de colonias

30 En un experimento distinto, se cultivó TB asociada a células para confirmar de forma independiente el efecto inhibitor de AAT. Los recuentos de TB por ml eran $1,6 \times 10^5$ por ml en los cultivos de control de MDM y $0,57 \times 10^5$ por ml en los cultivos expuestos a AAT, un efecto inhibitor del 64% debido a la presencia de AAT.

Complejo Mycobacterium Avium

35 Se utilizaron los organismos micobacterianos relacionadas, conocido como Complejo Mycobacterium Avium (MAC). MAC es importante porque es la causa principal de enfermedades infecciosas en pacientes con SIDA. También es un problema complicado en las personas normales que contraen esta infección; es muy difícil de tratar y a veces es imposible de tratar con fármacos antimicrobianos actuales. El uso de AAT o de una molécula de similar a AAT puede representar un nuevo medio para una terapia de estas infecciones.

Datos de la observación directa

	MDM de control (sin AAT) ^a	MDM expuestos a AAT (5,0 mg/ml)
Experimento 1	17%	10%

^a porcentaje de células infectadas con m. tuberculosis.

40 Datos del recuento de colonias

La Figura 1 muestra los resultados de 4 experimentos distintos que muestran que AAT bloquea significativamente la

infección de MDM con MAC, con un efecto medio de aproximadamente 55% de inhibición. Estos experimentos se llevaron a cabo como se ha descrito anteriormente. El mimético de AAT se refiere a ala-ala-pro-val-clorometil cetona (un inhibidor sintético de la proteasa de serina similar a AAT) (Proveedor: Bachem). Los resultados con el mimético de AAT confirman los datos de AAT utilizando una especie independiente, y proporcionan una prueba de que el concepto de inhibir las proteasas de serina para el tratamiento de infecciones micobacterianas, se extiende a los inhibidores de molécula pequeña que hacen que los fármacos candidatos sean atractivos.

En los mismos cultivos descritos anteriormente, se midió la concentración de la citocina pro-inflamatoria TNF α . Como se muestra en la figura 2 y la figura 3, AAT y el mimético de AAT inhibían significativamente la producción de TNF α en los cultivos de MDM hasta en un 100%. El bloqueo de la producción de citocinas proinflamatorias puede representar un mecanismo adicional a través del cual los inhibidores de la proteasa de serina bloquean la infección con TB y con MAC.

Ejemplo Dos

Estudio clínico en la infección con MAC

Los datos *in vitro* descritos anteriormente usando MAC se han complementado con un estudio clínico. En esta investigación clínica, fenotipos AAT (formas alternativas de la proteína AAT) se evaluaron en pacientes con infección pulmonar documentada con MAC y que tenían enfermedad pulmonar. Estos pacientes se compararon con un grupo de control que consistía en pacientes con la enfermedad pulmonar bronquiectasia (con el fin de mostrar que la presencia de una enfermedad pulmonar por sí sola no contaba para la presencia de una infección con MAC).

N = 134 sujetos	Infección con MAC (pulmones)	Bronquiectasia (enfermedad pulmonar)	Valor de P
Sexo			
Masculino	8,97%	23,21%	
Femenino	91,3%	76,79%	
Edad (media)	64,5 años	64,0 años	
Fenotipo AAT (% de anormal)			0,006
SÍ	27,7%	5,3%	
NO	72,3%	94,7%	

Obsérvese en esta tabla que en el grupo de control (bronquiectasia), la proporción de pacientes con moléculas anormales de AAT es 5,3%. Esto contrasta notoriamente con el caso en el grupo infectado con MAC, en donde la proporción es de 27,7%, un aumento de 5,2 veces. Los pacientes infectados con MAC eran 5,2 veces más propensos que el grupo de control a albergar una forma anormal de AAT. Esto establece una relación clínica entre las moléculas de AAT anormales y la infección con MAC. Por tanto, el papel inhibitorio de AAT normal que descubrimos *in vitro*, se confirma en los pacientes.

Ejemplo Tres

Efecto de la alfa-1-antitripsina sobre la producción de interleucina-1 beta estimulada en sangre humana completa

Diseño: la venopunción se realizó en 3 voluntarios sanos utilizando una aguja de calibre 21, y la sangre venosa se aspiró en un tubo heparinizado. A continuación, la sangre se dividió en partes alícuotas en tubos de polipropileno de 6 mililitros y se diluyó 1:4 con medio de cultivo tisular RPMI estéril solo (control), se diluyó 1:4 en medio que contenía *Staphylococcus epidermidis* destruidos térmicamente en una concentración final de 1:1000 como estímulo (Staph) o en tubos que contenían *Staphylococcus epidermidis* y alfa-1-antitripsina (AAT, Aralast[®] de Baxter). Todos los cultivos se incubaron después 24 horas a 37°C/5% de CO₂). Después de la incubación, las muestras se centrifugaron X 1.500 g, y se recogió el material sobrenadante. El material sobrenadante se sometió ensayo con respecto a la concentración de interleucina-1 beta, usando un aparato electroquimioluminiscente validado que cuantifica las proteínas citocinas.

RESULTADOS: Los datos se presentan como la media \pm SEM de producción de interleucina-1 beta, y los valores se muestran en el eje vertical. Como se muestra, AAT inhibía significativamente la producción de interleucina-1 beta estimulada con Staph de forma dependiente de la dosis, y se observó inhibición con todas las concentraciones sometidas a ensayo (Véase la Figura 5).

DISCUSIÓN: Los inventores han mostrado en el presente documento por primera vez, que AAT bloquea la producción de IL-1 beta como un ejemplo de producción de citocinas proinflamatorias. La IL-1 beta es crucial para el desarrollo de los síntomas y/o las manifestaciones de la enfermedad del ántrax. Los resultados presentados en este ejemplo complementan el mecanismo ya supuesto por el cual AAT se puede emplear

como un agente terapéutico para curar el ántrax mediante el bloqueo de la producción de la toxina activa.

Ejemplo Cuatro

En las neumonías ambulatorias, se sabe que predominan los organismos gram positivos, mientras que en la unidad de cuidados intensivos (UCI), las neumonías gram negativas inciden de manera desproporcionada.

5 La patogénesis de una neumonía implica una colonización seguida de microaspiración. Las personas en la UCI son colonizadas por bacilos gram negativos. Por lo tanto, para los médicos es evidente que solo las personas enfermas en la UCI son colonizadas con bacilos gram negativos. La fibronectina procesada es un receptor importante para los bacilos gram negativos *in vivo*.

10 Un medio para tratar a los pacientes con neumonías gram negativas sería bloquear la colonización de bacilos gram negativos. Por ejemplo, en las personas sanas, la fibronectina no procesada no es un receptor para las bacterias gram negativas. Durante una enfermedad, las secreciones se vuelven ricas en proteasas de serina. Las proteasas de serina procesan (proteolizan) la fibronectina. La fibronectina procesada es un receptor para las bacterias gram negativas. Esto da lugar a la colonización. El uso de inhibidores de proteasas de serina, tales como alfa-1 antitripsina o cualquiera de los derivados funcionales de la misma como se describen en esta solicitud, puede ser
15 utilizado por una persona con experiencia ordinaria en la técnica para bloquear la colonización con bacilos gram negativos y, por lo tanto, tratar neumonías gram negativas. Por lo tanto, inhibidores de la proteasa de serina como AAT se pueden administrar tópicamente usando formulaciones tópicas que incluyen, por ejemplo, pero no limitadas a, un líquido, una crema, un aerosol, etc., para bloquear la colonización del epitelio con bacilos gram negativos. Ejemplos representativos de publicaciones que proporcionan ejemplos no limitativos de bacilos gram negativos que se pueden tratar usando las composiciones, se pueden encontrar en Charlotte L. Barey-Morel et al. The Journal of Infectious Diseases V1 155, n° 4 (1987); W.G. Johanson et al. Annals of Internal Medicine 77: 701-706 (1972); W.G. Johanson et al. The New England Journal of Medicine Vol 281 n° 21 (1969); James J. Rahal et al. JAMA Vol. 214 n°
20 4 (1970).

25 De una forma similar, los inhibidores de proteasas de serina similares a AAT se podrían administrar por vía tópica usando formulaciones tópicas que incluyen, por ejemplo, pero no limitadas a, un líquido, una crema, un aerosol, etc., para el tratamiento de infecciones bacterianas causadas por organismos gram positivos.

30 Asimismo, de una forma similar, los inhibidores de proteasas de serina similares a AAT se podrían administrar por vía tópica usando formulaciones tópicas que incluyen, por ejemplo, pero no limitadas a, un líquido, una crema, un aerosol, etc., para el tratamiento de infecciones bacterianas causadas por micobacterias. Para el mecanismo de acción propuesto para las micobacterias atípicas, consúltense los Ejemplos 1 y 2 *supra*.

35 Aunque la invención se ha descrito en relación con realizaciones específicas de la misma, se comprenderá que se pueden realizar modificaciones adicionales y esta solicitud pretende cubrir cualquier variación, uso o adaptación de la invención siguiendo, en general, los principios de la invención e incluyendo dichas desviaciones de la presente descripción dentro de la práctica conocida o habitual en la técnica a la que pertenece la invención y que se puede aplicar a las características esenciales establecidas anteriormente, y como siguen a continuación en el alcance de las reivindicaciones adjuntas.

Lista de secuencias

<110> THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF COLORADO

40 <120> Inhibidores de la actividad proteasa de serina y su uso en métodos y composiciones para el tratamiento de infecciones bacterianas

<130> U 10050 EP/D-I

<140> EP 12 003 146.3

<141> 26-08-2004

45 <150> US 60/497.703

<151> 26-08-2003

<160> 61

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 5

50 <212> PRT

<213> Artificial

<220>
 <223> péptido sintético
 <400> 1
 Phe Val Phe Leu Met
 1 5
 5 <210> 2
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 10 <223> péptido sintético
 <400> 2
 Phe Val Phe Ala Met
 1 5
 <210> 3
 <211> 5
 15 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> péptido sintético
 <400> 3
 Phe Val Ala Leu Met
 20 1 5
 <210> 4
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial
 25 <220>
 <223> péptido sintético
 <400> 4
 Phe Val Phe Leu Ala
 30 1 5
 <210> 5
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> péptido sintético
 35 <400> 5
 Phe Leu Val Phe Ile
 1 5
 <210> 6
 <211> 5
 <212> PRT
 40 <213> Artificial
 <220>
 <223> péptido sintético
 <400> 6

Phe Leu Met Ile Ile
1 . 5

<210> 7
<211> 5
<212> PRT
5 <213> Artificial

<220>
<223> péptido sintético
<400> 7

Phe Leu Phe Val Leu
1 . 5

10 <210> 8
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial

15 <220>
<223> péptido sintético
<400> 8

Phe Leu Phe Val Val
1 . 5

20 <210> 9
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> péptido sintético
<400> 9

Phe Leu Phe Leu Ile
1 . 5

25 <210> 10
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial

30 <220>
<223> péptido sintético
<400> 10

Phe Leu Phe Phe Ile
1 . 5

35 <210> 11
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> péptido sintético

40 <400> 11

Phe Leu Met Phe Ile
1 . 5

<210> 12
<211> 5

<212> PRT
 <213> Artificial

 <220>
 <223> péptido sintético
 5 <400> 12

Phe Met Leu Leu Ile
 1 5

 <210> 13
 <211> 5
 <212> PRT
 10 <213> Artificial

 <220>
 <223> péptido sintético

 <400> 13

Phe Ile Ile Met Ile
 1 5
 15 <210> 14
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial

 <220>
 20 <223> péptido sintético

 <400> 14

Phe Leu Phe Cys Ile
 1 5

 <210> 15
 <211> 5
 25 <212> PRT
 <213> Artificial

 <220>
 <223> péptido sintético

 <400> 15

Phe Leu Phe Ala Val
 30 1 5

 <210> 16
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial
 35 <220>
 <223> péptido sintético

 <400> 16

Phe Val Tyr Leu Ile
 1 5
 40 <210> 17
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial

 <220>
 <223> péptido sintético

<400> 17
Phe Ala Phe Leu Met
1 5

<210> 18
<211> 5
5 <212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> péptido sintético

<400> 18
Ala Val Phe Leu Met
10 1 5

<210> 19
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

15 <400> 19
Met Pro Ser Ser Val Ser Trp Gly Ile Leu
1 5 10

<210> 20
<211> 10
<212> PRT
20 <213> Homo sapiens

<400> 20
Leu Ala Gly Leu Cys Cys Leu Val Pro Val
1 5 10

<210> 21
<211> 10
25 <212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 21
Ser Leu Ala Glu Asp Pro Gln Gly Asp Ala
1 5 10

<210> 22
<211> 10
30 <212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 22
Ala Gln Lys Thr Asp Thr Ser His His Asp
1 5 10

35 <210> 23
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 23
Gln Asp His Pro Thr Phe Asn Lys Ile Thr
40 1 5 10

<210> 24
<211> 10

<212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 24

Pro Asn Leu Ala Glu Phe Ala Phe Ser Leu
 1 5 10

5 <210> 25
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 25

Tyr Arg Gln Leu Ala His Gln Ser Asn Ser
 1 5 10

<210> 26
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

15 <400> 26

Thr Asn Ile Phe Phe Ser Pro Val Ser Ile
 1 5 10

<210> 27
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

20 <400> 27

Ala Thr Ala Phe Ala Met Leu Ser Leu Gly
 1 5 10

<210> 28
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

25 <400> 28

Thr Lys Ala Asp Thr His Asp Glu Ile Leu
 1 5 10

<210> 29
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

30 <400> 29

Glu Gly Leu Asn Phe Asn Leu Thr Glu Ile
 1 5 10

<210> 30
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

35 <400> 30

Pro Glu Ala Gln Ile His Glu Gly Phe Gln
 1 5 10

<210> 31
 <211> 10

40

<212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 31

Glu Leu Leu Arg Thr Leu Asn Gln Pro Asp
 1 5 10

5 <210> 32
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 32

Ser Gln Leu Gln Leu Thr Thr Gly Asn Gly
 1 5 10

<210> 33
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

15 <400> 33

Leu Phe Leu Ser Glu Gly Leu Lys Leu Val
 1 5 10

<210> 34
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

20 <400> 34

Asp Lys Phe Leu Glu Asp Val Lys Lys Leu
 1 5 10

<210> 35
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

25 <400> 35

Tyr His Ser Glu Ala Phe Thr Val Asn Phe
 1 5 10

<210> 36
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

30 <400> 36

Gly Asp His Glu Glu Ala Lys Lys Gln Ile
 1 5 10

<210> 37
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

35 <400> 37

Asn Asp Tyr Val Glu Lys Gly Thr Gln Gly
 1 5 10

<210> 38
 <211> 10

<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 38

Lys Ile Val Asp Leu Val Lys Glu Leu Asp
1 5 10

5 <210> 39
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 39

Arg Asp Thr Val Phe Ala Leu Val Asn Tyr
1 5 10

<210> 40
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

15 <400> 40

Ile Phe Phe Lys Gly Lys Trp Glu Arg Pro
1 5 10

<210> 41
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

20 <400> 41

Phe Glu Val Lys Asp Thr Glu Asp Glu Asp
1 5 10

<210> 42
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

25 <400> 42

Phe His Val Asp Gln Val Thr Thr Val Lys
1 5 10

30 <210> 43
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 43

Val Pro Met Met Lys Arg Leu Gly Met Phe
1 5 10

<210> 44
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

40 <400> 44

Asn Ile Gln His Cys Lys Lys Leu Ser Ser
1 5 10

<210> 45
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 5 <400> 45
 Trp Val Leu Leu Met Lys Tyr Leu Gly Asn
 1 5 10
 <210> 46
 <211> 10
 <212> PRT
 10 <213> Homo sapiens
 <400> 46
 Ala Thr Ala Ile Phe Phe Leu Pro Asp Glu
 1 5 10
 <210> 47
 <211> 10
 <212> PRT
 15 <213> Homo sapiens
 <400> 47
 Gly Lys Leu Gln His Leu Glu Asn Glu Leu
 1 5 10
 <210> 48
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 48
 Thr His Asp Ile Ile Thr Lys Phe Leu Glu
 1 5 10
 25 <210> 49
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 49
 Asn Glu Asp Arg Arg Ser Ala Ser Leu His
 30 1 5 10
 <210> 50
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 35 <400> 50
 Leu Pro Lys Leu Ser Ile Thr Gly Thr Tyr
 1 5 10
 <210> 51
 <211> 10
 <212> PRT
 40 <213> Homo sapiens
 <400> 51
 Asp Leu Lys Ser Val Leu Gly Gln Leu Gly
 1 5 10

<210> 52
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 5 <400> 52
 Ile Thr Lys Val Phe Ser Asn Gly Ala Asp
 1 5 10
 <210> 53
 <211> 10
 <212> PRT
 10 <213> Homo sapiens
 <400> 53
 Leu Ser Gly Val Thr Glu Glu Ala Pro Leu
 1 5 10
 <210> 54
 <211> 10
 <212> PRT
 15 <213> Homo sapiens
 <400> 54
 Lys Leu Ser Lys Ala Val His Lys Ala Val
 1 5 10
 <210> 55
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 20 <400> 55
 Leu Thr Ile Asp Glu Lys Gly Thr Glu Ala
 1 5 10
 <210> 56
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 25 <400> 56
 Ala Gly Ala Met Phe Leu Glu Ala Ile Pro
 1 5 10
 <210> 57
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 30 <400> 57
 Met Ser Ile Pro Pro Glu Val Lys Phe Asn
 1 5 10
 <210> 58
 <211> 10
 <212> PRT
 35 <213> Homo sapiens
 <400> 58
 Lys Pro Phe Val Phe Leu Met Ile Glu Gln
 1 5 10

ES 2 622 522 T3

<210> 59
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5 <400> 59

Asn Thr Lys Ser Pro Leu Phe Met Gly Lys
 1 5 10

<210> 60
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10 <400> 60

Val Val Asn Pro Thr Gln Lys
 1 5

<210> 61
 <211> 417
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

15 <400> 61

Met Pro Ser Ser Val Ser Trp Gly Ile Leu Leu Ala Gly Leu Cys Cys
 1 5 10 15

Leu Val Pro Val Ser Leu Ala Glu Asp Pro Gln Gly Asp Ala Ala Gln
 20 25 30

Lys Thr Asp Thr Ser His His Asp Gln Asp His Pro Thr Phe Asn Lys
 35 40 45

Ile Thr Pro Asn Leu Ala Glu Phe Ala Phe Ser Leu Tyr Arg Gln Leu
 50 55 60

Ala His Gln Ser Asn Ser Thr Asn Ile Phe Phe Ser Pro Val Ser Ile
 65 70 75 80

Ala Thr Ala Phe Ala Asn Leu Ser Leu Gly Thr Lys Ala Asp Thr His
 85 90 95

Asp Glu Ile Leu Glu Gly Leu Asn Phe Asn Leu Thr Glu Ile Pro Glu
 100 105 110

ES 2 622 522 T3

Ala Gln Ile His Glu Gly Phe Gln Glu Leu Leu Arg Thr Leu Asn Gln
 115 120 125

Pro Asp Ser Gln Leu Gln Leu Thr Thr Gly Asn Gly Leu Phe Leu Ser
 130 135 140

Glu Gly Leu Lys Leu Val Asp Lys Phe Leu Glu Asp Val Lys Lys Leu
 145 150 155 160

Tyr His Ser Glu Ala Phe Thr Val Asn Phe Gly Asp His Glu Glu Ala
 165 170 175

Lys Lys Gln Ile Asn Asp Tyr Val Glu Lys Gly Thr Gln Gly Lys Ile
 180 185 190

Val Asp Leu Val Lys Glu Leu Asp Arg Asp Thr Val Phe Ala Leu Val
 195 200 205

Asn Tyr Ile Phe Phe Lys Gly Lys Trp Glu Arg Pro Phe Glu Val Lys
 210 215 220

Asp Thr Glu Asp Glu Asp Phe His Val Asp Gln Val Thr Thr Val Lys
 225 230 240

Val Pro Met Met Lys Arg Leu Gly Met Phe Asn Ile Gln His Cys Lys
 245 250 255

Lys Leu Ser Ser Trp Val Leu Leu Met Lys Tyr Leu Gly Asn Ala Thr
 260 265 270

Ala Ile Phe Phe Leu Pro Asp Glu Gly Lys Leu Gln His Leu Glu Asn
 275 280 285

Glu Leu Thr His Asp Ile Ile Thr Lys Phe Leu Glu Asn Glu Asp Arg
 290 295 300

Arg Ser Ala Ser Leu His Leu Pro Lys Leu Ser Ile Thr Gly Thr Tyr
 305 310 315 320

Asp Leu Lys Ser Val Leu Gly Gln Leu Gly Ile Thr Lys Val Phe Ser
 325 330 335

Asn Gly Ala Asp Leu Ser Gly Val Thr Glu Glu Ala Pro Leu Lys Leu
 340 345 350

ES 2 622 522 T3

Ser Lys Ala Val His Lys Ala Val Leu Thr Ile Asp Glu Lys Gly Thr
355 360 365

Glu Ala Ala Gly Ala Met Phe Leu Glu Ala Ile Pro Met Ser Ile Pro
370 375 380

Pro Glu Val Lys Phe Asn Lys Pro Phe Val Phe Leu Met Ile Glu Gln
385 390 395 400

Asn Thr Lys Ser Pro Leu Phe Met Gly Lys Val Val Asn Pro Thr Gln
405 410 415

Lys

REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica que comprende un vehículo, un excipiente o un diluyente farmacéuticamente aceptable y una proteína de fusión, en donde la composición farmacéutica es para uso en un método para tratar un sujeto que requiere una terapia con AAT o que tiene una infección bacteriana o que tiene una infección micobacteriana, en donde la proteína de fusión comprende alfa-1 antitripsina (AAT) de mamífero o un fragmento peptídico de la misma, en donde el fragmento peptídico consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada a partir del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 58 y SEQ ID NO: 59, y una región constante de inmunoglobulina, en donde el fragmento peptídico de AAT inhibe una actividad proteasa de serina.
2. Una composición farmacéutica que comprende un vehículo, un excipiente o un diluyente farmacéuticamente aceptable y un ácido nucleico que codifica una proteína de fusión, en donde la composición farmacéutica es para uso en un método para tratar un sujeto que requiere una terapia con AAT o que tiene una infección bacteriana o que tiene una infección micobacteriana, en donde la proteína de fusión comprende alfa-1 antitripsina (AAT) de mamífero o un fragmento peptídico de la misma, en donde el fragmento peptídico consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada a partir del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 58 y SEQ ID NO: 59, y una región constante de inmunoglobulina, en donde el fragmento peptídico de AAT inhibe una actividad proteasa de serina.
3. Un ácido nucleico que codifica una proteína de fusión para uso como un medicamento, en donde el ácido nucleico codifica la proteína de fusión que comprende alfa-1 antitripsina (AAT) de mamífero o un fragmento peptídico de la misma, en donde el fragmento peptídico consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada a partir del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 58 y SEQ ID NO: 59, y una región constante de inmunoglobulina, en donde el fragmento peptídico de AAT inhibe una actividad proteasa de serina.
4. La composición farmacéutica para uso según las reivindicaciones 1 y 2, y el ácido nucleico para uso según la reivindicación 3, en donde la alfa-1 antitripsina (AAT) de mamífero comprende alfa-1 antitripsina (AAT) de mamífero de origen natural.
5. La composición farmacéutica para uso según las reivindicaciones 1 y 2, y el ácido nucleico para uso según la reivindicación 3, en donde la región constante de inmunoglobulina comprende una región constante de IgG1 humana.
6. La composición farmacéutica para uso según la reivindicación 5, y el ácido nucleico para uso según la reivindicación 5, en donde la región constante de IgG1 está modificada y en donde la región constante de IgG1 modificada no se une al receptor de Fc y/o no inicia reacciones de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC).
7. La composición farmacéutica para uso según las reivindicaciones 1 y 2, y el ácido nucleico para uso según la reivindicación 3, en donde la alfa-1 antitripsina (AAT) de mamífero o el fragmento peptídico de la misma se fusiona con el extremo amino-terminal o el extremo carboxilo-terminal de una región constante de inmunoglobulina.
8. La composición farmacéutica para uso según la reivindicación 7, y el ácido nucleico para uso según la reivindicación 7, en donde la región constante de inmunoglobulina comprende la región Fc.
9. La composición farmacéutica para uso según la reivindicación 8, y el ácido nucleico para uso según la reivindicación 8, en donde la región Fc de inmunoglobulina es Fc de tipo silvestre o una Fc mutante.
10. El ácido nucleico para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 9, en donde el ácido nucleico es para uso en un método para tratar a un sujeto que requiere una terapia con AAT o que tiene una infección bacteriana o que tiene una infección micobacteriana.

FIGURA 1: EFECTO DE ALFA-1-ANTITRIPSINA (AAT) Y MIMÉTICO DE AAT SOBRE UNA INFECCIÓN CON COMPLEJO MYCOBACTERIUM AVIUM (MAC) DE MACRÓFAGOS DERIVADOS DE MONOCITOS HUMANOS (N=4)

*P < 0,05 en comparación con cultivos de control

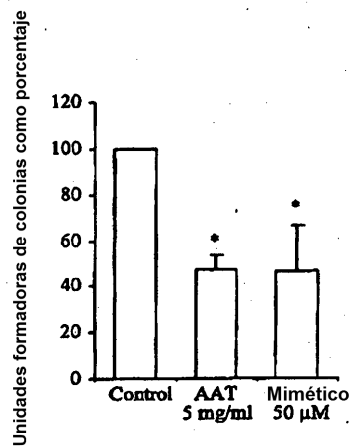


FIGURA 2: EFECTO DE ALFA-1-ANTITRIPSINA (AAT) Y MIMÉTICO DE AAT SOBRE TNF α INDUCIDO CON COMPLEJO MYCOBACTERIUM AVIUM (MAC) EN MACRÓFAGOS HUMANOS DERIVADOS DE MONOCITOS *P < 0,05 en comparación con cultivos infectados con MAC

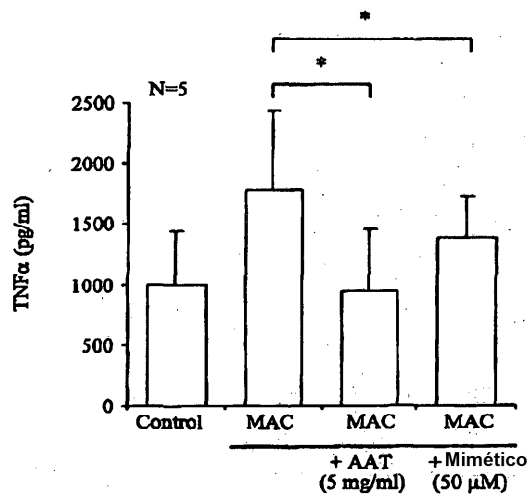
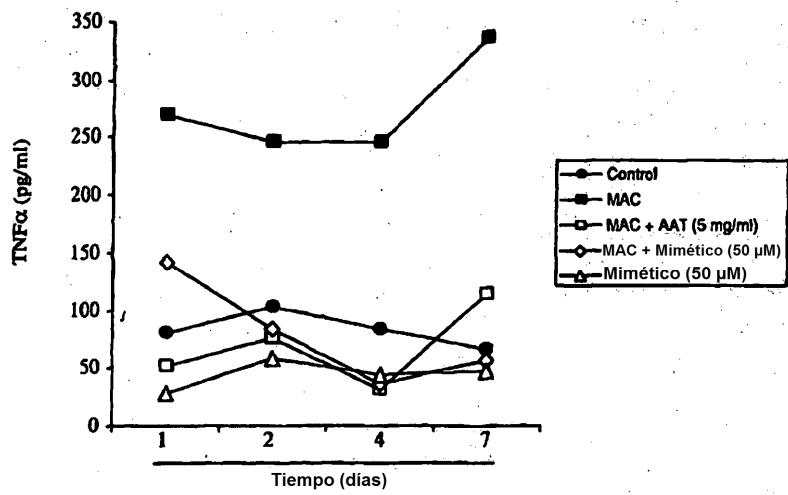


FIGURA 3: EFECTO DE ALFA-1-ANTITRIPSINA (AAT) Y MIMÉTICO DE AAT SOBRE TNF α INDUCIDO CON COMPLEJO MYCOBACTERIUM AVIUM (MAC) EN MACRÓFAGOS HUMANOS DERIVADOS DE MONOCITOS: EXPERIMENTO DE EVOLUCIÓN TEMPORAL (N=1)



Mecanismo de la toxina y método con el que los inhibidores de la proteasa de serina neutralizan la toxina.

Primero, la bacteria *Bacillus anthracis* secreta una toxina de 3 componentes que consiste en antígeno protector, factor letal y factor de edema.

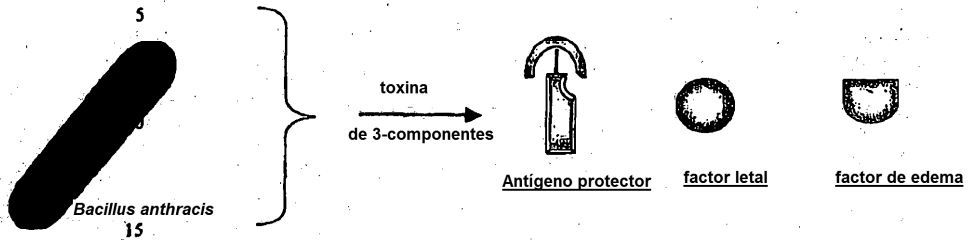


FIGURA 4A

Primero, el antígeno protector se une al receptor del antígeno protector que se encuentra en la superficie celular.

Receptor para el antígeno protector en la superficie celular.

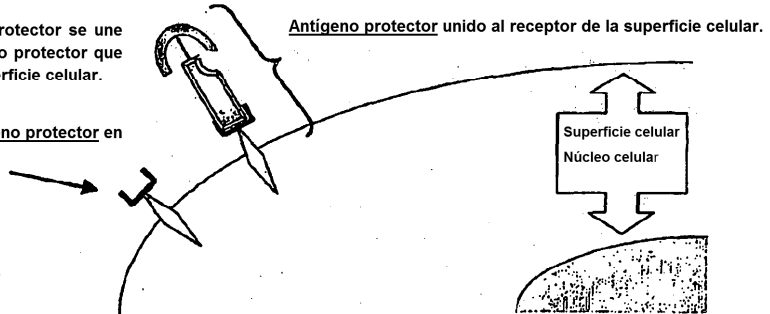


FIGURA 4B

Una proteasa de serina en la superficie celular se acopla con el antígeno protector unido.

Proteasa de serina de la superficie celular

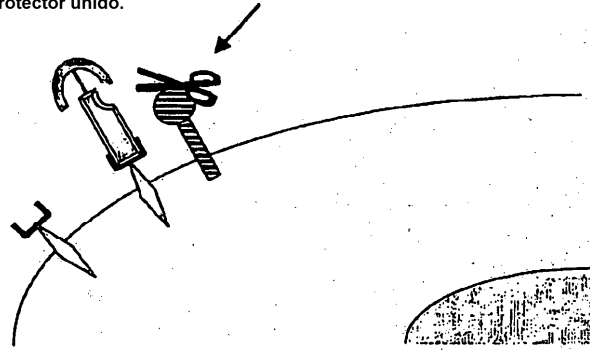


FIGURA 4C

El antígeno protector, que tiene una masa de 83 kDa, es procesado por la proteasa de serina sobre la superficie celular. Esto da como resultado la producción de fragmentos de 20 kDa y 63 kDa de antígeno protector. El fragmento de 63 kDa se inserta en la superficie celular.

Fragmento de 20 kDa

Fragmento de 63 kDa

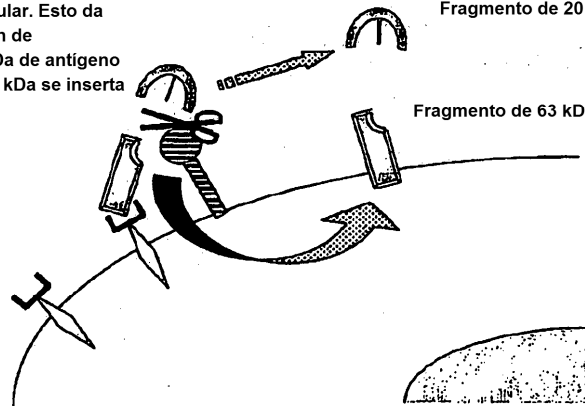


FIGURA 4D

Procesamiento repetido de moléculas de antígeno protector intactas de 83 kDa que da como resultado la formación de complejos de transportador heptámero (7 miembros) compuesto de 7 moléculas de antígeno protector (63 kDa) procesadas.

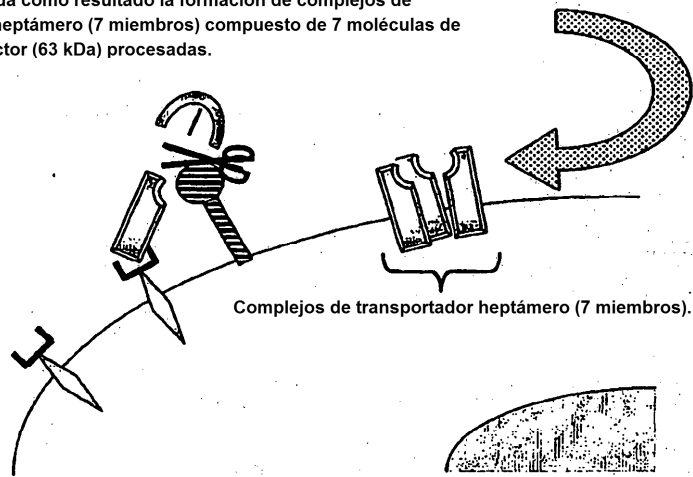


FIGURA 4E

Los heptámeros de antígeno protector sobre la superficie celular forman complejos de transporte que se unen al factor letal o al factor de edema. Esto viene seguido por el transporte de estos factores en el interior de la célula, en donde se activan para causar la enfermedad.

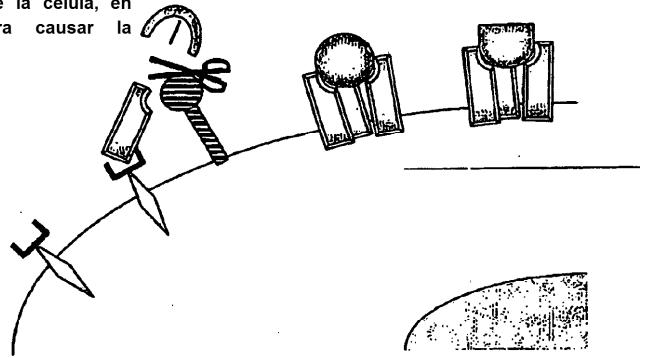


FIGURA 4F

El transporte del factor letal y el factor de edema dentro de la célula da como resultado la alteración de la función celular.

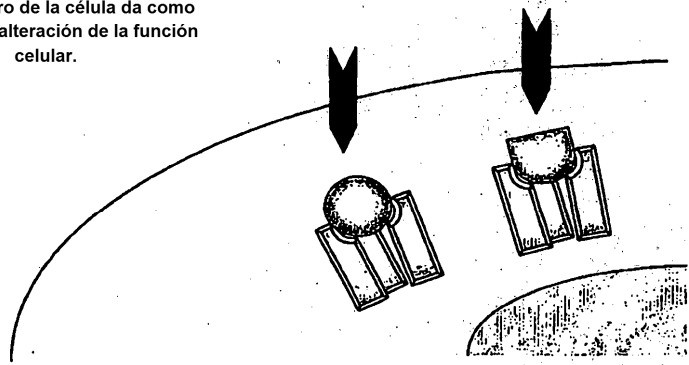
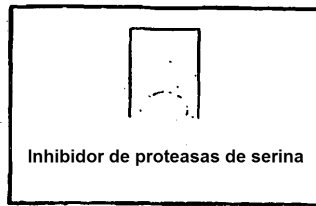


FIGURA 4G



El inhibidor de proteasas de serina bloquea el procesamiento del antígeno protector en la superficie celular. No se pueden formar los complejos de transportador de 7 miembros, por lo que se neutraliza la toxina del ántrax.

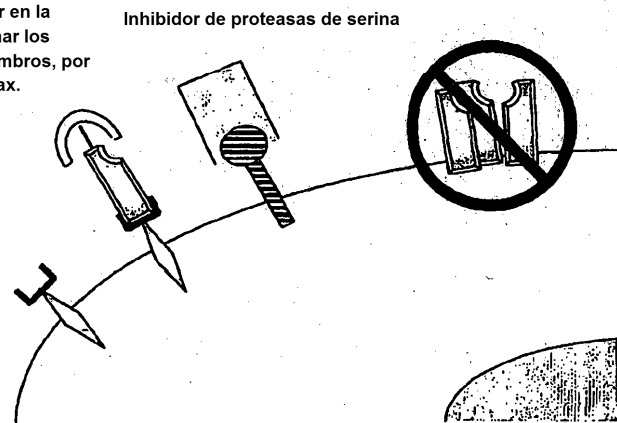


FIGURA 4H

Efecto de la alfa-1-antitripsina sobre la producción de interleucina-1 beta estimulada en sangre humana completa (N=3) ***P<0,001, **P<0,01 y P<0,05 en comparación con Staph solo

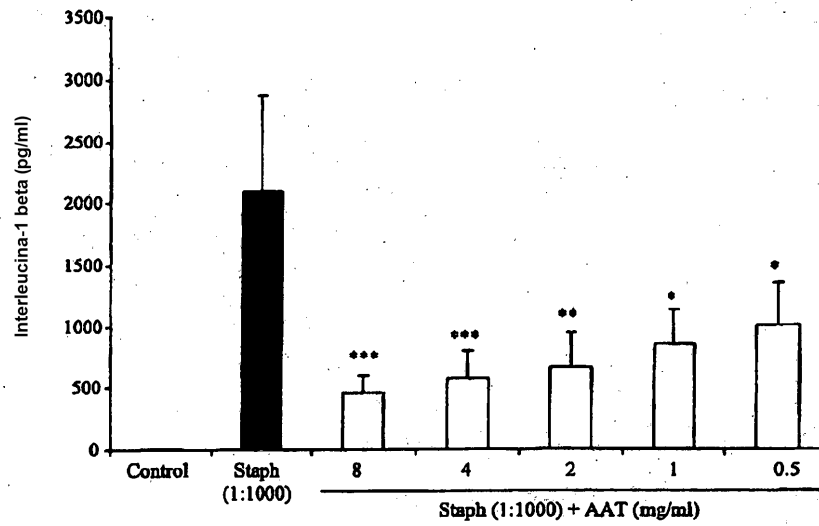


FIGURA 5