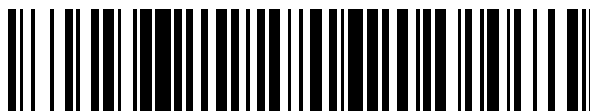


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 721 172**

51 Int. Cl.:

**C12N 9/24** (2006.01)  
**C12N 1/20** (2006.01)  
**C12N 15/00** (2006.01)  
**C07H 21/04** (2006.01)  
**A61K 38/47** (2006.01)  
**A61K 38/00** (2006.01)  
**A61K 39/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.07.2005** **E 17164276 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.01.2019** **EP 3241898**

54 Título: **Una nueva clase de moléculas terapéuticas a base de proteínas**

30 Prioridad:

**10.09.2004 US 939262**

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

**29.07.2019**

73 Titular/es:

**ANSUN BIOPHARMA, INC. (100.0%)**  
**3030 Callan Road**  
**San Diego, CA 92121, US**

72 Inventor/es:

**FANG, FANG y**  
**MALAKHOV, MICHAEL**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

**ES 2 721 172 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

Una nueva clase de moléculas terapéuticas a base de proteínas

## 5 Antecedentes de la invención

La invención se refiere a composiciones terapéuticas que se pueden utilizar para prevenir y tratar una infección de sujetos humanos y animales, debida a un agente patógeno y, específicamente, a composiciones terapéuticas a base de proteínas que se pueden utilizar para la prevención y el tratamiento de infecciones víricas o bacterianas. La invención también se refiere a composiciones terapéuticas a base de proteínas que se pueden utilizar para prevenir o mejorar las respuestas alérgicas e inflamatorias. La invención también se refiere a composiciones a base de proteínas para incrementar la eficacia de la transducción de un virus recombinante, tal como un virus recombinante utilizado en la terapia génica.

15 La gripe es una enfermedad respiratoria aguda, altamente contagiosa que ha acosado a la humanidad desde la antigüedad. Se caracteriza por epidemias anuales recurrentes y pandemias periódicas importantes a nivel mundial. Debido a la alta morbilidad y mortalidad relacionada con la enfermedad, los impactos económicos y sociales directos e indirectos de la gripe son enormes. Las epidemias anuales causan aproximadamente 300.000 hospitalizaciones y 25.000 muertes, solamente en los Estados Unidos. Cuatro pandemias tuvieron lugar en el siglo pasado; en total causaron decenas de millones de muertes. Modelos matemáticos basados en experiencias de pandemias anteriores han estimado que durante la próxima pandemia se producirán 89.000-207.000 muertes, 18-42 millones de consultas externas y 20-47 millones de enfermedades adicionales (Meltzer, MI, Cox, NJ y Fukuda, K. (1999) *Emerg Infect Dis* 5:659-671).

25 La gripe está causada normalmente por una infección con dos tipos de virus, el *virus de la gripe A* y el *virus de la gripe B* (el tercer tipo, *virus de la gripe C* solo causa síntomas leves como un resfriado común). Pertenecen a la familia de virus de ARN, *orthomyxoviridae*. Ambos virus de tipo A y tipo B tienen 8 genomas de ARN segmentados de cadena negativa dentro de una envoltura lipídica obtenida a partir de la célula hospedadora. La envoltura vírica está cubierta con espículas que se componen de tres tipos de proteínas: hemaglutinina (HA) que fija los virus a receptores de las células hospedadoras y media en la fusión de las membranas vírica y celular; neuraminidasa (NA) que facilita la liberación de los nuevos virus desde las células hospedadoras; y un pequeño número de proteínas M2 que sirven como canales de iones.

35 Las infecciones con los virus de la gripe de tipo A y B se inician típicamente en la superficie mucosa del tracto respiratorio superior. La replicación del virus se limita principalmente al tracto respiratorio superior, pero puede extenderse hasta el tracto respiratorio inferior y causar bronconeumonía que puede ser letal.

40 La proteína vírica de la gripe, hemaglutinina (HA), es la principal proteína de la envoltura vírica. Desempeña un papel esencial en la infección vírica. La importancia de la HA se evidencia por el hecho de que es la principal diana para los anticuerpos neutralizantes protectores, producidos por la respuesta inmune del hospedador (Hayden, FG. (1996) *Antiviral drug resistance* (editor D. D. Richman), págs. 59-77. Chichester, GB: John Wiley & Sons Ltd.). Ahora está claro que la HA tiene dos funciones diferentes en la infección vírica. En primer lugar, la HA es responsable de la fijación del virus a receptores celulares de ácido siálico. En segundo lugar, la HA media en la entrada del virus en las células diana, mediante la activación de la fusión de la envoltura vírica con las membranas celulares.

45 La HA se sintetiza como una proteína precursora, HA0, que se transfiere a través del aparato de Golgi a la superficie celular como un complejo molecular trimérico. HA0 se escinde adicionalmente para generar el extremo C-terminal HA1 (resto 328 de HA0) y el extremo N-terminal de HA2. En general se cree que la escisión se produce en la superficie celular o en virus liberados. La escisión de HA0 en HA1/HA2 no se requiere para la unión de HA al receptor de ácido siálico; sin embargo, se cree que es necesaria para la infectividad vírica (Klenk, HD y Rott, R. (1988) *Adv Vir Res.* 34:247-281; Kido, H, Niwa, Y, Beppu, Y y Towatari, T. (1996) *Advan Enzyme Regul* 36:325-347; Skehel, JJ y Wiley, DC. (2000) *Annu Rev Biochem* 69:531-569; Zambon, M. (2001) *Rev Med Virol* 11:227-241).

55 Actualmente, la gripe se combate mediante vacunación y compuestos antivíricos. Las vacunas antigripales inactivadas se emplean ahora a nivel mundial, especialmente en los grupos de alto riesgo. Los virus de la vacuna se cultivan en huevos de gallina fértiles, se inactivan por medios químicos y se purifican. Las vacunas son generalmente trivalentes, conteniendo virus de la gripe A (H1N1 y H3N2) y cepas de la gripe B representativas. Las cepas de la vacuna deben actualizarse periódicamente para mantener la eficacia; este esfuerzo está coordinado por la Organización Mundial de la Salud (OMS). Durante los periodos entre pandemias, por lo general se requieren 8 meses antes de que las vacunas contra la gripe actualizadas estén listas para el mercado (Wood, J. (2001) *Phil Trans R Soc Lond B* 356:1953-1960). Sin embargo, históricamente, las pandemias se extendieron a la mayoría de los continentes en 6 meses, y se espera que futuras pandemias se difundan aún más rápido, con el aumento de los viajes internacionales (Gust, ID, Hampson, AW. y Lavanchy, D. (2001) *Rev Med Virol* 11:59-70). Por lo tanto, será inevitable que una vacuna eficaz no esté disponible o sea muy escasa durante las primeras oleadas de futuras pandemias.

Los compuestos antivíricos se han convertido en el pilar para el tratamiento de enfermedades entre pandemias. Actualmente son también la única alternativa potencial para el control de las pandemias durante el período inicial, cuando las vacunas no están disponibles. Dos clases de compuestos antivíricos se encuentran actualmente en el mercado: los inhibidores de M2, como la amantadina y la rimantadina; y los inhibidores de NA, que incluyen oseltamivir (Tamiflu) y zanamivir (Relenza). Ambas clases de moléculas han demostrado eficacia en la prevención y el tratamiento de la gripe. Sin embargo, los efectos secundarios y el riesgo de generar virus resistentes a los fármacos siguen siendo los dos problemas principales para usarlos de forma extensa como quimioprofilaxis (Hayden, FG. (1996) En Antiviral drug resistance (editor, D. D. Richman), págs. 59-77. Chichester, GB: John Wiley & Sons Ltd.). Lo más importante, las futuras cepas pandémicas, tanto las desarrolladas de forma natural como las creadas artificialmente por ingeniería genética en la guerra biológica, pueden ser resistentes a todos los compuestos antivíricos disponibles, y eso tendrá consecuencias devastadoras a nivel mundial.

Resumiendo, en la actualidad, la vacunación disponible y los compuestos antivíricos están limitados por algunas deficiencias fundamentales. Se necesitan nuevas modalidades terapéuticas y profilácticas para manejar futuras pandemias de la gripe.

Las infecciones del tracto respiratorio (ITR) son los tipos más comunes y potencialmente más graves de enfermedades infecciosas. Clínicamente, las ITR incluyen sinusitis, otitis, laringitis, bronquitis y neumonía. Basándose en numerosos estudios de etiología y epidemiología, está claro que aunque muchos microorganismos tienen el potencial de causar ITR, solo un puñado de agentes patógenos son responsables de la gran mayoría de los casos. Estos agentes patógenos incluyen *S. pneumoniae*, *M. pneumoniae*, *H. influenzae*, *M. catarrhalis*, virus de la gripe A y B y virus paragripal. Además de causar CAP y AECB, varios de los agentes patógenos bacterianos, tales como *S. pneumoniae* y *H. influenzae*, también son la causa común de sinusitis aguda, otitis media, así como infecciones invasivas que conducen a sepsis, meningitis, etc. Por tanto, estos microorganismos tienen la mayor importancia clínica.

Una característica común de todas las bacterias patógenas respiratorias es que establecen una colonización comensal en la superficie mucosa de las vías respiratorias superiores; una colonización de este tipo precede a una infección y es un requisito previo para las infecciones. La colonización bacteriana en un recién nacido se produce poco después del nacimiento. Durante toda la vida, las vías respiratorias superiores, específicamente la nasofaringe y la orofaringe, siguen siendo un depósito ecológico dinámico de especies microbianas, en donde las bacterias se adquieren, se eliminan y se vuelven a adquirir continuamente. En la mayoría de los casos, la flora bacteriana en la faringe es inofensiva. Sin embargo, cuando se altera el estado del hospedador, algunos microorganismos pueden invadir los tejidos adyacentes o el torrente sanguíneo para causar enfermedades. Además de servir como puerta de entrada para las infecciones de la mucosa e invasivas con bacterias y virus, la nasofaringe es también la principal fuente de propagación de los microorganismos patógenos entre los individuos, así como el depósito en donde se seleccionan las bacterias resistentes a los antibióticos (García-Rodríguez y Martínez, J Antimicrob Chemother, (2002) 50 (Supl S2), 59-73; Soriano y Rodríguez-Cerrato, J Antimicrob Chemother, (2002) 50 Supl S2, 51-58). Está bien establecido clínicamente que los individuos que son propensos a las ITR, suelen ser portadores persistentes y recurrentes de las bacterias patógenas (García-Rodríguez y Martínez, J Antimicrob Chemother, (2002) 50 (Supl S2), 59-73; Mbaki *et al.*, Tohoku J Exp. Med., (1987) 153(2), 111-121).

*Helicobacter pylori* es un agente patógeno humano implicado en la gastritis y la úlcera péptica. La bacteria reside en el estómago humano y se une a las células epiteliales del antro gástrico. Se ha demostrado que la adhesión bacteriana está mediada por la unión de adhesina I y II de *Helicobacter pylori* a ácidos siálicos en la superficie epitelial.

Las siglecs (lectinas de tipo Ig que se unen a ácido siálico) son miembros de la superfamilia de inmunoglobulinas (Ig) que se unen al ácido siálico y son expresadas principalmente por células del sistema hematopoyético. Al menos se han descubierto 11 siglecs y parece que reconocen exclusivamente como ligando el ácido siálico en la superficie celular. Se cree que la unión de los siglecs al ácido siálico media en la adhesión y las interacciones célula-célula (Crocker y Varki, Trends Immunol., (2001) 22(6), 337-342; Angata y Brinkman-Van der Linden, Biochim. Biophys. Acta, (2002) 1572(2-3), 294-316). La siglec-8 (SAF-2) es una molécula de adhesión que está altamente restringida a la superficie de eosinófilos, basófilos y mastocitos, que son las células efectoras centrales en estados alérgicos, incluyendo la rinitis alérgica, el asma y el eczema. Se considera que la siglec-8 es responsable de mediar en el reclutamiento de los tres tipos de células alérgicas hacia las vías respiratorias, los pulmones y otros sitios de alergia. La siglec-1 (sialoadhesión) y siglec-2 (CD22) son las moléculas de adhesión en los macrófagos y linfocitos B, ambos tipos de células tienen un papel central en las reacciones inmunes que conducen a la inflamación.

Los virus recombinantes, en particular, los virus adenoasociados (VAA), se pueden utilizar para transferir el gen regulador de la conductancia transmembranal de la fibrosis quística (CFTR) de tipo silvestre a las células epiteliales, para corregir el defecto genético que causa la fibrosis quística (Flotte y Carter, Methods Enzymol., (1998) 292, 717-732). Los ensayos clínicos con vectores de VAA han mostrado un suministro eficaz y seguro del gen CFTR en células epiteliales con bajos niveles de transferencia génica (Wagner *et al.*, Lancet, (1998) 351(9117), 1702-1703). En comparación con los vectores adenovíricos, el VAA ofrece una expresión génica más estable y una inmunidad celular disminuida. Sin embargo, la eficacia de la transducción de VAA *in vivo* es más bien baja en el pulmón (Wagner *et al.*, Lancet, (1998) 351(9117), 1702-1703). Se necesita un método que pueda mejorar la eficacia de la transducción de VAA *in vivo* para conseguir un potencial terapéutico completo de la terapia génica para la fibrosis quística. Se ha

mostrado que carbohidratos cargados negativamente, tales como el ácido siálico, inhiben la eficacia de la transducción del vector VAA al epitelio de las vías respiratorias bien diferenciadas, y el tratamiento del epitelio de las vías respiratorias con glicosidasas, incluyendo una neuraminidasa, y endoglicosidasa H, mejora la eficacia de la transducción del vector VAA (Bals *et al.*, J Virol., (1999) 73(7), 6085-6088).

5 Breve compendio de la invención

10 La presente invención reconoce que la terapéutica actual para prevenir y tratar una infección por agentes patógenos es frecuentemente difícil de proporcionar de forma puntual, puede tener efectos secundarios no deseados y puede conducir a cepas de agentes patógenos resistentes a los fármacos. La presente invención también reconoce que el enfoque actual para tratar la alergia y la inflamación tiene una eficacia limitada y está asociado con efectos secundarios. Además, la presente invención también reconoce que el enfoque actual para administrar virus recombinantes produce poca eficacia de la transducción y una eficacia insatisfactoria de la terapia génica.

15 La presente invención proporciona nuevas composiciones y métodos para prevenir y tratar una infección con agentes patógenos. En particular, la presente invención proporciona compuestos que pueden actuar extracelularmente para prevenir la infección de una célula con un agente patógeno. Algunas realizaciones preferidas de la presente invención son compuestos terapéuticos que tienen un dominio de anclaje que ancla el compuesto a la superficie de una célula diana, y un dominio terapéutico que puede actuar extracelularmente para prevenir la infección de la célula diana con un agente patógeno, tal como un virus o una bacteria.

20 En un aspecto, la invención proporciona una composición basada en proteínas para prevenir o tratar la infección por un patógeno. La composición comprende un compuesto que comprende al menos un dominio terapéutico que comprende un péptido o una proteína, donde el dominio terapéutico tiene al menos una actividad extracelular que puede prevenir la infección de una célula diana por un patógeno, y al menos un dominio de anclaje que puede unirse en o cerca de la membrana de una célula diana.

25 En algunas realizaciones de este aspecto de la presente invención, el al menos un dominio terapéutico comprende una actividad inhibidora que previene o impide la infección de una célula diana por un patógeno. En una realización preferida, la actividad inhibidora inhibe la actividad de una proteasa que puede procesar una proteína vírica necesaria para infección de una célula diana. En una realización particularmente preferida, el compuesto comprende un dominio terapéutico que puede inhibir el procesamiento de la proteína HA de virus de la gripe, y el dominio de anclaje puede unirse con el compuesto en la superficie de una célula epitelial respiratoria.

30 En algunas realizaciones de la presente invención, al menos un dominio terapéutico comprende una actividad catalítica. En una realización preferida, la actividad catalítica retira un resto de la superficie de una célula diana que es necesario para infección de la célula diana. En una realización particularmente preferida, el dominio terapéutico es una sialidasa que puede digerir restos de ácido siálico en la superficie de células diana epiteliales y el dominio de anclaje es un dominio de unión a GAG de una proteína humana que puede unirse con heparina o restos de heparán sulfato en la superficie de una célula epitelial.

35 En otro aspecto, la presente invención incluye composiciones farmacéuticas para tratar o prevenir infección por patógenos en un sujeto. Las composiciones farmacéuticas comprenden un compuesto de la presente invención que comprende al menos un dominio terapéutico y al menos un dominio de anclaje. La composición farmacéutica también puede comprender soluciones, estabilizadores, cargas y similares. En algunas realizaciones preferidas, la composición farmacéutica se formula como un inhalante. En algunas realizaciones preferidas, la composición farmacéutica se formula como una pulverización nasal.

40 Otro aspecto de la presente invención es una composición farmacéutica que comprende al menos una sialidasa. La sialidasa puede aislarse de cualquier fuente, tal como, por ejemplo, una fuente bacteriana o de mamífero, o puede ser una proteína recombinante que es sustancialmente homóloga de una sialidasa de origen natural. Una composición farmacéutica que comprende una sialidasa puede formularse para administración nasal, traqueal, bronquial, oral o tópica, o puede formularse como una solución inyectable o como colirios. Una composición farmacéutica que comprende una sialidasa puede usarse para tratar o prevenir la infección por patógenos, para tratar o prevenir alergia o respuesta inflamatoria, o para potenciar la eficacia de transducción de un virus recombinante para terapia génica.

45 Otro aspecto más de la presente invención es una proteína de dominio catalítico de sialidasa. En este aspecto, las proteínas que comprenden el dominio catalítico de una sialidasa pero comprenden menos que la sialidasa completa de la que deriva la secuencia de dominio catalítico se consideran proteínas de dominio catalítico de sialidasa. Las proteínas de dominio catalítico de sialidasa pueden comprender otras secuencias proteicas, tales como, pero sin limitación, dominios funcionales derivados de otras proteínas. Una composición farmacéutica que comprende una sialidasa puede formularse para administración nasal, traqueal, bronquial, oral o tópica, o puede formularse como una solución inyectable o como colirios. Una composición farmacéutica que comprende una sialidasa puede usarse para tratar o prevenir infección por patógenos para tratar o prevenir alergia o respuesta inflamatoria, o para potenciar la eficacia de transducción de un virus recombinante para terapia génica.

En otro aspecto más, la presente invención incluye un método para tratar o prevenir la infección por un patógeno. En realizaciones preferidas, el método comprende administrar una actividad sialidasa, tal como una sialidasa o una proteína de dominio catalítico de sialidasa, incluyendo una proteína de fusión de dominio catalítico de sialidasa, a un sujeto para prevenir o tratar una infección. Un patógeno puede ser, por ejemplo, un patógeno vírico o bacteriano. El método incluye aplicar una cantidad farmacéuticamente eficaz de un compuesto de la presente invención a al menos una célula diana de un sujeto. Preferentemente, la composición farmacéutica puede aplicarse mediante el uso de una formulación de pulverización, inhalante o tópica.

La presente invención también proporciona nuevas composiciones y métodos para tratar la alergia y la inflamación. En particular, la presente invención proporciona compuestos que pueden actuar extracelularmente para prevenir o inhibir la adhesión y la función de células inflamatorias. Algunas realizaciones preferidas de compuestos para tratar la alergia o inflamación comprenden al menos un dominio terapéutico que ancla el compuesto a la superficie de una célula diana. En algunas realizaciones preferidas, el método comprende administrar una actividad sialidasa, tal como una sialidasa o una proteína de dominio catalítico de sialidasa, incluyendo una proteína de fusión de dominio catalítico de sialidasa a un sujeto para prevenir o tratar una respuesta alérgica o inflamatoria. La respuesta alérgica o inflamatoria puede ser asma, rinitis alérgica, condiciones cutáneas tales como eccema o respuesta a toxinas vegetales o animales. El método incluye aplicar una cantidad farmacéuticamente eficaz de un compuesto de la presente invención a al menos una célula diana de un sujeto. Preferentemente, las composiciones farmacéuticas pueden aplicarse mediante el uso de una formulación de pulverización, inhalante o tópica.

La presente invención también proporciona nuevas composiciones y métodos para mejorar la eficacia de transferencia génica por vectores víricos recombinantes durante terapia génica. En particular, la presente invención proporciona compuestos que pueden actuar extracelularmente para reducir la barrera física o química que obstaculiza la transducción por vectores de terapia génica, tales como vector de AAV. Algunos compuestos preferidos de la presente invención para mejorar la eficacia de transferencia génica por vectores víricos recombinantes comprenden al menos un dominio terapéutico que tiene una actividad extracelular y al menos un dominio de anclaje que ancla el compuesto a la superficie de una célula diana. En algunas realizaciones preferidas, el método comprende administrar una actividad sialidasa, tal como una sialidasa o una proteína de dominio catalítico de sialidasa, incluyendo una proteína de fusión de dominio catalítico de sialidasa a un sujeto para facilitar la transducción de una célula diana por un vector vírico recombinante. El método incluye aplicar una cantidad eficaz de un compuesto de la presente invención junto con un vector vírico recombinante a al menos una célula diana. Una composición farmacéutica de la presente invención puede aplicarse mediante el uso de una formulación de pulverización, inhalante o tópica.

#### Breve descripción de varias vistas de los dibujos

La Figura 1 es una representación esquemática de la estructura primaria de los aminoácidos de aprotinina.

La Figura 2 muestra las secuencias que se unen a GAG de cuatro genes humanos: PF4, factor plaquetario 4 humano; IL8, interleucina 8 humana; AT III, antitrombina humana III; ApoE, apolipoproteína humana E; AAMP, proteína celular migratoria angioasociada humana, anfirregulina humana.

La Figura 3 es una comparación de secuencias entre las sialidasas humanas NEU2 y NEU4.

La Figura 4 es una tabla que compara la especificidad de sustrato de sialidasas bacterianas y fúngicas.

La Figura 5 representa las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos de la construcción n.º 1 que codifica His6-AvCD. Los sitios NcoI y HindIII utilizados para la clonación en pTrc99a se muestran en negrita.

La Figura 6 representa las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos de la construcción n.º 2 que codifica AR-AvCD. Los sitios NcoI y HindIII utilizados para la clonación en pTrc99a se muestran en negrita.

La Figura 7 representa las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos de la construcción n.º 3 que codifica AR-G<sub>4</sub>S-AvCD. Los sitios NcoI y HindIII utilizados para la clonación en pTrc99a se muestran en negrita.

La Figura 8 es un gráfico de los datos de un experimento que muestra que el marcador AR mejora la eliminación del ácido siálico ligado a  $\alpha(2,6)$  procedente de células MDCK. El eje Y muestra el porcentaje de ácido siálico ligado a  $\alpha(2,6)$  que queda en la superficie de las células MDCK después del tratamiento con diversas diluciones de AvCD recombinante (construcción n.º 1) (rombos) o AR-AvCD recombinante (construcción n.º 2) (cuadrados).

La Figura 9 es un gráfico que representa la protección contra virus de la gripe, conferida por el tratamiento de las células MDCK con la proteína AR-AvCD recombinante procedente de la construcción n.º 2 o la sialidasa aislada de *A. ureafaciens*. Las cepas víricas estimuladas son: A/WS/33 (H1N1); A/PR/8 (H1N1); A/Japan/305/57 (H2N2); A/Victoria/504/2000 (H3N2); A/HongKong/8/68 (H3N2); B/Lee/40; 7. B/Maryland/1/59; y Turkey/Wis/66 (H9N2).

La Figura 10 es un gráfico que muestra el nivel de inhibición de la amplificación del virus de la gripe a través de la sialidasa recombinante AR-AvCD y la sialidasa recombinante AR-G<sub>4</sub>S-AvCD. Las cepas víricas estimuladas son:

A/PR/8 (H1N1); A/WS/33 (H1N1); A/Japan/305/57 (H2N2); A/HongKong/8/68 (H3N2); B/Lee/40; 7. B/Maryland/1/59; y Turkey/Wis/66 (H9N2).

5 La Figura 11 proporciona gráficos que muestran que la administración tópica de la proteína de fusión de sialidasa recombinante AR-AvCD reduce las respuestas inflamatorias de hurones infectados con un virus de la gripe A (H1N1). (A) El número total de células inflamatorias procedentes de muestras de lavado nasal, obtenidas a partir de animales infectados en los momentos indicados después de la infección. (B) La concentración de proteínas se determinó en muestras de lavado nasal exentas de células de hurones infectados. Los hurones infectados fueron tratados con vehículo (cuadrados) o fueron tratados con la proteína de fusión de sialidasa AR-AvCD recombinante preparada a partir de la construcción n.º 2 (triángulos). Proteína de fusión de sialidasa AvCD de animales no infectados preparada a partir de la construcción n.º 2 (triángulo). Los animales no infectados también fueron tratados con la proteína de fusión de sialidasa AR-AvCD recombinante (rombos). Los valores estadísticamente significativos están marcados con \* (p <0,05) y \*\* (p <0,01).

15 La Figura 12 es una tabla que representa la inhibición de la replicación vírica, las CE50 de protección celular y los índices selectivos para dos proteínas de fusión con dominio catalítico de sialidasa de la presente invención. Todas las CE50 están en mU/ml.

20 La Figura 13 es una tabla que representa la replicación vírica en el tracto respiratorio de hurones tratados con proteínas de fusión con dominio catalítico de sialidasa de la presente invención y hurones tratados con un vehículo control.

Descripción detallada de la invención

25 Definiciones

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en este documento tienen el mismo significado que el que entiende comúnmente un experto ordinario en la técnica a la que pertenece esta invención. En general, la nomenclatura utilizada en esta memoria y los procedimientos de preparación o de laboratorio descritos más abajo son bien conocidos y se emplean generalmente en la técnica. Los métodos convencionales se utilizan para estos procedimientos, tales como los proporcionados en la técnica y en diversas referencias generales. Cuando se proporciona un término en singular, los inventores también contemplan el plural de ese término. Cuando hay discrepancias en los términos y definiciones usados en referencias que se incorporan por referencia, los términos usados en esta solicitud tendrán las definiciones proporcionadas en el presente documento. Tal y como se emplea en toda la descripción, a menos que se indique lo contrario, se entenderá que los siguientes términos tienen los siguientes significados:

35 Un "agente patógeno" puede ser cualquier virus o microorganismo que puede infectar una célula, un tejido o un organismo. Un agente patógeno puede ser un virus, una bacteria o un protozoo.

40 Una "célula diana" es cualquier célula que puede estar infectada por un agente patógeno o cualquier célula que puede interactuar con células inflamatorias, o una célula hospedadora que es el destino previsto para un gen exógeno transferido por un virus recombinante.

45 Un "virus recombinante" o un "vector vírico recombinante", un "vector vírico para terapia génica" o un "vector para terapia génica" se define como un virus modificado genéticamente que comprende uno o varios genes exógenos. Cuando una célula diana se transduce con un virus recombinante, el o los genes exógenos se transfieren a la célula diana. Los genes transferidos a una célula diana se pueden expresar en la célula para proporcionar los efectos terapéuticos deseados. Actualmente, la mayoría de los vectores víricos para terapia génica empleados más generalmente, se basan en cuatro tipos de virus: retrovirus (incluyendo lentivirus), adenovirus, virus adenoasociado (VAA) y virus del herpes simple tipo 1.

55 Las "células inflamatorias" son células que llevan a cabo o participan en las respuestas inflamatorias del sistema inmune. Las células inflamatorias incluyen linfocitos B, linfocitos T, macrófagos, basófilos, eosinófilos, mastocitos, células NK y monocitos.

60 Una "actividad extracelular que puede prevenir la infección de una célula diana con un agente patógeno" es cualquier actividad que puede bloquear o impedir la infección de una célula diana con un agente patógeno actuando en o cerca de la superficie exterior de una célula diana. Una actividad extracelular que puede prevenir la infección de una célula diana con un agente patógeno, puede ser una actividad tal como, pero no limitada a una actividad catalítica o una actividad inhibidora. Por ejemplo, una actividad catalítica puede ser una actividad enzimática que degrada una o varias entidades (tales como, pero sin limitación ligandos, receptores o enzimas) sobre un agente patógeno, sobre una célula diana o en la proximidad de una célula diana, en donde una o varias entidades contribuyen al proceso de infección. Una actividad catalítica también puede modificar una o varias entidades sobre un agente patógeno, sobre una célula diana o en la proximidad de una célula diana, de tal manera que se reduce la propiedad que favorece la infección de la entidad. Una actividad inhibidora puede ser una actividad que, por ejemplo, se une a un receptor o ligando y evita que el receptor o el ligando se unan a un resto, en donde la unión es necesaria o favorece el proceso de infección.

Una actividad inhibitoria también puede ser un inhibidor de una enzima o un receptor que impide que la enzima o el receptor realice una función que es necesaria o favorece el proceso de infección. El exterior de una célula diana incluye la membrana de la célula diana en sí, así como el medio extracelular que rodea a la célula diana, incluyendo la matriz extracelular, los espacios intracelulares y los espacios lumbinales. Para las células epiteliales, el exterior de una célula diana también incluye la superficie apical o luminal de la membrana celular que forma los revestimientos lumbinales, y el medio extracelular próximo a la superficie luminal. Una "actividad extracelular que puede prevenir la infección de una célula diana con un agente patógeno" puede ser cualquier tipo de entidad química, incluyendo una proteína, un polipéptido, un péptido, un ácido nucleico, un ácido nucleico peptídico, un análogo de ácido nucleico, un nucleótido, un análogo de nucleótido, una molécula orgánica pequeña, un polímero, lípidos, esteroides, ácidos grasos, carbohidratos y similares, incluyendo combinaciones de cualquiera de ellos. Sin embargo, la actividad comprende preferiblemente un péptido o una proteína o está acoplada a un péptido o una proteína.

Una "actividad extracelular que puede mejorar la eficacia de la transducción o la eficacia de la transferencia génica, a través de un virus recombinante" es cualquier actividad que reduce o elimina las barreras físicas o químicas que impiden la entrada de un virus recombinante en la célula hospedadora, que actúa en la superficie exterior o cerca de la misma, de una célula diana. Una actividad extracelular que puede mejorar la eficacia de la transducción o la eficacia de la transferencia génica, de un virus recombinante, puede ser una actividad tal como, pero no limitada a, una actividad catalítica o una actividad inhibitoria. Por ejemplo, una actividad catalítica puede ser una actividad enzimática que degrada una o varias entidades (tales como, pero sin limitación ligandos, receptores o enzimas) sobre un agente patógeno, sobre una célula diana o en la proximidad de una célula diana, en donde una o varias entidades contribuyen al proceso de infección. Una actividad catalítica también puede modificar una o varias entidades sobre un agente patógeno, sobre una célula diana o en la proximidad de una célula diana, de tal manera que se reduce la propiedad de favorecer la infección de la entidad. Una actividad inhibitoria puede ser una actividad que, por ejemplo, se une a un receptor o a un ligando y evita que el receptor o el ligando se unan a un resto, en donde la unión es necesaria o favorece el proceso de infección. Una actividad inhibitoria también puede ser un inhibidor de una enzima o un receptor que impide que la enzima o el receptor desempeñen una función que es necesaria o favorece el proceso de infección. El exterior de una célula diana incluye la membrana de la célula diana en sí, así como el medio extracelular que rodea a la célula diana, incluyendo la matriz extracelular, los espacios intracelulares y los espacios lumbinales. Para las células epiteliales, el exterior de una célula diana también incluye la superficie apical o luminal de la membrana celular que forma los revestimientos lumbinales, y el medio extracelular cerca de la superficie luminal. Una "actividad extracelular que puede prevenir la infección de una célula diana con un agente patógeno" puede ser cualquier tipo de entidad química, incluyendo una proteína, un polipéptido, un péptido, un ácido nucleico, un ácido nucleico peptídico, un análogo de ácido nucleico, un nucleótido, un análogo de nucleótido, una molécula orgánica pequeña, un polímero, lípidos, esteroides, ácidos grasos, carbohidratos y similares, incluyendo combinaciones de cualquiera de ellos. Sin embargo, la actividad comprende preferentemente un péptido o una proteína o está acoplada a un péptido o una proteína.

Una "actividad extracelular que puede inhibir la adhesión o la función de las células inflamatorias" es cualquier actividad que puede evitar que las células inflamatorias entren en contacto con la célula diana y afecten al estado fisiológico normal de la célula diana.

Un "dominio que puede anclar dicho al menos un dominio terapéutico a la membrana de una célula diana", también denominado "dominio de anclaje extracelular" o simplemente, "dominio de anclaje", se refiere a una entidad química que se puede unir de forma estable a un resto que está sobre una superficie celular o en el exterior, o está muy próximo a la superficie de una célula. Un dominio de anclaje extracelular puede estar ligado de forma reversible o irreversible a uno o varios restos, tales como, preferiblemente, uno o varios dominios terapéuticos, y por lo tanto causa que uno o varios restos terapéuticos fijados se conserven en la superficie exterior de una célula eucariota o en su proximidad. Preferiblemente, un dominio de anclaje extracelular se une a al menos una molécula en la superficie de una célula diana o a al menos una molécula que está muy asociada con la superficie de una célula diana. Por ejemplo, un dominio de anclaje extracelular se puede unir a una molécula asociada de forma covalente o no covalente con la membrana celular de una célula diana, o se puede unir a una molécula presente en la matriz extracelular que rodea una célula diana. Un dominio de anclaje extracelular es preferiblemente un péptido, un polipéptido o una proteína, y también puede comprender cualquier tipo adicional de entidad química, incluyendo una o varias proteínas, polipéptidos o péptidos adicionales, un ácido nucleico, un ácido nucleico peptídico, un análogo de ácido nucleico, un nucleótido, un análogo de nucleótido, una molécula orgánica pequeña, un polímero, lípidos, esteroides, ácidos grasos, hidratos de carbono, o una combinación de cualquiera de ellos.

Tal como se usa en el presente documento, una secuencia de proteína o de péptido es "sustancialmente homóloga" a una secuencia de referencia cuando es idéntica a una secuencia de referencia, o comprende una o varias deleciones de aminoácidos, uno o varios aminoácidos adicionales, o una o varias sustituciones conservadoras de aminoácidos, y conserva la misma actividad o esencialmente la misma que la secuencia de referencia. Las sustituciones conservadoras se pueden definir como intercambios dentro de uno de los siguientes cinco grupos:

- I. Restos pequeño, alifáticos, no polares o ligeramente polares: Ala, Ser, Thr, Pro, Gly
- II. Restos polares, cargados negativamente y sus amidas: Asp, Asn, Glu, Gln
- III. Restos polares, cargados positivamente: His, Arg, Lys

IV. Restos grandes, alifáticos no polares: Met, Leu, Ile, Val, Cys

V. Restos grandes aromáticos: Phe, Trp, Trp

Dentro de los grupos anteriores, la siguiente sustitución se considera que es "muy conservadora": Asp/Glu, His/Arg/Lys, Phe/Tyr/Trp y Met/Leu/Ile/Val. Las sustituciones semiconservadoras se definen como intercambios entre dos de los grupos (I)-(IV) anteriores que se limitan al supergrupo (A), que comprende (I), (II) y (III) anteriores, o al supergrupo (B), que comprende (IV) y (V) anteriores. Además, cuando en la solicitud se especifican aminoácidos hidrófobos, se hace referencia a los aminoácidos Ala, Gly, Pro, Met, Leu, Ile, Val, Cys, Phe y Trp, mientras que con los aminoácidos hidrófilos se hace referencia a Ser, Thr, Asp, Asn, Glu, Gln, His, Arg, Lys y Tyr.

Una "sialidasa" es una enzima que puede eliminar un resto de ácido siálico de una molécula de sustrato. Las sialidasas (N-acilneuraminosilglicohidrolasas, EC 3.2.1.18) son un grupo de enzimas que eliminan hidrolíticamente restos de ácido siálico de sialo-glicoconjugados. Los ácidos siálicos son alfa-ceto ácidos con una estructura principal de 9 carbonos que se encuentran generalmente en las posiciones más exteriores de las cadenas de oligosacáridos que se fijan a glicoproteínas y glicolípidos. Uno de los principales tipos de ácido siálico es el ácido N-acetilneuramínico (Neu5Ac), que es el precursor biosintético de la mayoría de los otros tipos. La molécula sustrato puede ser, como ejemplos no limitantes, un oligosacárido, un polisacárido, una glicoproteína, un gangliósido o una molécula sintética. Por ejemplo, una sialidasa puede escindir enlaces que tienen uniones alfa(2,3)-Gal, alfa(2,6)-Gal o alfa(2,8)-Gal entre un resto de ácido siálico y el resto de la molécula sustrato. Una sialidasa también puede escindir algunos o todos los enlaces entre el resto de ácido siálico y el resto de la molécula sustrato. Dos enlaces importantes entre Neu5Ac y los penúltimos restos de galactosa de las cadenas laterales de hidratos de carbono se encuentran en la naturaleza, Neu5Ac alfa (2,3)-Gal y Neu5Ac alfa (2,6)-Gal. Tanto las moléculas de Neu5Ac alfa (2,3)-Gal como de Neu5Ac alfa (2,6)-Gal pueden ser reconocidas por el virus de la gripe como receptor, aunque los virus humanos parecen preferir Neu5Ac alfa (2,6)-Gal, los virus aviares y equinos reconocen predominantemente Neu5Ac alfa (2,3)-Gal. Una sialidasa puede ser una sialidasa de origen natural, una sialidasa modificada genéticamente (tal como, pero no limitada a una sialidasa cuya secuencia de aminoácidos se basa en la secuencia de una sialidasa de origen natural, que incluye una secuencia que es sustancialmente homóloga a la secuencia de una sialidasa de origen natural). Tal y como se usa en este documento, "sialidasa" también puede significar la porción activa de una sialidasa de origen natural, o un péptido o una proteína que comprende secuencias basadas en la porción activa de una sialidasa de origen natural.

Una "proteína de fusión" es una proteína que comprende secuencias de aminoácidos de al menos dos fuentes diferentes. Una proteína de fusión puede comprender una secuencia de aminoácidos que se obtiene a partir de una proteína de origen natural o que es sustancialmente homóloga a la totalidad de una proteína de origen natural o a una porción de la misma, y además puede comprender de uno a un número muy elevado de aminoácidos que se obtienen a partir de, o que son sustancialmente homólogos, a la totalidad o una porción de una proteína de origen natural diferente. Como alternativa, una proteína de fusión puede comprender una secuencia de aminoácidos que se obtiene a partir de una proteína de origen natural o que es sustancialmente homóloga a la totalidad o a una porción de una proteína de origen natural, y además puede comprender de uno a un número muy elevado de aminoácidos que son secuencias sintéticas.

Una "proteína con dominio catalítico de sialidasa" es una proteína que comprende el dominio catalítico de una sialidasa, o una secuencia de aminoácidos que es sustancialmente homóloga al dominio catalítico de una sialidasa, pero no comprende la secuencia de aminoácidos completa de la sialidasa de la que se ha obtenido el dominio catalítico, en donde la proteína con el dominio catalítico de sialidasa conserva sustancialmente la misma actividad que la sialidasa intacta de la que se ha obtenido el dominio catalítico. Una proteína con dominio catalítico de sialidasa puede comprender secuencias de aminoácidos que no se obtienen a partir de una sialidasa, pero esto no es necesario. Una proteína con dominio catalítico de sialidasa puede comprender secuencias de aminoácidos que se obtienen a partir de, o que son sustancialmente homólogas a secuencias de aminoácidos de una o varias otras proteínas conocidas, o puede comprender uno o varios aminoácidos que no se obtienen a partir de, o son sustancialmente homólogos a secuencias de aminoácidos de otras proteínas conocidas.

#### I. Composición para la prevención o el tratamiento de la infección con un agente patógeno

La presente invención incluye compuestos basados en péptidos o proteínas que comprenden al menos un dominio que puede anclar al menos un dominio terapéutico a la membrana de una célula eucariota y al menos un dominio terapéutico que tiene una actividad extracelular que puede prevenir la infección de una célula con un agente patógeno. Por compuestos "basados en péptidos o proteínas", se entiende que los dos grandes dominios del compuesto tienen una estructura de aminoácidos, en la que los aminoácidos están unidos por enlaces peptídicos. Un compuesto basado en péptidos o proteínas también puede tener otros compuestos o grupos químicos fijados a la estructura o al esqueleto de aminoácidos, incluyendo restos que contribuyen a la actividad de anclaje del dominio de anclaje, o restos que contribuyen a la actividad que evita la infección o el dominio terapéutico. Por ejemplo, los agentes terapéuticos basados en proteínas de la presente invención pueden comprender compuestos y moléculas tales como, pero sin limitación: carbohidratos, ácidos grasos, lípidos, esteroides, nucleótidos, análogos de nucleótidos, moléculas de ácidos nucleicos, análogos de ácidos nucleicos, moléculas de ácidos nucleicos peptídicos, moléculas orgánicas pequeñas o incluso polímeros. Los productos terapéuticos basados en proteínas de la presente invención también pueden comprender aminoácidos modificados o no naturales. Las porciones que no son aminoácidos de los compuestos pueden servir



5 para cualquier fin, incluyendo pero sin limitación: facilitar la purificación del compuesto, mejorar la solubilidad o la distribución del compuesto (tal como en una formulación terapéutica), unir dominios del compuesto o unir restos químicos con el compuesto, contribuir a la estructura bidimensional o tridimensional del compuesto, aumentar el tamaño total del compuesto, aumentar la estabilidad del compuesto y contribuir a la actividad de anclaje o la actividad terapéutica del compuesto.

10 Los compuestos a base de péptidos o proteínas de la presente invención también pueden incluir secuencias de proteínas o péptidos, además de las que comprenden dominios de anclaje o dominios terapéuticos. Las secuencias de proteínas adicionales pueden servir para cualquier fin, incluyendo pero sin limitación cualquiera de los fines descritos anteriormente (facilitar la purificación del compuesto, mejorar la solubilidad o la distribución del compuesto, unir dominios del compuesto o unir restos químicos al compuesto, contribuir a la estructura bidimensional o tridimensional del compuesto, aumentar el tamaño total del compuesto, aumentar la estabilidad del compuesto o contribuir a la actividad de anclaje o a la actividad terapéutica del compuesto). Preferiblemente, cualquier secuencia de proteína o de aminoácido adicional forma parte de una cadena de polipéptido o proteína individual que incluye el dominio o los dominios de anclaje y el dominio o los dominios terapéuticos, pero cualquier disposición factible de las secuencias de proteínas está dentro del alcance de la presente invención.

20 El dominio de anclaje y el dominio terapéutico se pueden disponer de cualquier forma apropiada que permita que el compuesto se una a una membrana de la célula diana o que se una cerca de la misma, de modo que el dominio terapéutico puede mostrar una actividad extracelular que previene o impide la infección de la célula diana con un agente patógeno. El compuesto tendrá preferiblemente al menos un dominio de anclaje a base de péptido o proteína y al menos un dominio terapéutico a base de péptido o proteína. En este caso, los dominios pueden estar dispuestos linealmente a lo largo del esqueleto peptídico en cualquier orden. El dominio de anclaje puede ser N-terminal al dominio terapéutico, o puede ser C-terminal al dominio terapéutico. También es posible tener uno o varios dominios terapéuticos flanqueados por al menos un dominio de anclaje en cada extremo. Como alternativa, uno o varios dominios de anclaje pueden estar flanqueados por al menos un dominio terapéutico en cada extremo. Los enlazadores químicos, o preferiblemente, peptídicos, se pueden emplear opcionalmente para unir algunos o todos los dominios de un compuesto.

30 También es posible tener los dominios en una disposición no lineal, ramificada. Por ejemplo, el dominio terapéutico puede estar fijado a una cadena lateral derivatizada de un aminoácido que forma parte de una cadena polipeptídica, que también incluye, o está ligada a, el dominio de anclaje.

35 Un compuesto de la presente invención puede tener más de un dominio de anclaje. En los casos en los que un compuesto tiene más de un dominio de anclaje, los dominios de anclaje pueden ser iguales o diferentes. Un compuesto de la presente invención puede tener más de un dominio terapéutico. En los casos en los que un compuesto tiene más de un dominio terapéutico, los dominios terapéuticos pueden ser iguales o diferentes. Cuando un compuesto comprende múltiples dominios de anclaje, los dominios de anclaje pueden estar dispuestos en tándem (con o sin enlazadores) o en lados alternos de otros dominios, tales como dominios terapéuticos. Cuando un compuesto comprende múltiples dominios terapéuticos, los dominios terapéuticos pueden estar dispuestos en tándem (con o sin enlazadores) o en lados alternos de otros dominios, tales como, pero sin limitación, los dominios de anclaje.

45 Un compuesto a base de péptidos o proteínas de la presente invención se puede preparar mediante cualquier medio adecuado, incluyendo la purificación de proteínas naturales, opcionalmente escindiendo proteolíticamente las proteínas para obtener los dominios funcionales deseados, y conjugando los dominios funcionales con otros dominios funcionales. Los péptidos también se pueden sintetizar químicamente, y opcionalmente conjugar químicamente con otros péptidos o restos químicos. Sin embargo, preferiblemente, un compuesto a base de péptidos o proteínas de la presente invención se prepara modificando genéticamente una construcción de ácido nucleico para que codifique al menos un dominio de anclaje y al menos un dominio terapéutico juntos (con o sin enlazadores de ácidos nucleicos) en un polipéptido continuo. Las construcciones de ácido nucleico, que tienen preferiblemente secuencias de expresión apropiadas, se pueden transfectar en células procariotas o eucariotas, y el compuesto terapéutico a base de proteína se puede expresar en las células y purificarse. Cualquier resto químico deseado se puede conjugar opcionalmente con el compuesto a base de péptidos o proteínas después de la purificación. En algunos casos, las líneas celulares se pueden seleccionar para que expresen el agente terapéutico a base de proteínas por su capacidad para realizar modificaciones post-traduccionales deseables (tales como, pero sin limitación la glicosilación).

Se puede diseñar una gran diversidad de construcciones y sus productos proteicos someterse a ensayo para estudiar actividades deseables (tales como, por ejemplo, una actividad de unión de un dominio de anclaje, o una actividad de unión, catalítica o inhibidora de un dominio terapéutico). Los productos proteicos de construcciones de ácido nucleico también se pueden someter a ensayo para estudiar su eficacia en la prevención u obstaculización de la infección de una célula diana con un agente patógeno. Las pruebas *in vitro* e *in vivo* para estudiar la infectividad de los agentes patógenos son conocidas en la técnica, tales como las descritas en los Ejemplos para la infectividad del virus de la gripe.

#### *Dominio de anclaje*

Tal y como se usa en este documento, un "dominio de anclaje extracelular" o un "dominio de anclaje" es cualquier resto que se puede unir de manera estable a una entidad que se encuentra en o sobre la superficie exterior de una célula diana o está muy próxima a la superficie exterior de una célula diana. Un dominio de anclaje sirve para retener un compuesto de la presente invención en la superficie externa de una célula diana o cerca de la misma.

Un dominio de anclaje extracelular se une preferiblemente a 1) una molécula expresada en la superficie de una célula diana, o a un resto, un dominio o un epítipo de una molécula expresada en la superficie de una célula diana, 2) una entidad química fijada a una molécula expresada en la superficie de una célula diana, o 3) una molécula de la matriz extracelular que rodea una célula diana.

Un dominio de anclaje es preferiblemente un dominio de péptido o proteína (incluyendo un dominio de péptido o proteína modificado o derivatizado), o comprende un resto acoplado a un péptido o una proteína. Un resto acoplado a un péptido o una proteína puede ser cualquier tipo de molécula que puede contribuir a la unión del dominio de anclaje a una entidad en la superficie de la célula diana o cerca de la misma, y es preferiblemente una molécula orgánica, tal como, por ejemplo, ácido nucleico, ácido nucleico peptídico, análogo de ácido nucleico, nucleótido, análogo de nucleótido, molécula orgánica pequeña, polímero, lípidos, esteroides, ácidos grasos, hidratos de carbono, o cualquier combinación de cualquiera de ellos.

Una molécula, un complejo, un dominio o un epítipo que está unido a través de un dominio de anclaje puede ser o no específico de la célula diana. Por ejemplo, un dominio de anclaje puede unirse a un epítipo presente en moléculas sobre la célula diana o en las proximidades de la misma y se produce también en sitios distintos de los que están próximos a la célula diana. En muchos casos, sin embargo, la administración localizada de un compuesto terapéutico de la presente invención restringirá su aparición, principalmente a la superficie de las células diana. En otros casos, una molécula, un complejo, un resto, un dominio o un epítipo unido a través de un dominio de anclaje puede ser específico de un tejido diana o de un tipo de célula diana.

Un tejido diana o un tipo de célula diana incluye los sitios en un cuerpo humano o animal en donde un agente patógeno invade o se amplifica. Por ejemplo, una célula diana puede ser una célula endotelial que puede estar infectada por un agente patógeno. Una composición de la presente invención puede comprender un dominio de anclaje que se puede unir a un epítipo de la superficie celular, por ejemplo, que es específico del tipo de célula endotelial. En otro ejemplo, una célula diana puede ser una célula epitelial y una composición de la presente invención se puede unir a un epítipo presente en la superficie celular de muchos tipos de células epiteliales, o presente en la matriz extracelular de diferentes tipos de células epiteliales. En este caso, el suministro localizado de la composición puede restringir su localización al sitio de las células epiteliales que son dianas del agente patógeno.

Un compuesto para prevenir o tratar una infección mediada por un agente patógeno puede comprender un dominio de anclaje que se puede unir en la superficie de células epiteliales o cerca de las mismas. Por ejemplo, el sulfato de heparán, estrechamente relacionado con la heparina, es un tipo de glicosaminoglicano (GAG) que está presente de forma ubicua en las membranas celulares, incluyendo la superficie del epitelio respiratorio. Muchas proteínas se unen específicamente a la heparina/sulfato de heparán, y las secuencias que se unen a GAG en estas proteínas han sido identificadas (Meyer, FA, King, M y Gelman, RA. (1975) *Biochimica et Biophysica Acta* 392: 223-232; Schauer, S. editor, pág. 233. *Sialic Acids Chemistry, Metabolism and Function*. Springer-Verlag, 1982). Por ejemplo, se ha mostrado que las secuencias que se unen a GAG del factor plaquetario humano 4 (PF4) (SEQ ID NO: 2), la interleucina humana 8 (IL8) (SEQ ID NO: 3), la antitrombina humana III (AT III) (SEQ ID NO: 4), la apoproteína E humana (ApoE) (SEQ ID NO: 5), la proteína celular migratoria asociada a angio humana (AAMP) (SEQ ID NO: 6) o la anfirregulina humana (SEQ ID NO: 7) (Figura 2) tienen una afinidad muy alta (en el intervalo nanomolar) hacia la heparina (Lee, MK y Lander, AD. (1991) *Pro Natl Acad Sci USA* 88:2768-2772; Goger, B, Halden, Y, Rek, A, Mosl, R, Pye, D, Gallagher, J y Kungl, AJ. (2002) *Biochem.* 41:1640-1646; Witt, DP y Lander AD (1994) *Curr Bio* 4:394-400; Weisgraber, KH, Rall, SC, Mahley, RW, Milne, RW y Marcel, Y. (1986) *J Bio Chem* 261:2068-2076). Las secuencias que se unen a GAG de estas proteínas son diferentes de sus secuencias que se unen al receptor, de modo que no inducen las actividades biológicas asociadas con las proteínas de longitud completa o los dominios de unión al receptor. Estas secuencias, u otras secuencias que han sido identificadas o que se identifiquen en el futuro como secuencias que se unen a heparina/sulfato de heparán, o secuencias sustancialmente homólogas a las secuencias que se unen a la heparina/sulfato de heparán identificadas, que tienen actividad de unión a heparina/sulfato de heparán, se pueden utilizar como dominios de anclaje en el epitelio en los compuestos de la presente invención, que se pueden utilizar

para prevenir o tratar, por ejemplo, virus que infectan el epitelio de las vías respiratorias tales como, pero sin limitación virus de la gripe.

5 Un dominio de anclaje se puede unir a un resto que es específico del tipo de célula diana de una especie particular o se puede unir a un resto que se encuentra en el tipo de célula diana de más de una especie. En los casos en los que el dominio de anclaje se puede unir a restos que están presentes en la superficie de células diana de más de una especie, y un virus o un agente patógeno puede infectar a más de una especie, un compuesto terapéutico puede tener utilidad para más de una especie (siempre que el dominio terapéutico también sea eficaz entre las especies pertinentes). Por ejemplo, en el caso de compuestos terapéuticos que se pueden utilizar contra el virus de la gripe, un compuesto terapéutico de la presente invención que tiene un dominio de anclaje que se une a heparina/sulfato de heparán, el compuesto se puede utilizar en mamíferos (incluidos los humanos), así como en aves.

*Dominio terapéutico*

15 Un compuesto de la presente invención incluye al menos un dominio terapéutico que tiene una actividad extracelular que puede prevenir o impedir la infección de una célula con un agente patógeno, puede modular la respuesta inmune de un sujeto, o puede mejorar la eficacia de la transducción de un virus recombinante. La actividad terapéutica puede ser, como ejemplos no limitantes, una actividad de unión, una actividad catalítica o una actividad inhibitoria. En algunas realizaciones de la presente invención, la actividad terapéutica actúa para modificar o inhibir una función del agente patógeno que contribuye a la infectividad de la célula a través del agente patógeno. En otras realizaciones, un dominio terapéutico puede modificar o inhibir la función de la célula diana o del organismo diana.

25 Por ejemplo, el dominio terapéutico se puede unir a un receptor sobre una célula diana que es necesario para la unión del agente patógeno a una célula diana. De esta manera, el resto terapéutico puede bloquear la unión del agente patógeno a una célula diana y evitar la infección. Como alternativa, un dominio terapéutico se puede unir a una molécula o a un epítipo sobre un agente patógeno para evitar una interacción de la molécula o del epítipo, con una célula diana que es necesaria para la infección. Un dominio terapéutico también puede tener una actividad catalítica que puede degradar una molécula o un epítipo del agente patógeno o del hospedador, lo que permite o favorece la infección de una célula diana con un hospedador. En otras realizaciones más, un dominio terapéutico puede ser un inhibidor de una actividad que es necesaria para la infección de la célula diana con un agente patógeno. La actividad inhibida puede ser una actividad del organismo hospedador o del agente patógeno.

35 El dominio terapéutico actúa extracelularmente de forma preferible, lo que significa que su actividad que impide la infección, que modula la respuesta inflamatoria o que mejora la transducción, se lleva a cabo en la superficie de la célula diana o en el área inmediata que rodea a la célula diana, incluyendo sitios dentro de la matriz extracelular, espacios intracelulares o espacios luminales de los tejidos.

40 Un dominio terapéutico es preferiblemente un dominio de péptido o proteína (incluyendo un dominio de péptido o proteína modificado o derivatizado), o comprende un resto acoplado a un péptido o una proteína. Un resto acoplado a un péptido o una proteína puede ser cualquier tipo de molécula que puede evitar o impedir la infección de una célula diana con un agente patógeno, y es preferiblemente una molécula orgánica, tal como, por ejemplo, ácido nucleico, ácido nucleico peptídico, análogo de ácido nucleico, nucleótido, análogo de nucleótido, molécula orgánica pequeña, polímero, lípidos, esteroides, ácidos grasos, hidratos de carbono, o cualquier combinación de cualquiera de ellos.

45 Un dominio terapéutico puede ser un péptido o un polipéptido sintético, o puede comprender una molécula sintética que se puede conjugar con un péptido o un polipéptido, puede ser un péptido o una proteína de origen natural, o un dominio de proteína de origen natural. Un dominio terapéutico también puede ser un péptido o una proteína que es sustancialmente homólogo a un péptido o una proteína de origen natural.

50 Un dominio terapéutico puede tener utilidad en una especie particular, o puede prevenir o impedir la infección con un agente patógeno en más de una especie. Por ejemplo, los dominios terapéuticos que inhiben funciones patógenas se pueden utilizar en general en una amplia gama de especies que pueden estar infectadas por el hospedador, mientras que los dominios terapéuticos que interrumpen las interacciones entre hospedador-agente patógeno al interferir con una propiedad del hospedador, pueden ser o no específicos de especie. En muchos casos, los dominios de anclaje y los dominios terapéuticos pueden ser eficaces en más de una especie, por lo que los compuestos de la presente invención se pueden utilizar para promover la salud humana y animal, reduciendo al mismo tiempo la propagación y la extensión del virus a través de hospedadores animales. Por ejemplo, cuando el dominio terapéutico es una sialidasa, una sialidasa que puede escindir más de un tipo de enlace entre un resto de ácido siálico y el resto de una molécula sustrato, en particular, una sialidasa que puede escindir tanto los enlaces alfa(2,6)-Gal como alfa(2,3)-Gal, puede proteger a los seres humanos de infecciones con un amplio espectro de virus de la gripe, incluyendo los virus que se alojan de forma natural en diferentes especies tales como aves, cerdos o caballos.

*Enlazadores*

Un compuesto de la presente invención puede incluir opcionalmente uno o varios enlazadores que se pueden unir a dominios del compuesto. Los enlazadores se pueden utilizar para proporcionar una separación o un plegado óptimo de los dominios de un compuesto. Los dominios de un compuesto unidos por enlazadores pueden ser dominios terapéuticos, dominios de anclaje o cualesquiera otros dominios o restos del compuesto que proporcionan funciones adicionales, tales como mejorar la estabilidad del compuesto, facilitar la purificación, etc. Un enlazador utilizado para unir dominios de compuestos de la presente invención, puede ser un enlazador químico o un enlazador a base de aminoácidos o péptidos. Cuando un compuesto comprende más de un enlazador, los enlazadores pueden ser iguales o diferentes. Cuando un compuesto comprende más de un enlazador, los enlazadores pueden tener la misma longitud o tener longitudes diferentes.

Muchos enlazadores químicos con diversas composiciones, polaridad, reactividad, longitud, flexibilidad y capacidad de escisión son conocidos en la técnica de la química orgánica. Los enlazadores preferidos de la presente invención incluyen enlazadores a base de péptidos o aminoácidos. Los enlazadores peptídicos son bien conocidos en la técnica. Preferiblemente, los enlazadores tienen entre uno y cien aminoácidos de longitud, y más preferiblemente entre uno y treinta aminoácidos de longitud, aunque la longitud no es una limitación en los enlazadores de los compuestos de la presente invención. Preferiblemente, los enlazadores comprenden secuencias de aminoácidos que no interfieren en la conformación y la actividad de los péptidos o proteínas codificados por monómeros de la presente invención. Algunos enlazadores preferidos de la presente invención son aquellos que incluyen el aminoácido glicina. Por ejemplo, enlazadores que tienen la secuencia: (GGGS (SEQ ID NO: 10))<sub>n</sub>, en donde n es un número entero entre 1 y 20, o más preferiblemente entre 1 y 12, se puede utilizar para enlazar los dominios de los compuestos terapéuticos de la presente invención.

La presente invención también comprende moléculas de ácido nucleico que codifican compuestos a base de proteínas de la presente invención que comprenden al menos un dominio terapéutico y al menos un dominio de anclaje. Las moléculas de ácido nucleico pueden tener codones optimizados para la expresión en tipos de células particulares, tales como, por ejemplo, *E. coli* o células humanas. Las moléculas de ácido nucleico de la presente invención que codifican compuestos a base de proteínas de la presente invención, que comprenden al menos un dominio terapéutico y al menos un dominio de anclaje, pueden comprender también otras secuencias de ácido nucleico, incluyendo pero sin limitación secuencias que potencian la expresión génica. Las moléculas de ácido nucleico pueden estar en vectores, tales como, pero sin limitación, vectores de expresión.

#### Composición que comprende al menos un dominio de anclaje y al menos un inhibidor de proteasa

En algunos aspectos de la presente invención, un dominio terapéutico que tiene una actividad extracelular que puede evitar la infección de una célula con un patógeno es un inhibidor de proteasa. El inhibidor de proteasa puede ser cualquier tipo de entidad química, tal como, por ejemplo, un carbohidrato o polímero, pero es preferentemente una proteína o un péptido que inhibe la actividad de una enzima. Preferentemente, el inhibidor de proteasa inhibe la actividad de una enzima que procesa al menos parcialmente al menos un patógeno o una proteína de célula hospedadora, donde el procesamiento de la proteína del patógeno o la célula hospedadora es necesario para infectividad de patógenos. La enzima que puede procesar una proteína vírica necesaria para infectividad de patógeno puede ser una enzima de patógeno, o una enzima que se origina del organismo hospedador. Preferentemente, la enzima de procesamiento actúa en o cerca de la superficie de la célula diana, de modo que un compuesto de la presente invención que se ancla en o cerca de la superficie de una célula diana puede inhibir eficazmente la actividad de la enzima.

Pueden usarse compuestos de la presente invención que comprenden dominios inhibidores de proteasa para inhibir la infección por cualquier patógeno que requiera una proteasa en su ciclo vital, en el que la proteasa está activa en o cerca de la superficie de la célula hospedadora. Estas composiciones basadas en proteínas pueden tener, por ejemplo, una de las siguientes estructuras:

(dominio de anclaje)<sub>n</sub>-enlazador-(inhibidor de proteasa)<sub>n</sub> (n=1, 2, 3 o más)

o:

(inhibidor de proteasa)<sub>n</sub>-enlazador-(dominio de anclaje)<sub>n</sub> (n=1, 2, 3 o más)

El inhibidor de proteasa puede ser una forma monomérica de un péptido o polipéptido o puede ser múltiples copias del mismo polipéptido que se unen directamente o con secuencia de separación entre ellas. Como alternativa, pueden unirse diferentes inhibidores de proteasa a base de polipéptidos diferentes entre sí, tales como, por ejemplo, aprotinina unido con inhibidor de proteasa de soja como dominios funcionales inhibidores de proteasa. Los polipéptidos o péptidos pueden unirse directamente o mediante un espaciador compuesto de secuencia de enlazador peptídico. El dominio de anclaje puede ser cualquier péptido o polipéptido que puede unirse en o cerca de la superficie de células diana.

El inhibidor de proteasa puede ser un inhibidor de proteasa de origen natural (o una parte activa del mismo) o puede ser un inhibidor de proteasa modificado técnicamente. Un inhibidor de péptido proteasa usado en un compuesto de la presente invención puede tener una secuencia sustancialmente homóloga de un inhibidor de proteasa de origen

natural, que tiene una o más supresiones, adiciones o sustituciones conservando al mismo tiempo la actividad, o conservando sustancialmente la misma actividad, del inhibidor de proteasa de origen natural.

5 En una realización preferida de la presente invención, un compuesto terapéutico de la presente invención es para la prevención y el tratamiento de la gripe en seres humanos, y el dominio terapéutico es un inhibidor de proteasa peptídico o proteico que puede inhibir una serina proteasa que puede escindir la proteína precursora de hemaglutinina del virus de la gripe HAO en HA1 y HA2.

10 Se ha mostrado que varios inhibidores de serina proteasa reducen la escisión de HA y activación del virus de la gripe en células cultivadas, en embriones de pollo y en pulmones de ratones infectados. Incluyen muchos de los inhibidores de tripsina usados habitualmente, tales como: aprotinina (Zhirnov OP, Ikizler MR y Wright PF. (2002) J Virol 76:8682-8689), leupeptina (Zhirnov OP, Ikizler MR y Wright PF. (2002) J Virol 76:8682-8689; Tashiro M, Klenk HD y Rott R. (1987) J Gen Virol 68:2039-2043), inhibidor de proteasa de soja (Barbey-Morel CL, Oeltmann TN, Edwards KM y Wright PF. (1987) J Infect Dis 155:667-672), ácido e-aminocaproico (Zhirnov OP, Ovcharenko AV y Bukrinskaya AG. 1982. Arch Virol 73:263-272) y clorometilcetona de n-p-tosil-L-lisina (TLCK) (Barbey-Morel CL, Oeltmann TN, Edwards KM y Wright PF. (1987) J Infect Dis 155:667-672). Entre estos, la inhalación de aerosol de aprotinina ha mostrado efectos terapéuticos definitivos contra bronconeumonía gripal y paragripal en ratones (Zhirnov OP, Ovcharenko AV y Bukrinskaya AG. (1984) J Gen Virol 65:191-196; Zhirnov OP, Ovcharenko AV y Bukrinskaya AG. (1985) J Gen Virol 66:1633-1638; Zhirnov OP. (1987) J Med Virol 21:161-167; Ovcharenko AV y Zhirnov OP. (1994) Antiviral Res 23:107-118) así como en seres humanos (Zhirnov OP. (1983) Problems Virol. 4:9-12 (en ruso)).

25 La aprotinina (SEQ ID NO: 1; Figura 1) es un inhibidor polipeptídico de 58 aminoácidos (también denominado Trasylol o inhibidor de tripsina pancreática bovina (BPTI)). Un compuesto de la presente invención puede tener uno o más dominios de aprotinina; por ejemplo, una composición terapéutica de la presente invención puede tener de uno a seis polipéptidos de aprotinina, más preferentemente de uno a tres polipéptidos de aprotinina. Un compuesto de la presente invención también puede tener un dominio terapéutico que comprende un polipéptido o péptido que tiene homología sustancial con la secuencia de aminoácidos de aprotinina.

30 Un compuesto para prevenir o tratar la gripe que comprende un inhibidor de proteasa comprende preferentemente un dominio de anclaje que puede unirse en o cerca de la superficie de células epiteliales. En algunas realizaciones preferidas, el dominio de anclaje al epitelio es una secuencia de unión a GAG de una proteína humana, tal como, por ejemplo, la secuencia de unión a GAG de factor plaquetario humano 4 (PF4) (SEQ ID NO: 2), interleucina 8 humana (IL8) (SEQ ID NO: 3), antitrombina III humana (AT III) (SEQ ID NO: 4), apoproteína E humana (ApoE) (SEQ ID NO: 5), proteína de célula migratoria angioasociada humana (AAMP) (SEQ ID NO: 6) o anfiregulina humana (SEQ ID NO: 7) (Figura 2). Un compuesto de la presente invención también puede tener un dominio de anclaje que comprende un polipéptido o péptido que tiene homología sustancial con las secuencias de aminoácidos de los dominios de unión a GAG en SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6 y SEQ ID NO:7.

40 Clínicamente, un fármaco que comprende aprotinina y un dominio de anclaje epitelial puede administrarse por inhalación de aerosol para cubrir el tracto respiratorio completo para prevenir y tratar bronconeumonía causada por virus de la gripe, o cualquier otro virus, tal como virus paragripal, que requiere serina proteasas en su ciclo vital. Como alternativa, puede administrarse una proteína de fusión de domino de anclaje epitelial/aprotinina como pulverización nasal para tratar casos de gripe de estadio temprano sencillos. Además, una proteína de fusión de dominio de anclaje epitelial/aprotinina puede usarse como una profilaxis para gripe u otras infecciones víricas antes de que se produzca una infección.

#### Composición que comprende al menos un dominio de anclaje y al menos una actividad catalítica

50 En algunos aspectos de la presente invención, un dominio terapéutico que tiene una actividad extracelular que puede prevenir la infección de una célula con un agente patógeno, es una actividad catalítica. La actividad enzimática puede ser una actividad catalítica que retira, degrada o modifica una molécula o un complejo hospedador o una molécula o un complejo patógeno que contribuye a la infectividad del patógeno. Preferentemente la molécula o el complejo hospedador o la molécula o el complejo patógeno que se retira, degrada o modifica por la actividad enzimática de un compuesto de la presente invención está sobre, en o cerca de la superficie de una célula diana, de modo que un compuesto de la presente invención que está anclado a la superficie de una célula diana puede inhibir eficazmente la molécula o el complejo hospedador o patógeno.

60 Por ejemplo, un dominio terapéutico puede tener una actividad catalítica que puede digerir una molécula o un epítipo de la célula patógena o diana que se requiere para la unión del hospedador-patógeno, y posterior entrada del patógeno en la célula diana. Los receptores en células diana que permiten la entrada de virus en células pueden ser la diana de una actividad enzimática de un compuesto de la presente invención.

65 Los compuestos de la presente invención que comprenden dominios catalíticos se pueden utilizar para inhibir una infección con cualquier agente patógeno que utiliza un receptor para conseguir entrar en una célula diana, siempre y cuando la eliminación del receptor no ponga en peligro el organismo. Estas composiciones a base de proteínas pueden tener, por ejemplo, una de las siguientes estructuras:

(Dominio de anclaje)n-[enlazador]-(Actividad Enzimática)n (n = 1, 2, 3 o más)  
o:  
(Actividad enzimática)n (n = 1, 2, 3 o más)-[enlazador]-(Dominio de Anclaje)n,

5 en donde los enlazadores son opcionales.

La actividad enzimática puede ser una forma monomérica de un péptido o polipéptido o puede haber múltiples copias del mismo polipéptido que están unidas directamente o que tienen una secuencia espaciadora intercalada. Los polipéptidos o péptidos pueden estar unidos directamente o a través de un espaciador, compuesto por la secuencia del enlazador peptídico. El dominio de anclaje puede ser cualquier péptido o polipéptido que se puede unir o que está cerca de la superficie de las células diana.

En una realización preferida de la presente invención, un dominio terapéutico comprende una sialidasa que puede eliminar o reducir en gran medida el nivel de ácido siálico en la superficie de células epiteliales. El ácido siálico es un receptor de los virus de la gripe. Por lo tanto, tratar la superficie de las células epiteliales respiratorias con una sialidasa puede prevenir infecciones de gripe o interrumpir infecciones tempranas. El dominio terapéutico puede comprender una proteína sialidasa completa, o una parte activa de la misma. El ácido siálico es un receptor para el virus de la gripe, y al menos uno de los receptores para el virus paragripal, algunos coronavirus y rotavirus, *Streptococcus pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Helicobacter pylori*. Por lo tanto, tratar la superficie de células epiteliales respiratorias con una sialidasa puede evitar la gripe u otras infecciones víricas, o interrumpir las infecciones tempranas, así como evitar o reducir una colonización de bacterias tales como *Streptococcus pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis* y *Pseudomonas aeruginosa*. El tratamiento de las células epiteliales gastrointestinales con una sialidasa puede prevenir o reducir la colonización de *Helicobacter pylori* en el estómago.

El ácido siálico también media en la adhesión celular y en las interacciones entre células inflamatorias y células diana. Por lo tanto, tratar la superficie de las células epiteliales respiratorias con una sialidasa puede evitar el reclutamiento de células inflamatorias a la superficie de las vías respiratorias y, por lo tanto, se pueden tratar reacciones alérgicas incluyendo el asma y la rinitis alérgica.

Puesto que el ácido siálico sirve como una barrera que impide la entrada a las células de un vector de terapia génica, el tratamiento de las células diana con una sialidasa puede aumentar la eficacia de la transducción y, por lo tanto, mejorar la eficacia de la terapia génica.

Las sialidasas preferidas son las sialidasas bacterianas grandes que pueden degradar los ácidos siálicos Neu5Ac alfa(2,6)-Gal y Neu5Ac alfa(2,3)-Gal de los receptores. Por ejemplo, pueden usarse las enzimas sialidasas bacterianas de *Clostridium perfringens* (número de orden de Genbank X87369), *Actinomyces viscosus*, *Arthrobacter ureafaciens* o *Micromonospora viridifaciens* (número de orden de GenBank D01045). Los dominios terapéuticos de los compuestos de la presente invención pueden comprender toda o una porción de la secuencia de aminoácidos de una sialidasa bacteriana grande o pueden comprender secuencias de aminoácidos que son sustancialmente homólogas a toda o una porción de la secuencia de aminoácidos de una sialidasa bacteriana grande. En una realización preferida, un dominio terapéutico comprende una sialidasa codificada por *Actinomyces viscosus*, tal como la de SEQ ID NO: 12, o tal como secuencia de sialidasa sustancialmente homóloga de SEQ ID NO: 12. En otra realización preferida más, un dominio terapéutico comprende el dominio catalítico de la sialidasa de *Actinomyces viscosus* que se extiende desde los aminoácidos 274-666 de SEQ ID NO: 12, o una secuencia sustancialmente homóloga.

Otras sialidasas preferidas son las sialidasas humanas, tales como las codificadas por los genes NEU2 (SEQ ID NO: 8; número de orden de Genbank Y16535; Monti, E, Preti, Rossi, E., Ballabio, A y Borsani G. (1999) Genomics 57:137-143) y NEU4 (SEQ ID NO:9; número de orden de Genbank NM080741; Monti, E, Preti, A, Venerando, B y Borsani, G. (2002) Neurochem Res 27:646-663) (Figura 3). Los dominios terapéuticos de compuestos de la presente invención pueden comprender todas o una parte de las secuencias de aminoácidos de una sialidasa humana o pueden comprender secuencias de aminoácidos que son sustancialmente homólogas de toda o una parte de las secuencias de aminoácidos de una sialidasa humana. Preferentemente, cuando un dominio terapéutico comprende una parte de las secuencias de aminoácidos de una sialidasa de origen natural o secuencias sustancialmente homólogas a de una parte de las secuencias de aminoácidos de una sialidasa de origen natural, la parte comprende esencialmente la misma actividad que la sialidasa humana.

Un compuesto para la prevención o el tratamiento de la gripe que comprende un dominio enzimático, preferentemente comprende un dominio de anclaje que se puede unir a la superficie de las células epiteliales o cerca de las mismas. En algunas realizaciones preferidas, el dominio de anclaje a epitelio es una secuencia que se une a GAG procedente de una proteína humana, tal como, por ejemplo, las secuencias de aminoácidos que se unen a GAG del factor plaquetario humano 4 (PF4) (SEQ ID NO: 2), interleucina humana 8 (IL8) (SEQ ID NO: 3), antitrombina III humana (AT III) (SEQ ID NO: 4), apoproteína E humana (ApoE) (SEQ ID NO: 5), proteína de célula migratoria angioasociada humana (AAMP) (SEQ ID NO: 6) y anfirregulina humana (SEQ ID NO: 7) (Figura 2). Un dominio de anclaje epitelial puede ser también sustancialmente homólogo de una secuencia de unión a GAG de origen natural, tal como los enumerados en la Figura 2.

También está dentro del alcance de la presente invención el uso de compuestos que comprenden una sialidasa humana, o que comprenden una sialidasa con homología sustancial con una sialidasa, en ausencia de un dominio de anclaje, en el tratamiento o la prevención de infecciones con agentes patógenos, tales como, pero sin limitación infecciones con el virus de la gripe, paramixovirus, coronavirus, rotavirus y *Pseudomonas aeruginosa* o infecciones bacterianas; en el tratamiento o la prevención de respuestas alérgicas e inflamatorias, y para mejorar la eficacia de la transducción de un virus recombinante.

La presente invención reconoce que tales infecciones se pueden prevenir o reducir mediante el uso de sialidasas, tales como, pero sin limitación, la sialidasa de *A. viscosus* o sialidasas humanas tales como NEU2 y NEU4. Las sialidasas se pueden adaptar opcionalmente, mediante modificaciones genéticas o químicas, o mediante una formulación farmacéutica, para mejorar su semivida o la retención en el epitelio respiratorio.

Debido a que los virus de la gripe infectan principalmente el tracto respiratorio superior, la eliminación del receptor del ácido siálico localmente en el área de la cavidad nasal y la nasofaringe puede prevenir infecciones o interrumpir las infecciones tempranas. La sialidasa se puede suministrar a las vías respiratorias superiores como un aerosol nasal, y se puede utilizar ya sea de modo terapéutico durante la etapa temprana de la gripe (u otra infección) o de modo profiláctico antes de que ocurra la infección. Como alternativa, se puede administrar en el tracto respiratorio inferior por inhalación para el tratamiento de la gripe y para prevenir las complicaciones de la gripe, tales como bronconeumonía.

## II. Composición terapéutica que comprende al menos una actividad sialidasa

La presente invención incluye una composición terapéutica que comprende al menos una actividad sialidasa. La actividad sialidasa puede ser una sialidasa aislada de cualquier fuente, tal como, por ejemplo, una fuente bacteriana o de mamífero, o puede ser una proteína recombinante que es sustancialmente homóloga de al menos una parte de una sialidasa de origen natural. Son sialidasas preferidas las sialidasas bacterianas grandes que pueden degradar los ácidos siálicos de receptor Neu5Ac alfa(2,6)-Gal y Neu5Ac alfa(2,3)-Gal. Por ejemplo, pueden usarse las enzimas sialidasa bacterianas de *Clostridium perfringens* (Número de referencia de Genbank X87369), *Actinomyces viscosus* (Número de referencia de Genbank L06898), *Arthrobacter ureafaciens* o *Micromonospora viridifaciens* (Número de referencia de Genbank D01045) o sustancialmente proteínas homólogas.

Por ejemplo, los compuestos terapéuticos de la presente invención pueden comprender una sialidasa bacteriana grande o pueden comprender una proteína con la secuencia de aminoácidos de una sialidasa bacteriana grande o pueden comprender secuencias de aminoácidos que son sustancialmente homólogas de la secuencia de aminoácidos de una sialidasa bacteriana grande o pueden comprender secuencias de aminoácidos que son sustancialmente homólogas de la secuencia de aminoácidos de una sialidasa bacteriana grande. Una composición farmacéutica preferida de la presente invención comprende la sialidasa de *A. viscosus* (SEQ ID NO: 12), o comprende una proteína sustancialmente homóloga de la sialidasa de *A. viscosus*.

Otras sialidasas preferidas son las sialidasas humanas tales como las codificadas por los genes NEU2 (SEQ ID NO: 8; Número de referencia de Genbank Y16535; Monti, E, Preti, Rossi, E., Ballabio, A y Borsani G. (1999) Genomics 57:137-143) y NEU4 (SEQ ID NO: 9; Número de referencia de Genbank NM080741; Monti, E, Preti, A, Venerando, B y Borsani, G. (2002) Neurochem Res 27:646-663) (Figura 3). Los dominios terapéuticos de compuestos de la presente invención pueden comprender una proteína sialidasa humana que es sustancialmente homóloga de las secuencias de aminoácidos de una sialidasa humana o pueden comprender secuencias de aminoácidos que son sustancialmente homólogas de todas o una parte de las secuencias de una sialidasa humana. Preferiblemente, cuando un dominio terapéutico comprende una porción de las secuencias de aminoácidos de una sialidasa de origen natural, o secuencias sustancialmente homólogas a una porción de las secuencias de aminoácidos de una sialidasa de origen natural, la porción comprende esencialmente la misma actividad que la sialidasa humana.

Una composición farmacéutica que comprende una sialidasa puede incluir otros compuestos, incluyendo pero sin limitación otras proteínas, que también pueden tener actividad terapéutica. Una composición farmacéutica que comprende una sialidasa puede incluir otros compuestos que pueden mejorar la estabilidad, la solubilidad, el empaquetamiento, el suministro, la consistencia, el sabor o la fragancia de la composición.

Una composición farmacéutica que comprende una sialidasa puede estar formulada para administración por vía nasal, traqueal, bronquial, oral o tópica, o se puede formular como una solución inyectable o como gotas para los ojos. Una composición farmacéutica que comprende una sialidasa se puede utilizar para tratar o prevenir una infección con agentes patógenos, para tratar o prevenir una alergia o una respuesta inflamatoria, o para mejorar la eficacia de la transducción de un virus recombinante para terapia génica.

## III. Proteínas del dominio catalítico de sialidasa

La presente invención también incluye proteínas del dominio catalítico de sialidasa. Tal como se usa en el presente documento, una "proteína del dominio catalítico de sialidasa" comprende un dominio catalítico de una sialidasa, pero no comprende la secuencia de aminoácidos completa de la sialidasa a partir de la cual se ha obtenido el dominio catalítico. Una proteína del dominio catalítico de sialidasa tiene actividad sialidasa. Preferiblemente, una proteína del dominio catalítico de sialidasa comprende al menos 10 %, al menos 20 %, al menos 50 %, al menos 70 % de la actividad de la sialidasa a partir de la cual se ha obtenido la secuencia del dominio catalítico. Más preferiblemente, una proteína del dominio catalítico de sialidasa comprende al menos 90 % de la actividad de la sialidasa a partir de la cual se ha obtenido la secuencia del dominio catalítico.

Una proteína del dominio catalítico de sialidasa puede incluir otras secuencias de aminoácidos, tales como, pero sin limitación secuencias de sialidasa adicionales, secuencias obtenidas a partir de otras proteínas o secuencias que no se han obtenido a partir de secuencias de proteínas de origen natural. Las secuencias de aminoácidos adicionales pueden realizar cualquiera entre una serie de funciones, incluyendo aportar otras actividades a la proteína del dominio catalítico, mejorar la expresión, procesamiento, plegamiento o estabilidad de la proteína del dominio catalítico de sialidasa, o incluso proporcionar un tamaño deseable o un espaciador de la proteína.

Una proteína del dominio catalítico de sialidasa preferido es una proteína que comprende el dominio catalítico de la sialidasa de *A. viscosus*. Preferentemente, una proteína de dominio catalítico de sialidasa de *A. viscosus* comprende los aminoácidos 270-666 de la secuencia de sialidasa de *A. viscosus* (SEQ ID NO: 12). Preferentemente, una proteína de dominio catalítico de sialidasa de *A. viscosus* comprende una secuencia de aminoácidos que comienza en cualquiera de los aminoácidos del aminoácido 270 al aminoácido 290 de la secuencia de sialidasa de *A. viscosus* (SEQ ID NO: 12) y termina en cualquiera de los aminoácidos del aminoácido 665 al aminoácido 907 de dicha secuencia de sialidasa de *A. viscosus* (SEQ ID NO: 12) y carece de cualquier secuencia de proteína de sialidasa de *A. viscosus* que se extiende del aminoácido 1 al aminoácido 269. (Como se usa en el presente documento "carece de cualquier secuencia de proteína de sialidasa de *A. viscosus* que se extiende del aminoácido 1 al aminoácido 269" significa que carece de cualquier tramo de cuatro o más aminoácidos consecutivos como aparecen en la secuencia de aminoácidos o proteína designada).

En algunas realizaciones preferidas, una proteína del dominio catalítico de sialidasa de *A. viscosus* comprende los aminoácidos 274-681 de la secuencia de sialidasa de *A. viscosus* (SEQ ID NO: 12) y carece de otra secuencia de la sialidasa de *A. viscosus*. En algunas realizaciones preferidas, una proteína del dominio catalítico de sialidasa de *A. viscosus* comprende los aminoácidos 274-666 de la secuencia de sialidasa de *A. viscosus* (SEQ ID NO: 12) y carece de cualquier otra secuencia de sialidasa de *A. viscosus*. En algunas realizaciones preferidas, una proteína del dominio catalítico de sialidasa de *A. viscosus* comprende los aminoácidos 290-666 de la secuencia de sialidasa de *A. viscosus* (SEQ ID NO: 12) y carece de cualquier otra secuencia de la sialidasa de *A. viscosus*. En aún otras realizaciones preferidas, una proteína del dominio catalítico de sialidasa de *A. viscosus* comprende los aminoácidos 290-681 de la secuencia de sialidasa de *A. viscosus* (SEQ ID NO: 12) y carece de cualquier otra secuencia de sialidasa de *A. viscosus*.

La presente invención también comprende moléculas de ácido nucleico que codifican compuestos a base de proteínas de la presente invención que comprenden un dominio catalítico de una sialidasa. Las moléculas de ácido nucleico pueden tener codones optimizados para la expresión en tipos de células particulares, tales como, por ejemplo *E. coli* o células humanas. Las moléculas de ácido nucleico de la presente invención que codifican los compuestos a base de proteínas de la presente invención, que comprenden al menos un dominio catalítico de una sialidasa, también pueden comprender otras secuencias de ácido nucleico, incluyendo pero sin limitación secuencias que potencian la expresión génica. Las moléculas de ácido nucleico pueden estar en vectores, tales como, pero sin limitación vectores de expresión.

#### *Proteínas de fusión*

Las proteínas del dominio catalítico de sialidasa pueden ser proteínas de fusión, en las que la proteína de fusión comprende al menos un dominio catalítico de sialidasa y al menos otro dominio proteico, incluyendo pero sin limitación: un dominio de purificación, un marcador proteico, un dominio proteico de estabilidad, un dominio de solubilidad, un dominio proteico de tamaño creciente, un dominio proteico de plegamiento, un dominio proteico de localización, un dominio de anclaje, un dominio N terminal, un dominio C terminal, un dominio de actividad catalítica, un dominio de unión o un dominio potenciador de la actividad catalítica. Preferentemente, el al menos otro dominio proteico deriva de otra fuente, tal como, pero sin limitación, secuencias de otra proteína. No es necesario que el al menos otro dominio proteico se base en ninguna secuencia proteica conocida, pero puede modificarse técnicamente y ensayarse empíricamente para realizar cualquier función en la proteína de fusión.

Los dominios de purificación pueden incluir, como ejemplos no limitantes, uno o más de un marcador de his, un dominio de unión a calmodulina, un dominio proteico de unión a maltosa, un dominio de estreptavidina, un dominio de unión a estreptavidina, un dominio de ínterna o un dominio de unión a quitina. Los marcadores proteicos pueden comprender secuencias que pueden usarse para detección de proteínas por anticuerpos, tales como, por ejemplo, el marcador myc, el marcador de hemaglutinina o el marcador FLAG. Los dominios proteicos que potencia la expresión, la modificación, el plegamiento, la estabilidad, el tamaño o la localización pueden basarse en secuencias de proteínas



conocidas o modificarse técnicamente. Otros dominios proteicos pueden tener actividad de unión o catalítica o potenciar la actividad catalítica del dominio catalítico de sialidasa.

5 Las proteínas de fusión de la presente invención comprenden al menos un dominio catalítico de sialidasa y al menos un dominio de anclaje. Los dominios de anclaje preferidos incluyen dominios de unión a GAG, tales como el dominio de unión a GAG de la anfirregulina humana (SEQ ID NO: 7).

10 Los dominios catalíticos sialidasa y otros dominios de una proteína de fusión de la presente invención, se pueden unir opcionalmente mediante enlazadores, tales como, pero sin limitación enlazadores peptídicos. Una variedad de enlazadores peptídicos son conocidos en la técnica. Un enlazador preferido es un enlazador peptídico que comprende glicina, tal como G-G-G-G-S (SEQ ID NO: 10).

15 La presente invención también comprende moléculas de ácido nucleico que codifican proteínas de fusión de la presente invención que comprenden un dominio catalítico de una sialidasa. Las moléculas de ácido nucleico pueden tener codones optimizados para la expresión en tipos de células particulares, tales como, por ejemplo, *E. coli* o células humanas. Las moléculas de ácido nucleico de la presente invención que codifican proteínas de fusión de la presente invención, también pueden comprender otras secuencias de ácido nucleico, incluyendo pero sin limitación secuencias que potencian la expresión génica. Las moléculas de ácido nucleico pueden estar en vectores, tales como, pero sin limitación vectores de expresión.

20 IV Composiciones farmacéuticas

25 La presente invención incluye compuestos de la presente invención formulados como composiciones farmacéuticas. Las composiciones farmacéuticas comprenden un vehículo farmacéuticamente aceptable preparado para el almacenamiento y preferiblemente para la administración posterior, que tiene una cantidad farmacéuticamente eficaz del compuesto en un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable. Los vehículos o diluyentes aceptables para uso terapéutico son bien conocidos en la técnica farmacéutica, y se describen, por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª ed., Mack Publishing Co., Easton, PA (1990)). Los agentes conservantes, estabilizantes, colorantes e incluso aromatizantes se pueden proporcionar en la composición farmacéutica. Por ejemplo, benzoato de sodio, ácido sórbico y ésteres del ácido p-hidroxibenzoico se pueden añadir como conservantes. Además, se pueden utilizar antioxidantes y agentes de suspensión.

35 Dependiendo de la célula diana, los compuestos de la presente invención se pueden formular y utilizar como comprimidos, cápsulas o elixires para administración oral; pomadas o ungüentos para aplicación tópica; supositorios para administración rectal; soluciones estériles, suspensiones y similares para uso por inhalación o aerosoles nasales. Los compuestos inyectables también se pueden preparar en formas convencionales, ya sea como soluciones o como suspensiones líquidas, formas sólidas adecuadas para solución o suspensión en líquido antes de la inyección, o como emulsiones. Los excipientes adecuados son, por ejemplo, agua, solución salina, dextrosa, manitol, lactosa, lecitina, albúmina, glutamato de sodio, clorhidrato de cisteína y similares. Además, si se desea, las composiciones farmacéuticas inyectables pueden contener cantidades menores de sustancias auxiliares no tóxicas, tales como agentes humectantes, agentes de tamponamiento del pH y similares.

45 La cantidad farmacéuticamente eficaz de un compuesto del ensayo requerida como una dosis dependerá de la vía de administración, el tipo de animal o paciente que se está tratando y las características físicas del animal específico que está en consideración. La dosis se puede ajustar para conseguir un efecto deseado, pero dependerá de factores tales como el peso, la dieta, la medicación simultánea y otros factores que reconocerán los expertos en las técnicas médicas. En la puesta en práctica de los métodos de la presente invención, las composiciones farmacéuticas se pueden usar solas o en combinación con otras, o en combinación con otros agentes terapéuticos o de diagnóstico. Estos productos pueden utilizarse *in vivo*, preferiblemente en un paciente mamífero, preferiblemente en un ser humano, o *in vitro*. Al emplearlos *in vivo*, las composiciones farmacéuticas se pueden administrar al paciente a través de una variedad de vías, incluyendo la vía tópica, parenteral, intravenosa, subcutánea, intramuscular, colónica, rectal, nasal o intraperitoneal, empleando una variedad de formas de dosificación. Tales métodos también se pueden utilizar en el ensayo de la actividad de los compuestos del ensayo *in vivo*.

55 En realizaciones preferidas, estas composiciones farmacéuticas pueden estar en forma de suspensiones, soluciones, comprimidos o pastillas administrables por vía oral; aerosoles nasales; inhalaciones; inyectables, aerosoles tópicos, pomadas, polvos o geles.

60 Cuando se administran por vía oral como una suspensión, las composiciones de la presente invención se preparan de acuerdo con técnicas bien conocidas en la técnica de la formulación farmacéutica y pueden contener celulosa microcristalina para impartir volumen, ácido alginico o alginato sódico como agente de suspensión, metilcelulosa como un potenciador de la viscosidad, y edulcorantes/agentes aromatizantes conocidos en la técnica. Como comprimidos de liberación inmediata, estas composiciones pueden contener celulosa microcristalina, fosfato dicálcico, almidón, estearato de magnesio y lactosa y/u otros excipientes, aglutinantes, extensores, disgregantes, diluyentes y lubricantes conocidos en la técnica. Los componentes de la formulación de un enjuague bucal o un enjuague incluyen agentes

65

antimicrobianos, tensioactivos, cotensioactivos, aceites, agua y otros aditivos tales como edulcorantes/agentes aromatizantes conocidos en la técnica.

5 Cuando se administra a través de una solución para beber, la composición comprende uno o varios de los compuestos de la presente invención, disueltos en agua, con un ajuste de pH apropiado y con un vehículo. El compuesto puede estar disuelto en agua destilada, agua del grifo, agua mineral y similares. El pH se puede ajustar preferentemente entre aproximadamente 3,5 y aproximadamente 8,5. Los edulcorantes se pueden añadir, por ejemplo, 1 % (p/v) de sacarosa.

10 Las grageas se pueden preparar de acuerdo con el documento de Patente de EE.UU. n.º 3.439.089, incorporado en el presente documento por referencia para estos fines.

15 Cuando se administran mediante aerosol nasal o inhalación, las composiciones farmacéuticas se preparan de acuerdo con métodos bien conocidos en la técnica de la formulación farmacéutica y se pueden preparar como soluciones en solución salina, empleando alcohol bencílico u otros conservantes adecuados, promotores de la absorción para potenciar la biodisponibilidad, fluorocarbonos y/u otros agentes solubilizantes o dispersantes conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Ansel, H. C. *et al.*, *Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems*, sexta ed. (1995). Preferiblemente, estas composiciones y formulaciones se preparan con ingredientes no tóxicos farmacéuticamente aceptables, adecuados. Estos ingredientes son conocidos por los expertos en la preparación de formas de dosificación nasales y algunos de estos se pueden encontrar en Remington's *Pharmaceutical Sciences*, 18ª ed., Mack Publishing Co., Easton, PA (1990, una referencia convencional en el campo). La elección de vehículos adecuados es muy dependiente de la naturaleza exacta de la forma de dosificación nasal deseada, por ejemplo, soluciones, suspensiones, pomadas o geles. Las formas de dosificación nasal generalmente contienen grandes cantidades de agua además del ingrediente activo. También pueden estar presentes cantidades menores de otros ingredientes tales como ajustadores de pH, emulsionantes o agentes dispersantes, conservantes, agentes tensioactivos, agentes gelificantes o de tamponamiento y otros agentes estabilizantes y solubilizantes. Preferiblemente, la forma de dosificación nasal debería ser isotónica con las secreciones nasales.

20 Las formulaciones nasales se pueden administrar en forma de gotas, pulverizaciones, aerosoles o por medio de cualquier otra forma de dosificación intranasal. Opcionalmente, el sistema de suministro puede ser un sistema de administración de una dosis unitaria. El volumen de la solución o la suspensión liberada por dosis puede ser preferiblemente cualquiera desde aproximadamente 5 a aproximadamente 2000 microlitros, más preferiblemente desde aproximadamente 10 a aproximadamente 1000 microlitros, y aún más preferiblemente desde aproximadamente 50 a aproximadamente 500 microlitros. Los sistemas de liberación para estas diversas formas de dosificación pueden ser frascos con cuentagotas, unidades de compresión de plástico, atomizadores, nebulizadores o aerosoles farmacéuticos ya sea en dosis unitaria o en envases con dosis múltiples.

25 Las formulaciones de esta invención se pueden variar para incluir; (1) otros ácidos y bases para ajustar el pH; (2) otros agentes que imparten tonicidad tales como sorbitol, glicerina y dextrosa; (3) otros conservantes antimicrobianos tales como otros ésteres de ácidos parahidroxí benzoicos, sorbato, benzoato, propionato, clorobutanol, alcohol feniletílico, cloruro de benzalconio y mercuriales; (4) otros agentes que imparten viscosidad, tales como carboximetilcelulosa de sodio, celulosa microcristalina, polivinilpirrolidona, poli(alcohol vinílico) y otras gomas; (5) potenciadores de la absorción adecuados; (6) agentes estabilizantes tales como antioxidantes, como bisulfito y ascorbato, agentes quelantes de metales, tales como edetato de sodio y potenciadores de la solubilidad del fármaco tales como polietilenglicoles.

#### V. Método de prevención o tratamiento de la infección con un agente patógeno

30 La presente invención también incluye métodos para prevenir o tratar una infección con un agente patógeno. En un aspecto, el método incluye: tratar a un sujeto que está infectado con un agente patógeno o que tiene riesgo de ser infectado con un agente patógeno, con una composición farmacéutica de la presente invención que comprende un compuesto que comprende al menos un dominio de anclaje que puede anclar el compuesto en la superficie de una célula diana o cerca de la misma y al menos un dominio terapéutico que comprende un péptido o una proteína que tiene al menos una actividad extracelular que puede prevenir la infección de una célula diana con un agente patógeno.

35 En algunas realizaciones preferidas, el método incluye la aplicación de una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica de la presente invención a las células epiteliales de un sujeto. El sujeto que se va a tratar puede ser un sujeto animal o humano.

40 En otro aspecto, el método incluye: tratar a un sujeto que está infectado con un agente patógeno o que tiene riesgo de ser infectado con un agente patógeno, con una composición farmacéutica de la presente invención que comprende un compuesto a base de proteínas que comprende una actividad sialidasa. En algunas realizaciones preferidas, el método incluye la aplicación de una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica de la presente invención a las células epiteliales de un sujeto. La actividad sialidasa puede ser una proteína sialidasa aislada de origen natural, o una proteína recombinante sustancialmente homóloga a al menos una porción de una sialidasa de origen natural. Una composición farmacéutica preferida comprende una sialidasa con homología sustancial a la sialidasa de *A. viscosus* (SEQ ID NO: 12). El sujeto que se va a tratar puede ser un sujeto animal o humano.

En otro aspecto más, el método incluye: tratar a un sujeto que está infectado con un agente patógeno o que tiene riesgo de ser infectado con un agente patógeno, con una composición farmacéutica de la presente invención que comprende un compuesto a base de proteínas que comprende un dominio catalítico de sialidasa. En algunas realizaciones preferidas, el método incluye la aplicación de una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica de la presente invención a las células epiteliales de un sujeto. El dominio catalítico de sialidasa es preferiblemente sustancialmente homólogo al dominio catalítico de una sialidasa de origen natural. Una composición farmacéutica preferida comprende un dominio catalítico de sialidasa con homología sustancial a los aminoácidos 274-666 de la sialidasa de *A. viscosus* (SEQ ID NO: 12). El sujeto que se va a tratar puede ser un sujeto animal o humano.

Un agente patógeno puede ser un agente patógeno vírico, bacteriano o protozoario. En algunas realizaciones, el agente patógeno es uno de los siguientes: virus de la gripe, virus paragripal, virus respiratorio sincitial (VRS), coronavirus, rotavirus, *Streptococcus pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Helicobacter pylori*. En una realización preferida, el agente patógeno es el virus de la gripe.

Los compuestos de la presente invención se pueden diseñar para uso humano o uso animal. En algunos aspectos de la presente invención, un compuesto de la presente invención se puede usar para prevenir una infección con agentes patógenos en una clase de animales, tales como mamíferos. En algunos aspectos de la presente invención, una composición se puede utilizar para uso humano y animal (aunque la formulación puede diferir). En estos aspectos, los dominios activos de un compuesto pueden ser eficaces contra más de una especie, tipo, subtipo o cepa de agente patógeno, y pueden ser activos en más de una especie hospedadora. Por ejemplo, algunos compuestos preferidos de la presente invención que comprenden, por ejemplo, dominios activos, tales como inhibidores de la proteasa que impiden el procesamiento de la proteína HA del virus de la gripe, o sialidasas que eliminan los receptores de ácido siálico de las células diana, o dominios de anclaje, tales como dominios que se unen a la heparina o al sulfato de heparán, se pueden utilizar en aves, mamíferos o humanos. Tales compuestos que pueden ser eficaces contra una serie de agentes patógenos con la capacidad de infectar diferentes especies hospedadoras, también se pueden utilizar en los seres humanos para combatir la infección por agentes patógenos que están alojados de forma natural en otras especies.

En algunas realizaciones preferidas, la composición farmacéutica previene la infección con el virus de la gripe, y una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición farmacéutica se aplica a las células epiteliales respiratorias de un sujeto. Esto se puede hacer mediante el uso de un inhalador, o mediante el uso de un aerosol nasal. Preferiblemente, el inhalador nasal o el aerosol se usa de una a cuatro veces al día.

Debido a que los virus de la gripe infectan principalmente el tracto respiratorio superior, eliminando el receptor de ácido siálico localmente en la cavidad nasal, la faringe, la tráquea y los bronquios, se pueden prevenir infecciones o interrumpir infecciones tempranas. La sialidasa se puede administrar a las vías respiratorias superiores como un aerosol nasal o por inhalación, y se puede utilizar ya sea de modo terapéutico durante la etapa temprana de la gripe (u otra infección) o de modo profiláctico antes de que ocurra la infección. Como alternativa, se puede administrar al tracto respiratorio inferior por inhalación para el tratamiento de la gripe y para prevenir complicaciones de la gripe, tales como bronconeumonía. Del mismo modo, la sialidasa se puede administrar como un aerosol nasal o por inhalación para prevenir o reducir la infección con el virus paragripal y el coronavirus. También se puede administrar por inhalación o como un aerosol nasal para prevenir o reducir la colonización de las vías respiratorias con bacterias patógenas, que incluyen *Streptococcus pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis* y *Pseudomonas aeruginosa*. Los compuestos terapéuticos se pueden adaptar opcionalmente, mediante ingeniería genética o química, o mediante una formulación farmacéutica, para mejorar su semivida o la retención en el epitelio respiratorio. Además, se pueden administrar por vía tópica a los ojos o heridas quirúrgicas en forma de gotas, aerosoles o pomadas para prevenir y tratar una infección bacteriana, incluyendo la infección con *Pseudomonas aeruginosa*. También se pueden administrar por vía oral para tratar la infección con *Helicobacter pylori*.

#### Dosificación

Como será bastante evidente para un experto en la técnica, la dosificación útil *in vivo* que se va a administrar y el modo particular de administración variarán dependiendo de la edad, el peso y el tipo de paciente a tratar, la composición farmacéutica particular empleada y el uso específico para el cual se emplea la composición farmacéutica. La determinación de los niveles de dosificación eficaces, es decir, los niveles de dosis necesarios para lograr el resultado deseado, la puede llevar a cabo un experto en la técnica usando métodos de rutina, como se ha analizado anteriormente. En estudios con animales no humanos, las aplicaciones de las composiciones farmacéuticas comienzan a niveles de dosis más altas, reduciendo la dosificación hasta que ya no se logra el efecto deseado o los efectos secundarios adversos se reducen o desaparecen. La dosificación para un compuesto de la presente invención puede variar ampliamente, dependiendo de los efectos deseados, la indicación terapéutica, la vía de administración y la pureza y la actividad del compuesto. Típicamente, las aplicaciones clínicas en seres humanos de los productos comienzan a niveles de dosificación más bajos, aumentando el nivel de dosificación hasta que se logra el efecto deseado. Como alternativa, los estudios *in vitro* aceptables se pueden usar para establecer las dosis y vías de administración útiles del compuesto del ensayo. Típicamente, las dosificaciones pueden estar entre aproximadamente

1 ng/kg y aproximadamente 10 mg/kg, preferiblemente entre aproximadamente 10 ng/kg y aproximadamente 1 mg/kg, y más preferiblemente entre aproximadamente 100 ng/kg y aproximadamente 100 microgramos/kg.

5 La formulación exacta, la vía de administración y la dosificación pueden ser escogidas por el médico particular de cara al estado del paciente (véase, Fingle *et al.*, en *The Pharmacological Basis of Therapeutics* (1975)). Cabe señalar que el médico de cabecera sabrá cómo y cuándo terminar, interrumpir o ajustar la administración, debido a una toxicidad, disfunción orgánica u otros efectos adversos. Por el contrario, el médico de cabecera también sabrá cómo ajustar el tratamiento a niveles más altos si la respuesta clínica no fuera adecuada. La magnitud de una dosis administrada en la gestión del trastorno de interés, variará con la gravedad de la afección a tratar y de la vía de administración. La gravedad de la afección, por ejemplo, se puede evaluar, en parte, por métodos convencionales de evaluación del pronóstico. Además, la dosis y quizás la frecuencia de la dosis, también variarán según la edad, el peso corporal y la respuesta del paciente individual, incluyendo aquellas para aplicaciones veterinarias.

15 Por lo tanto, de acuerdo con la presente invención se proporciona además un método de tratamiento y una composición farmacéutica para el tratamiento de una infección con el virus de la gripe y la prevención de una infección con el virus de la gripe. El tratamiento implica administrar a un paciente que requiera tal tratamiento, un vehículo farmacéutico y una cantidad terapéuticamente eficaz de cualquier composición de la presente invención, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma.

20 En un régimen preferido, las dosificaciones apropiadas se administran a cada paciente mediante cualquiera entre inhalador, aerosol nasal o mediante una pastilla oral. Se entenderá, sin embargo, que el nivel de dosis específico y la frecuencia de la dosificación para cualquier paciente particular puede variar y dependerá de una variedad de factores que incluyen la actividad de la sal específica u otra forma empleada, la estabilidad metabólica y la duración de la acción de ese compuesto, la edad, el peso corporal, la salud general, el sexo, la dieta, el modo y el tiempo de administración, la tasa de excreción, la combinación de fármacos, la gravedad de la afección particular y el hospedador sometido a terapia.

#### VI. Método para reducir, prevenir o tratar respuestas alérgicas e inflamatorias

30 La presente invención también incluye métodos para reducir, prevenir o tratar una respuesta alérgica o inflamatoria de un sujeto.

35 En un aspecto, el método incluye: prevenir o tratar una respuesta alérgica o inflamatoria de un sujeto con una composición farmacéutica de la presente invención que comprende un compuesto a base de proteínas que comprende una actividad sialidasa. En algunas realizaciones preferidas, el método incluye la aplicación de una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica de la presente invención a las células epiteliales de un sujeto. La actividad sialidasa puede ser una proteína sialidasa aislada de origen natural, o una proteína recombinante sustancialmente homóloga a al menos una porción de una sialidasa de origen natural. Una composición farmacéutica preferida comprende una sialidasa con homología sustancial a la sialidasa de *A. viscosus* (SEQ ID NO: 12). El sujeto que se va a tratar puede ser un sujeto animal o humano.

45 En otro aspecto más, el método incluye: prevenir o tratar una respuesta alérgica o inflamatoria de un sujeto con una composición farmacéutica de la presente invención, que comprende un compuesto a base de proteína que comprende un dominio catalítico de sialidasa. En algunas realizaciones preferidas, el método incluye la aplicación de una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica de la presente invención a las células epiteliales de un sujeto. El dominio catalítico de sialidasa es preferiblemente homólogo o puede ser sustancialmente homólogo al dominio catalítico de una sialidasa de origen natural. Una composición farmacéutica preferida comprende un dominio catalítico de sialidasa con homología sustancial a los aminoácidos 274-666 de la sialidasa de *A. viscosus* (SEQ ID NO: 12). El sujeto que se va a tratar puede ser un sujeto animal o humano.

50 La respuesta alérgica o inflamatoria puede ser una afección aguda o crónica y puede incluir, como ejemplos no limitantes, asma, otras respuestas alérgicas que causan dificultad respiratoria, rinitis alérgica, eczema, psoriasis, reacciones frente a toxinas vegetales o animales, o afecciones autoinmunes.

55 En algunas realizaciones preferidas, los compuestos de la presente invención se pueden administrar como una pulverización nasal o por inhalación para prevenir o tratar una inflamación de las vías respiratorias, incluyendo, pero sin limitación el asma y la rinitis alérgica. Los compuestos de la presente invención que comprenden una actividad sialidasa (incluyendo proteínas del dominio catalítico de sialidasa y proteínas de fusión de sialidasa) también se pueden administrar como gotas para los ojos, gotas para los oídos, o aerosoles, pomadas, lociones o geles que se aplican sobre la piel. En otro aspecto, el método incluye el tratamiento de un paciente que tiene enfermedades inflamatorias con la presente invención, que comprende una actividad sialidasa que se administra por vía intravenosa o como una inyección local.

#### *Dosificación*

65

Como será bastante evidente para un experto en la técnica, la dosificación *in vivo* útil que se va a administrar y el modo particular de administración, variarán dependiendo de la edad, el peso y el tipo de paciente que se va a tratar, la composición farmacéutica particular empleada y el uso específico para el que se emplea la composición farmacéutica. La determinación de los niveles de dosificación eficaces, es decir los niveles de dosis necesarios para lograr el resultado deseado, la puede realizar un experto en la técnica usando métodos de rutina como se ha descrito anteriormente. En estudios con animales no humanos, las aplicaciones de las composiciones farmacéuticas comienzan a niveles de dosis más altas, reduciendo la dosificación hasta que ya no se logra el efecto deseado o los efectos secundarios adversos se reducen o desaparecen. La dosificación para un compuesto de la presente invención puede variar ampliamente dependiendo de los efectos deseados, la indicación terapéutica, la vía de administración y la pureza y la actividad del compuesto. Típicamente, las aplicaciones clínicas en seres humanos de los productos comienzan a niveles de dosificación más bajos, aumentando el nivel de dosificación hasta que se logra el efecto deseado. Como alternativa, se pueden usar estudios *in vitro* aceptables para establecer las dosis y las vías de administración útiles del compuesto del ensayo. Típicamente, las dosificaciones pueden estar entre aproximadamente 1 ng/kg y aproximadamente 10 mg/kg, preferiblemente entre aproximadamente 10 ng/kg y aproximadamente 1 mg/kg, y más preferiblemente entre aproximadamente 100 ng/kg y aproximadamente 100 microgramos/kg.

La formulación exacta, la vía de administración y la dosificación pueden ser escogidas por el médico individual de cara al estado del paciente (véase, Fingle *et al.*, en *The Pharmacological Basis of Therapeutics* (1975)). Cabe señalar que el médico a cargo sabrá cómo y cuándo terminar, interrumpir o ajustar la administración debido a una toxicidad, disfunción orgánica u otros efectos adversos. Por el contrario, el médico a cargo también sabrá ajustar el tratamiento a niveles más altos si la respuesta clínica no fuera adecuada. La magnitud de una dosis administrada en la gestión del trastorno de interés, variará con la gravedad de la afección a tratar y con la vía de administración. La gravedad de la afección se puede evaluar, por ejemplo, en parte, por métodos convencionales de evaluación de pronóstico. Además, la dosis y quizás la frecuencia de la dosis, también variarán según la edad, el peso corporal y la respuesta del paciente individual, incluyendo las que son para aplicaciones veterinarias.

En algunos regímenes preferidos, las dosificaciones apropiadas se administran a cada paciente mediante aplicación con inhalador, aerosol nasal o tópica. Se entenderá, sin embargo, que el nivel de dosis específica y la frecuencia de la dosificación para cualquier paciente particular, se puede variar y dependerá de una diversidad de factores que incluyen la actividad de la sal específica u otra forma empleada, la estabilidad metabólica y la duración de la acción de ese compuesto, la edad, el peso corporal, la salud general, el sexo, la dieta, el modo y el tiempo de administración, la tasa de excreción, la combinación de fármacos, la gravedad de la afección particular y el hospedador sometido a terapia.

## VII. Método para mejorar el suministro de genes mediante un vector vírico recombinante

También se describen en este documento métodos de suministro de genes a través de un vector vírico recombinante. En un aspecto de la descripción, el método incluye: administrar una cantidad eficaz de un compuesto de la presente invención que comprende una proteína que tiene actividad sialidasa a al menos una célula antes o simultáneamente con la administración de al menos un vector vírico recombinante. Una composición de la presente invención se puede proporcionar en la misma formulación que al menos un vector vírico recombinante, o en una formulación distinta.

En algunas realizaciones preferidas, el método incluye la aplicación de una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición de la presente invención y un vector vírico recombinante a las células de un sujeto. El sujeto que se va a tratar puede ser un sujeto animal o humano. En una realización particularmente preferida, un vector vírico recombinante se utiliza para transducir células diana epiteliales de un sujeto, para terapia génica. Por ejemplo, un vector vírico recombinante se puede usar para transducir células epiteliales de las vías respiratorias de un sujeto con fibrosis quística. En este caso, un compuesto de la presente invención se puede administrar mediante el uso de un inhalador. Un virus recombinante que comprende un gen terapéutico se puede administrar al mismo tiempo o por separado.

En otras realizaciones, las células se pueden tratar con un compuesto de la presente invención y un vector vírico recombinante *in vitro* o "ex vivo" (es decir, células extraídas de un sujeto para ser trasplantadas en un sujeto después de la transducción).

La actividad sialidasa puede ser una proteína sialidasa aislada de origen natural o una proteína recombinante sustancialmente homóloga a al menos una porción de una sialidasa de origen natural, incluyendo un dominio catalítico de sialidasa. Una composición farmacéutica preferida comprende una sialidasa con homología sustancial a la sialidasa de *A. viscosus* (SEQ ID NO: 12).

Un compuesto de la presente invención se puede administrar a células diana desde un día antes hasta dos horas después de la administración del virus recombinante. Preferiblemente, un compuesto de la presente invención se administra a las células diana desde cuatro horas antes a diez minutos antes de la administración del virus recombinante.

Un virus recombinante es preferiblemente un virus recombinante que se puede utilizar para transferir genes a células de mamífero, tales como, preferiblemente, células humanas. Por ejemplo, un virus recombinante puede ser un retrovirus (incluyendo lentivirus), adenovirus, virus adenoasociado (VAA) o virus herpes simple de tipo 1. El virus recombinante comprende al menos un gen exógeno que se va a transferir a una célula diana. El gen es preferiblemente un gen terapéutico, pero esto no es necesariamente el caso. Por ejemplo, el gen puede ser un gen utilizado para marcar células o conferir resistencia a los medicamentos.

En una realización preferida, se describen en el presente documento métodos para mejorar la eficacia de un vector de terapia génica. El método incluye tratar a un paciente con un compuesto de la presente invención que comprende una actividad sialidasa y, en la misma formulación o en una formulación distinta, con un virus recombinante. El compuesto de la presente invención que tiene actividad sialidasa se puede administrar al paciente antes, simultáneamente o incluso después de la administración de un virus recombinante. En una realización, la sialidasa es sustancialmente homóloga a la sialidasa de *Actinomyces viscosus* (SEQ ID NO: 12) o una porción de la misma. En una realización preferida, la sialidasa comprende el dominio catalítico de la sialidasa de *Actinomyces viscosus*. En otra realización, el virus recombinante es VAA. En aún otra realización, la enfermedad es fibrosis quística. En aún otra realización, el virus recombinante comprende el gen regulador de la conductancia transmembranal de la fibrosis quística (CFTR).

#### Dosificación

Como será bastante evidente para un experto en la técnica, la utilidad de una dosificación *in vivo* que se va a administrar y el modo particular de administración, variarán dependiendo de la edad, el peso y el tipo de paciente que se va a tratar, la composición farmacéutica particular empleada y el uso específico para el que se emplea la composición farmacéutica. La determinación de los niveles de dosificación eficaces, es decir los niveles de dosis necesarios para lograr el resultado deseado, la puede realizar un experto en la técnica usando métodos de rutina como se ha descrito anteriormente. En estudios con animales no humanos, las aplicaciones de las composiciones farmacéuticas comienzan a niveles de dosis más altas, reduciendo la dosificación hasta que ya no se logra el efecto deseado o los efectos secundarios adversos se reducen o desaparecen. La dosificación para un compuesto de la presente invención puede variar ampliamente dependiendo de los efectos deseados, la indicación terapéutica, la vía de administración y la pureza y la actividad del compuesto. Típicamente, las aplicaciones clínicas en seres humanos de los productos comienzan a niveles de dosificación más bajos, aumentando el nivel de dosificación hasta que se logra el efecto deseado. Como alternativa, estudios *in vitro* aceptables se pueden usar para establecer las dosis y las vías de administración útiles del compuesto del ensayo. Típicamente, las dosificaciones pueden estar entre aproximadamente 1 ng/kg y aproximadamente 10 mg/kg, preferiblemente entre aproximadamente 10 ng/kg y aproximadamente 1 mg/kg, y más preferiblemente entre aproximadamente 100 ng/kg y aproximadamente 100 microgramos/kg.

La formulación exacta, la vía de administración y la dosificación pueden ser escogidas por el médico particular de cara al estado del paciente (véase, Fingle *et al.*, en *The Pharmacological Basis of Therapeutics* (1975)). Cabe señalar que el médico de cabecera sabrá cómo y cuándo terminar, interrumpir o ajustar la administración debido a una toxicidad, disfunción orgánica u otros efectos adversos. Por el contrario, el médico de cabecera también sabrá ajustar el tratamiento a niveles más altos si la respuesta clínica no era adecuada. La magnitud de una dosis administrada en la gestión del trastorno de interés, variará con la gravedad de la afección a tratar y con la vía de administración. La gravedad de la afección se puede evaluar, por ejemplo, en parte, por métodos convencionales de evaluación de pronóstico. Además, la dosis y quizás la frecuencia de la dosis, también variarán según la edad, el peso corporal y la respuesta del paciente individual, incluyendo las que son para aplicaciones veterinarias.

En algunos regímenes preferidos, las dosificaciones apropiadas se administran a cada paciente mediante cualquier aplicación con inhalador, aerosol nasal o tópica. Se entenderá, sin embargo, que el nivel de dosis específica y la frecuencia de la dosificación para cualquier paciente particular, se puede variar y dependerá de una variedad de factores que incluyen la actividad de la sal específica u otra forma empleada, la estabilidad metabólica y la duración de la acción de ese compuesto, la edad, el peso corporal, la salud general, el sexo, la dieta, el modo y el tiempo de administración, la tasa de excreción, la combinación de fármacos, la gravedad de la afección particular y el hospedador sometido a terapia.

#### Ejemplos

*Ejemplo 1: Síntesis de genes de aprotinina, purificación y análisis de proteínas de fusión de aprotinina.*

*Introducción*

La proteína vírica de la gripe, hemaglutinina (HA) es la principal proteína de la envoltura del virus de la gripe. Desempeña un papel esencial en la infección vírica. La importancia de la HA se evidencia por el hecho de que es la principal diana de los anticuerpos neutralizantes protectores, producidos por la respuesta inmune del hospedador (Hayden, FG. (1996) en *Antiviral drug resistance* (editor, Richman DD), págs. 59-77. Chichester, UK: John Wiley & Sons Ltd.). Ahora se ha esclarecido que la HA tiene dos funciones diferentes en la infección vírica. En primer lugar, la HA es responsable de la fijación del virus a receptores celulares de ácido siálico. En segundo lugar, la HA media en la entrada vírica en las células diana mediante la activación de la fusión de la envoltura vírica con las membranas celulares.

La HA se sintetiza como una proteína precursora, HA0, que se transfiere a través del aparato de Golgi a la superficie celular como un complejo molecular trimérico. HA0 se escinde posteriormente para generar el extremo C-terminal de HA1 (resto 328 de HA0) y el extremo N-terminal de HA2. En general se cree que la escisión se produce en la superficie celular o en los virus liberados. La escisión de HA0 en HA1/HA2 no es necesaria para la unión de HA a un receptor de ácido siálico; sin embargo, es esencial para la infectividad vírica (Klenk, HD y Rott, R. (1988) *Adv Vir Res.* 34:247-281; Kido, H, Niwa, Y, Beppu, Y y Towatari, T. (1996) *Advan Enzyme Regul* 36:325-347; Skehel, JJ y Wiley, DC. (2000) *Annu Rev Biochem* 69:531-569).

La sensibilidad de HA0 frente a las proteasas del hospedador se determina por el sitio proteolítico en el bucle externo de la molécula de HA0. El sitio proteolítico puede contener un único resto de Arg o Lys (sitio de escisión monobásico) o varios restos de Lys y/o Arg en el motivo R-X-K/R-R (sitio de escisión multibásico). Solo los subtipos del virus de la gripe A, H5 y H7 tienen proteínas HA que son portadoras del sitio de escisión multibásico. Todos los demás virus de la gripe A, B y C contienen proteínas HA que tienen el sitio de escisión monobásico. Los virus de la gripe A que tienen sitios de escisión multibásicos son más virulentos e inducen una infección sistémica en los hospedadores, mientras que los virus con un sitio monobásico en HA inician la infección solo en el tracto respiratorio de mamíferos o en las vías respiratorias y entéricas en especies aviares (Klenk, HD y Garten W. 1994. *Trend Micro* 2:39-43, para una revisión). Afortunadamente, la infección humana con los subtipos H5 y H7 sumamente virulentos de la gripe aviar A, que son portadores del sitio de escisión multibásico, solo se ha producido hasta el momento en unos pocos casos descubiertos principalmente en Hong Kong. La gran mayoría de las infecciones gripales están causadas por virus con proteínas HA que se escinden en el sitio de escisión monobásico.

Los subtipos 5 y 7 de HA del virus de la gripe que contienen sitios de escisión multibásicos son activados por la furina, un miembro de las endoproteasas similares a subtilisina, o la familia de convertasa de pre-proteínas. La furina escinde el virus intracelularmente y está presente de forma ubicua en muchos tipos de células, lo que permite la infección virulenta, sistémica, observada con tales virus (Klenk, HD y Garten W. 1994. *Trend Micro* 2:39-43; Nakayama, K. 1997. *Biochem* 327:625-635). Todos los demás virus de la gripe, que tienen HA con sitios de escisión monobásicos, se activan con proteasas de serina de tipo tripsina, secretadas. Las enzimas que han estado implicadas en la activación del virus de la gripe incluyen: plasmina (Lazarowitz SG, Goldberg AR y Choppin PW. 1973. *Virology* 56:172-180), miniplasmina (Murakami M, Towatari T, Ohuchi M, Shiota M, Akao M, Okumura Y, Parry MA y Kido H. (2001) *Eur J Biochem* 268: 2847-2855), triptasa Clara (Kido H, Chen Y y Murakami M. (1999) en B. Dunn (editor), *Proteases of infectious agents.* pág. 205-217, Academic Press, Nueva York, N.Y), calicreína, urocinasa, trombina (Scheiblaue H, Reinacher M, Tashiro M y Rott R. (1992) *J Infect Dis* 166:783-791), factor Xa de coagulación de la sangre (Gotoh B, Ogasawara T, Toyoda T, Inocencio N, Hamaguchi M y Nagai Y. (1990) *EMBO J* 9:4189-4195), acrosina (Garten W, Bosch FX, Linder D, Rott R y Klenk HD. (1981) *Virology* 115:361-374), proteasas procedentes de lavado respiratorio humano (Barbey-Morel CL, Oeltmann TN, Edwards KM y Wright PF. (1987) *J Infect Dis* 155:667-672) y proteasas bacterianas procedentes de *Staphylococcus aureus* (Tashiro M, Ciborowski P, Reinacher M, Pulverer G, Klenk HD y Rott R. (1987) *Virology* 157:421-430) y *Pseudomonas aeruginosa* (Callan RJ, Hartmann FA, West SE y Hinshaw VS. (1997) *J Virol* 71:7579-7585). La activación de los virus de la gripe a través de proteasas de serina del hospedador se considera generalmente que se produce extracelularmente ya sea en la membrana plasmática o después de la liberación del virus desde la célula.

La aprotinina, también denominada Trasilol, o inhibidor de tripsina pancreática bovina (BPTI) es un polipéptido que tiene 58 aminoácidos. Pertenece a la familia de inhibidores de tipo Kunitz e inhibe competitivamente un amplio espectro de proteasas de serina, incluyendo tripsina, quimotripsina, plasmina y calicreína plasmática. La aprotinina se ha utilizado durante mucho tiempo como un agente terapéutico humano, como para el tratamiento de la pancreatitis, diversos estados del síndrome de choque, hemorragia hiperfibrinolítica e infarto de miocardio. También se utiliza en la cirugía a corazón abierto, incluyendo las operaciones de derivación cardiopulmonar, para reducir la pérdida de sangre (Fritz H y Wunderer G. (1983) *Arzneim-Forsch* 33: 479-494).

La seguridad de la aprotinina en los seres humanos ha estado bien documentada a lo largo de años de aplicaciones clínicas. Además, la aprotinina es aparentemente un inmunógeno muy débil ya que no se han observado anticuerpos específicos de aprotinina en los sueros humanos hasta el momento (Fritz H y Wunderer G. (1983) *Arzneim-Forsch* 33:479-494). Otra característica deseada de la aprotinina como un fármaco candidato, es su excelente estabilidad. Se puede conservar a temperatura ambiente durante al menos 18 meses sin ninguna pérdida de actividad (Fritz H y Wunderer G. (1983) *Arzneim-Forsch* 33:479-494).

Para lograr una inhibición vírica significativa, en estudios con animales que se han realizado, la aprotinina se administró a dosis altas. Por ejemplo, se inyectaron 280 microgramos a 840 microgramos al día de aprotinina por vía intraperitoneal en cada ratón durante 6 días (Zhirnov OP, Ovcharenko AV y Bukrinskaya AG (1984) J Gen Virol. 65: 191-196); para la inhalación de aerosol se requiere una dosis menor, aun así, a cada ratón se le administraron 63 - 126 microgramos al día durante 6 días (Ovcharenko AV y Zhirnov OP. (1994) Antiviral Res 23:107-118). Se requeriría una dosis muy alta de aprotinina en seres humanos basándose en una extrapolación de los datos de ratón. Por lo tanto para lograr una mejor eficacia en seres humanos, la potencia de la molécula de aprotinina necesita ser mejorada significativamente.

La aprotinina actúa mediante la inhibición competitiva de proteasas de serina que están generalmente en la superficie de las células epiteliales respiratorias del hospedador. Por lo tanto, la concentración local de aprotinina en la proximidad de las proteasas del hospedador, es el factor clave que determina la ventaja competitiva de la aprotinina. Utilizamos dos enfoques que funcionan sinérgicamente para aumentar la ventaja competitiva de la aprotinina en la superficie del epitelio respiratorio.

En primer lugar, la avidéz (afinidad funcional) de la aprotinina se incrementa al preparar proteínas de fusión multivalentes de aprotinina que constan de dos, tres o más proteínas de aprotinina conectadas a través de enlazadores. Dicha molécula es capaz de unirse a las proteasas de la membrana de una forma multivalente, lo que tiene una ventaja cinética significativa sobre el monómero de aprotinina. La aprotinina monomérica se une muy fuertemente a la tripsina bovina con una constante de disociación ( $K_i$ ) que es de  $6,0 \times 10^{-14}$  mol/l. Sin embargo, su afinidad comparada con la de otras proteasas, tales como quimotripsina, plasmina y calicreína, que se han implicado en la activación del virus de la gripe, es mucho menor estando la  $K_i$  en el nivel de  $10^{-8}$  a  $10^{-9}$  mol/l (Fritz H y Wunderer G. (1983) *Arzneim-Forsch* 33:479-494). La multimerización puede aumentar la afinidad de la aprotinina hacia estas proteasas de manera exponencial.

En segundo lugar, fusionamos la aprotinina con un dominio de anclaje al epitelio respiratorio. El dominio de anclaje localiza la aprotinina en la proximidad de proteasas asociadas a la membrana del hospedador y mantiene una alta concentración local de aprotinina sobre la superficie epitelial. El dominio de anclaje también aumenta el tiempo de retención del fármaco sobre el epitelio respiratorio.

#### Clonación

La aprotinina es un polipéptido de cadena sencilla que tiene 58 restos de aminoácidos y 3 enlaces disulfuro intracatenarios (SEQ ID NO: 1). La secuencia de aminoácidos de la aprotinina se muestra en la Figura 1. Los genes que codifican la aprotinina y las proteínas de fusión de aprotinina se sintetizan mediante PCR utilizando oligonucleótidos solapantes con codones optimizados para la expresión en *E. coli* como moldes. Los productos de la PCR se clonan en el vector pCR2.1-TOPO (Invitrogen). Después de la secuenciación, los genes se subclonan en un vector de expresión pQE (Qiagen). El vector es portador de un marcador para la purificación, His<sub>6</sub>, para permitir una purificación sencilla de las proteínas recombinantes. Las construcciones se utilizan para transformar *E. coli*. Las células transformadas cultivadas en medio LB con ampicilina hasta la fase de semilogaritmo, se inducen con IPTG de acuerdo con protocolos convencionales. Las células se sedimentan y se lisan en solución salina tamponada con fosfato (PBS) mediante tratamiento con ultrasonidos. Las enzimas, que tienen el marcador de purificación His<sub>6</sub>, se purifican utilizando una columna de níquel (Qiagen).

Se preparan las siguientes proteínas de fusión de aprotinina:

1. Aprotinina dimérica y trimérica. Dos o tres genes de aprotinina están unidos a través de un enlazador flexible como las siguientes construcciones:

Aprotinina-(GGGGS (SEQ ID NO: 10))<sub>n</sub> (n = 3, 4 o 5)-Aprotinina;  
Y

Aprotinina-(GGGGS (SEQ ID NO: 10))<sub>n</sub> (n = 3, 4 o 5)-Aprotinina-(GGGGS (SEQ ID NO: 10))<sub>n</sub> (n = 3, 4 o 5)-Aprotinina

La longitud de la secuencia del enlazador puede determinar la flexibilidad tridimensional de la aprotinina multimérica y de ese modo influir en la afinidad funcional de la molécula. Por lo tanto, se preparan construcciones que tienen enlazadores con varias longitudes. La aprotinina monomérica recombinante completamente funcional se ha producido en *E. coli* (Auerswald EA, Horlein D, Reinhardt G, Schroder W y Schnabel E. (1988). *Biol Chem Hoppe-Seyler* vol 369, supl., págs. 27-35). Por lo tanto, esperamos un correcto plegamiento de las proteínas de aprotinina multivalentes en células de *E. coli*. Además de expresar la proteína en varias cepas comunes de *E. coli*, tales como BL21, JM83, etc., las proteínas de aprotinina multivalentes se expresan también en células Origami<sup>®</sup> (Novagen, Bad Soden, Alemania). La cepa de células Origami<sup>®</sup> no tiene tioredoxina ni glutatión reductasa y, por lo tanto, tiene un citoplasma oxidante. Esta cepa celular se ha utilizado para expresar con éxito una serie de proteínas que contienen enlaces disulfuro (Bessette PH, Aslund F, Beckwith J y Georgiou G. (1999) *Pro Natl Acad Sci USA* 96:13703-13708; Venturi M, Seifert C y Hunte C. (2001) *J Mol Biol* 315:1-8).



2. La aprotinina que se ancla a células epiteliales. Una secuencia que se ancla a las células del epitelio se fusiona con aprotinina. La secuencia que se ancla al epitelio puede ser cualquier secuencia de péptido o polipéptido que tiene afinidad hacia la superficie de las células epiteliales. Hemos seleccionado tres secuencias humanas que se unen a GAG: PF4 (aa 47-70; SEQ ID NO: 2), IL-8 (aa 46-72; SEQ ID NO: 3) y AT III (aa 118-151; SEQ ID NO: 4) (Figura 2). Estas secuencias se unen a heparina/sulfato de heparán con afinidades de nivel nanomolar (Tabla 1). La heparina/sulfato de heparán están presentes de forma ubicua en el epitelio respiratorio. En construcciones distintas, las secuencias que se unen a GAG están fusionadas con el gen de aprotinina en el extremo N-terminal y en el extremo C-terminal a través de una secuencia enlazadora genérica GGGGS como las siguientes construcciones:

10 (dominio GAG-GGGGS(SEQ ID NO: 10)-Aprotinina); y

(Aprotinina-GGGGS(SEQ ID NO: 10)-dominio GAG)

Tabla 1. Afinidades hacia heparina	
Proteína	Kd nM (ref)
PF4	27 (44)
IL-8	<5 (43)
ATIII	11 (42)
ApoE	620 (45)

15 *Ensayo fotométrico de inhibición de tripsina*

La actividad inhibidora de tripsina de la aprotinina y las proteínas de fusión de aprotinina se mide mediante un ensayo fotométrico descrito previamente en detalle (Fritz H y Wunderer G. (1983) *Arzneim-Forsch* 33: 479-494). Brevemente, en este ensayo la aprotinina inhibe la hidrólisis catalizada por tripsina de Na-benzoil-L-arginina-p-nitroanilida (BzArgpNA o L-BAPA) (Sigma), que se controla fotométricamente a 405 nm. Una unidad de tripsina ( $U_{BAPA}$ ) se corresponde con la hidrólisis de 1 micromol de sustrato por minuto. Una unidad de inhibidor ( $U_{IBAPA}$ ) disminuye la actividad de dos unidades de tripsina en un 50 %, lo que corresponde aritméticamente a la inhibición de 1  $U_{BAPA}$  de tripsina. La actividad específica de la aprotinina se proporciona en  $U_{BAPA}/mg$  de polipéptido.

25 *Ensayo de resonancia de plasmón superficial*

Las afinidades de la aprotinina dimérica y trimérica con diversos enlazadores se comparan con la aprotinina monomérica usando el ensayo de resonancia de plasmón superficial, o el análisis BIAcore (BIAcore, Piscataway, NJ) con plasmina humana como diana. Del mismo modo, el ensayo BIAcore con heparina como diana se utiliza para analizar la afinidad entre las proteínas de fusión de aprotinina que se unen a GAG y heparina.

35 Cuando se utiliza plasmina como diana, la plasmina humana purificada (Sigma) se inmoviliza sobre el chip CM5 según las instrucciones del fabricante (BIAcore, Piscataway, NJ). Cuando la diana es heparina, la albúmina biotinilada y la albúmina-heparina (Sigma) son capturadas en un chip de BIAcore SA revestido con estreptavidina, como se ha descrito anteriormente (Xiang Y y Moss B. (2003) *J Virol* 77: 2623-2630).

40 *Ejemplo 2: Establecimiento de modelos mejorados de cultivo de tejidos para estudios sobre la gripe, infección con el virus.*

*Reservas de virus de la gripe*

Las cepas víricas de la gripe se obtienen a partir de la ATCC y el repositorio en el Hospital de Investigación Infantil St. Jude. Todos los experimentos con virus de la gripe se llevan a cabo con un nivel de Bioseguridad II.

45 Los virus se propagan mediante una inyección en la cavidad alantoidea de embriones de pollo de nueve días, tal y como se ha descrito (Zhirnov OP, Ovcharenko AV y Bukrinskaya AG. (1985) *J Gen Virol* 66: 1633-1638). Como alternativa, las reservas víricas se cultivan en células de riñón canino Madin-Darby (MDCK) en medio esencial mínimo (MEM) complementado con 0,3 % de albúmina de suero bovino y 0,5 microgramos de tripsina por ml. Después de incubar durante 48 a 72 horas, el medio de cultivo se clarifica por centrifugación a baja velocidad. Las partículas víricas se sedimentan por ultracentrifugación a través de una almohadilla de sacarosa al 25 %. Los virus purificados se suspenden en tampón Tris 0,1 M-50 % de glicerol (pH 7,3) y se almacenan a -20°C.

55 *Ensayos en placa*

La infectividad y el título de las reservas víricas se determinaron mediante dos tipos de ensayos en placa, uno convencional y uno modificado (Tobita, K, Sugiura, A, Enomoto, C y Furuyama, M. (1975) *Med Microbiol Immunol* 162:9-14; Zhimov OP, Ovcharenko AV y Bukrinskaya AG (1982) *Arch Virol* 71:177-183). El ensayo en placa

convencional se usa de forma rutinaria como un método para la titulación de virus. Requiere tripsina exógena en una capa de agar añadida a las monocapas de MDCK, inmediatamente después de la infección con el virus (Tobita, K, Sugiura, A, Enomoto, C y Furuyama, M. (1975) *Med Microbiol Immunol* 162:9-14). Este método aumenta artificialmente la infectividad de las reservas víricas que se están sometiendo a ensayo, mediante la activación de todas las partículas víricas que tienen HA sin escindir.

Zhimov *et al.* diseñaron un ensayo en placa modificado que consiste en una capa de agar doble, incluyendo la tripsina en la segunda capa que se añade 24 horas después de la infección (Zhimov OP, Ovcharenko AV y Bukrinskaya AG. (1982) *Arch Virol* 71:177-183). Tres días después de la infección, las células se fijan con una solución al 10 % de formaldehído, se eliminan las capas de agarosa, las células fijadas se tiñen con solución de hematoxilina-eosina y se hace un recuento de las placas. El ensayo en placa modificado permite la determinación precisa de la infectividad real de las reservas víricas que contienen tanto HA escindida como sin escindir. Combinando los resultados de ambos ensayos en placa, convencional y modificado, se pueden distinguir los virus que contienen HA escindida y no escindida, y correlacionar la infectividad de las reservas víricas con el estado de escisión de HA.

#### *Modelos de cultivo celular humano*

1. Cultivo a corto plazo de células epiteliales humanas primarias. Una infección convencional con el virus de la gripe *in vitro* se lleva a cabo principalmente en células MDCK con tripsina exógena añadida al medio de cultivo. Esto está lejos de ser fisiológico y no es apropiado para el trabajo propuesto en esta memoria porque la tripsina no es la proteasa que activa el virus de la gripe *in vivo*. Hasta la fecha se ha descrito un número muy limitado de modelos de cultivo de tejidos *in vitro* que sean capaces de apoyar el crecimiento del virus de la gripe sin una proteasa exógena, siendo esos cultivos primarios con células de primates de origen renal, células que recubren las cavidades alantoidea y amniótica de huevos embrionarios, cultivos de órganos anulares de la traqueal fetal y células epiteliales adenoides humanas primarias (Endo Y, Carroll KN, Ikizler MR y Wright PF (1996) *J Virol* 70:2055-2058). Entre estos, el último trabajo con células epiteliales adenoides humanas primarias es el mejor imitador de las condiciones humanas. En este caso, Endo *et al.* (Endo Y, Carroll KN, Ikizler MR y Wright PF. (1996) *J Virol* 70:2055 a 2058) aislaron células epiteliales a partir de muestras quirúrgicas de adenoides humanas y cultivaron las células epiteliales en una matriz de colágeno (Vitrogen 100, Celtrix Laboratories, Palo Alto, California) en cámaras Transwell (Costar, Cambridge, Mass). Las células se mantuvieron en medio Ham F12 al 50 % y medio esencial mínimo de Eagle al 50 % con complementos de factores de crecimiento y oligoelementos. Las células alcanzaron la confluencia en 10 a 14 días, permaneciendo en gran parte como una monocapa pero con parches discretos de células ciliadas, que conservaron una actividad ciliar regular durante 1 a 3 semanas después de alcanzar la confluencia. En este sistema, el virus de la gripe A creció hasta un título de  $10^6$  PFU/ml con una multiplicidad de infección de 0,001 (Endo Y, Carroll KN, Ikizler MR y Wright PF. (1996) *J Virol* 70:2055-2058). Los efectos citopatogénicos progresivos también estuvieron presentes durante la infección. El mayor inconveniente de este sistema es que requiere tejido adenoide humano de nuevo aporte.

Para resolver este problema, las células epiteliales adenoides humanas primarias son reemplazadas por células epiteliales humanas primarias de las vías respiratorias que están disponibles comercialmente (Cambrex), y las células se cultivan en las mismas condiciones. Tal cultivo a corto plazo de células epiteliales humanas primarias de las vías respiratorias se establece relativamente rápido y es útil como modelo experimental de primera línea para la mayoría de los experimentos de infección *in vitro* y antivíricos.

2. Epitelio bien diferenciado de las vías respiratorias humanas (WD-HAE). Con el fin de imitar mejor el estado *in vivo* de las vías respiratorias humanas, se utiliza el modelo de epitelio bien diferenciado de las vías respiratorias humanas (WD-HAE por sus siglas en inglés). WD-HAE es epitelio estratificado que tiene todas las células diferenciadas del epitelio de las vías respiratorias humanas normales, incluyendo las células ciliadas funcionales y las células secretoras de moco. Por lo tanto, en este sistema modelo, los virus de la gripe son más propensos a ser activados por proteasas del hospedador que son fisiológicamente relevantes. Aunque WD-HAE se ha utilizado ampliamente para estudiar infecciones víricas respiratorias, como el virus sincitial respiratorio (RSV) (Zhang L, ME Peeples, Boucher RC, Collins PL y Pickles RJ. (2002) *J Virol* 76:5654-5666), el virus del sarampión (Sinn PL, Williams G, Vongpunsawad S, Cattaneo R y McCray PB (2002). *J Virol* 76:2403-2409), o el rinovirus humano, no se ha utilizado anteriormente para estudiar los virus de la gripe.

Un protocolo detallado de WD-HAE se ha descrito previamente (Krunkosky TM, Fischer BM, Martin LD, Jones N, Akley NJ y Adler KB. (2000) *Am J Respir Cell Mol Biol*. 22:685-692). Brevemente, las células epiteliales bronquiales humanas, primarias, comerciales (Cambrex) se cultivan en cámaras transparentes de cultivo Transwell (Costar) que están recubiertos de forma fina con colágeno I de cola de rata. Las células se cultivan sumergidas durante los primeros 5 a 7 días en un medio que contiene una mezcla 1:1 de medio de crecimiento para células epiteliales bronquiales (BEGM) (Cambrex) y DMEM con glucosa elevada, con un complemento de factores de crecimiento (Krunkosky TM, Fischer BM, Martin LD, Jones N, Akley NJ y Adler KB. (2000) *Am J Respir Cell Mol Biol* 22:685-692). Cuando los cultivos tienen una confluencia del 70 % (días 5 a 7), se crea la interfaz aire-líquido mediante la eliminación del medio apical y la exposición de las células solo a un medio en su superficie basal. Las células se cultivan durante otros 14 días en la interfase aire-líquido, durante un total de 21 días de cultivo, y luego están listas para los experimentos. El epitelio diferenciado se puede mantener *in vitro* durante semanas.

La morfología epitelial y el grado de diferenciación se documenta mediante histología de rutina (Endo Y, Carroll KN, Ikizler MR y Wright PF. (1996) J Virol 70:2055-2058). Brevemente, después de la fijación con formalina tamponada al 10 %, las células epiteliales se embeben en parafina, se seccionan y se tiñen con hematoxilina y eosina, y con una tinción con ácido periódico-Schiff para las células secretoras de moco.

La infección con gripe se lleva a cabo en los dos sistemas de modelos anteriores, mediante la adición de 0,001 a 1 MOI de virus a las células diferenciadas. El título y la infectividad de los virus en el material sobrenadante se controlan durante un periodo de 3 a 7 días. El nivel de amplificación del virus de la gripe y la infectividad de los virus de la gripe se evalúan empleando ensayos en placa convencionales y modificados.

*Ejemplo 3: Comparación de las funciones de las proteínas de fusión de aprotinina in vitro*

*Efectos anti-víricos de las proteínas de fusión de aprotinina*

1. Tratamiento previo a la infección. Las proteínas de fusión de aprotinina se añaden a cultivos de células humanas primarias con diversas concentraciones y se permite la incubación con las células durante 1 hora. Las células se lavan con medio de nuevo aporte y se inoculan inmediatamente con virus de la gripe a una MOI de 0,01 a 1. Las células se lavan de nuevo después de 1 hora y se cultivan durante 3 a 5 días. El título y la infectividad de los virus en el material sobrenadante se miden en diversos momentos a través de dos ensayos en placa. El efecto citopático causado por la infección vírica se evalúa tiñendo las células viables con cristal violeta y cuantificando mediante la medición de la absorción a 570 nm al final del experimento. El porcentaje de protección celular mediante las proteínas de fusión de aprotinina se calcula mediante  $100x \{ (muestra\ tratada\ con\ aprotinina - muestra\ infectada\ no\ tratada) / (control\ no\ infectado - muestra\ infectada\ no\ tratada) \}$ . La eficacia del fármaco para la protección celular se describe por su Concentración Efectiva que alcanza el 50 % de la protección celular (CE<sub>50</sub>). Puesto que la activación de HA solo se produce en partículas víricas recién liberadas, se produce normalmente la primera ronda de la infección vírica y el título vírico se eleva en las primeras 24 horas después de la infección. Sin embargo, a partir de la segunda ronda, la infectividad de los virus desciende y el título vírico disminuye gradualmente como resultado del tratamiento con aprotinina. Con los resultados de este experimento se diferencian varios tipos de diferentes proteínas de fusión de aprotinina por sus eficacias en un solo tratamiento profiláctico.

Como alternativa, el momento de la inoculación vírica inicial se altera desde inmediatamente después del tratamiento con aprotinina, 2-24 horas después del tratamiento. El título vírico, la infectividad y el efecto citopático se miden durante 3 a 5 días después de la infección, como se ha descrito anteriormente. Los resultados de estos experimentos distinguen diversas proteínas de fusión de aprotinina por las longitudes de la ventana efectiva después de un solo tratamiento profiláctico.

2. Tratamiento posterior a la infección. Para el tratamiento de múltiples dosis, las células se infectan primero mediante inoculaciones víricas con MOI de 0,001 a 1 durante 1 hora. Varias concentraciones de proteínas de fusión de aprotinina se añaden inmediatamente después, los tratamientos adicionales se aplican a intervalos de 8 horas durante las primeras 48 horas después de la infección. Las células se cultivan hasta el día 7 después de la infección. El título vírico y la infectividad en los medios se controlan durante todo el proceso. El efecto citopático se evalúa al final del experimento.

Para el tratamiento de una sola dosis, las células se infectan primero mediante inoculaciones víricas con MOI de 0,001 a 0,1 durante 1 hora. Los tratamientos de las proteínas de fusión de aprotinina a diversas concentraciones se aplican en diferentes momentos durante las primeras 48 horas después de la infección, pero cada muestra celular solo recibe un tratamiento durante todo el experimento. Las células se cultivan hasta el día 7 después de la infección. El título vírico y la infectividad en los medios se controlan durante todo el proceso. El efecto citopático se evalúa al final del experimento. Con los resultados de estos experimentos se distinguen diferentes tipos de proteínas de fusión de aprotinina por su potencia terapéutica.

*Inhibición de la escisión de HA mediante proteínas de fusión de aprotinina*

Para demostrar que las proteínas de fusión de aprotinina inhiben la infección vírica de la gripe inhibiendo la escisión de la proteína HA de la gripe, un cultivo de células epiteliales primarias humanas se infecta con virus de la gripe con una MOI de 1. Las proteínas de fusión de aprotinina se añaden al cultivo ya sea justo antes de la inoculación vírica o inmediatamente después de la infección vírica. Seis horas y media después de la infección, el cultivo se incuba durante 1 hora en MEM que carece de metionina sin marcar y que contiene metionina marcada con <sup>35</sup>S (Amersham) a una concentración de 100 microCi/ml (pulso). A continuación, las células se lavan dos veces con MEM que contiene una concentración 10 veces superior de metionina sin marcar y se incuban en MEM durante 3 horas adicionales (Chase). Después de marcar, las células se disuelven en tampón de ensayo de radioinmunoprecipitación (RIPA), HA precipita con anti-suero contra la cepa particular de virus usada para la infección (los sueros anti-gripe se pueden obtener en la ATCC y el Centro de Control de Enfermedades y Prevención), y el inmunocomplejo se purifica a continuación mediante proteína G-Sefarosa (Amersham). Las muestras se fraccionan mediante SDS-PAGE seguida por autorradiografía. En las muestras no tratadas con las proteínas de fusión de aprotinina, se espera que HA1 y HA2 sean la especie de HA predominante; mientras que en las muestras tratadas con aprotinina, se espera que HA0 sea el principal tipo de HA presente.

*Ejemplo 4: Síntesis de genes de cinco sialidasas, expresión y purificación de las proteínas de la sialidasa.*

*Introducción*

5 Los virus de la gripe pertenecen a la familia *orthomyxoviridae* de virus de ARN. Ambos virus de tipo A y tipo B tienen 8 genomas de ARN segmentados de cadena negativa, incluidos en una envoltura lipídica obtenida a partir de la célula hospedadora. La envoltura vírica está cubierta con espículas que se componen de tres proteínas: hemaglutinina (HA) que fija los virus a receptores de las células hospedadoras y media en la fusión de las membranas vírica y celular; neuraminidasa (NA) que facilita la liberación de los nuevos virus desde la célula hospedadora; y un pequeño número de proteínas M2 que sirven como canales de iones. Para el *virus de la gripe A*, HA y NA ambas se someten a deriva antigénica y cambio antigénico, los subtipos víricos se distinguen por diferencias serológicas entre sus proteínas HA y NA. Existe un total de 15 tipos de HA (H1-H15) y 9 tipos de NA (N1-N9), pero solo tres HA (H1-H3) y dos NA (N1 y N2) se han encontrado hasta la fecha en el *virus de la gripe A* humana (Granoff, A. y Webster, R. G., editor. Encyclopedia of Virology, segunda edición, tomo 2). A diferencia de los *virus de la gripe A*, no se reconocen subtipos antigénicos distintos para el *virus de la gripe B*.

Mientras que el *virus de la gripe B* circula solo en los seres humanos, el *virus de la gripe A* se puede aislar a partir de una gran cantidad de animales, como cerdos, caballos, gallinas, patos y otras especies de aves, que representan el reordenamiento genético del *virus de la gripe A*, lo que da como resultado un cambio antigénico. Las aves acuáticas silvestres se consideran el depósito primordial de todos los virus de la gripe para las especies de aves y mamíferos. Existe una amplia evidencia de la transmisión del virus entre las aves acuáticas y otras especies que incluyen los cerdos y los caballos y la transmisión indirecta a los seres humanos a través de los cerdos. Una transmisión directa desde los cerdos o los pollos a los seres humanos también se ha documentado (Ito, T. (2000) Microbiol Immunol 44(6):423-430).

El receptor de la célula hospedadora para los virus de la gripe es el ácido siálico de la superficie celular. Los ácidos siálicos son  $\alpha$ -cetoácidos con estructuras principales de 9 carbonos que se encuentran generalmente en las posiciones más externas de las cadenas de oligosacáridos que se fijan a las glicoproteínas y glicolípidos. Uno de los principales tipos de ácido siálico es el ácido N-acetilneuramínico (Neu5Ac), que es el precursor biosintético de la mayoría de los otros tipos. En la naturaleza se encuentran dos enlaces importantes entre Neu5Ac y los restos penúltimos de galactosa de las cadenas laterales de hidratos de carbono, Neu5Ac  $\alpha(2,3)$ -Gal y Neu5Ac  $\alpha(2,6)$ -Gal. Ambas moléculas, Neu5Ac  $\alpha(2,3)$ -Gal y Neu5Ac  $\alpha(2,6)$ -Gal pueden ser reconocidas como receptor por el *virus de la gripe A* (Schauer, R. (1982) Adv. Carbohydrate Chem & Biochem 40:131-235), mientras que los virus humanos parece que prefieren Neu5Ac  $\alpha(2,6)$ -Gal, los virus aviares y equinos reconocen predominantemente Neu5Ac  $\alpha(2,3)$ -Gal (Ito, T. (2000) Microbiol Immunol 44(6):423-430).

Las infecciones con los virus de la gripe de tipo A y B se inician típicamente en la superficie de la mucosa del tracto respiratorio superior. La replicación vírica se limita principalmente al tracto respiratorio superior, pero puede extenderse hasta el tracto respiratorio inferior y provocar bronconeumonía que puede ser letal. El riesgo de muerte es de una por cada 10.000 infecciones, pero es significativamente mayor para los grupos de alto riesgo con afecciones cardiopulmonares preexistentes y para los individuos sin tratamiento inmunológico durante una pandemia.

Un compuesto terapéutico que comprende una sialidasa que puede degradar eficazmente ambos ácidos siálico de los receptores, Neu5Ac  $\alpha(2,3)$ -Gal y Neu5Ac  $\alpha(2,6)$ -Gal, puede conferir protección contra la más amplia gama de virus de la gripe, incluyendo los virus animales. También puede seguir siendo eficaz ya que las cepas víricas cambian anualmente. Debido a que la sialidasa se dirige a la célula hospedadora en lugar de al virus y actúa en el "punto de asfixia" en un ciclo vital vírico, la generación de virus resistentes es improbable. El ácido siálico unido a proteína cambia de manera homogénea en la superficie celular con una semivida de 33 horas (Kreisel, W, Volk, BA, Buchsel, R. y Reutter, W. (1980) Proc Natl Acad Sci USA 77:1828-1831). Por lo tanto, se estima que la administración de una sialidasa una vez al día o dos veces al día, conferiría una protección suficiente contra la gripe.

Las sialidasas se encuentran en eucariotas superiores, así como en algunos microbios mayormente patógenos, incluyendo virus, bacterias y protozoos. Las sialidasas víricas y bacterianas han sido bien caracterizadas, y se han determinado las estructuras tridimensionales de algunas de ellas (Crennell, SJ, Garman, E, Laver, G, Vimr, E y Taylor, G. (1994) Structure 2:535-544; Janakiraman, MN, White, CL, Laver, WG, Air, GM y Luo, M. (1994) Biochemistry 33:8172-8179; Pshezhetsky, A, Richard, C, Michaud, L, Igdoura, S, Wang, S, Elsliger, M, Qu, J, Leclerc, D, Gravel, R, Dallaire, L y Potier, M. (1997) Nature Genet 15: 316-320). Varias sialidasas humanas también se han clonado en los últimos años (Milner, CM, Smith, SV, Carrillo MB, Taylor, GL, Hollinshead, M y Campbell, RD. (1997) J Bio Chem 272:4549-4558; Monti, E, Preti, A, Nesti, C, Ballabio, A y Borsani G. 1999. Glycobiol 9:1313-1321; Wada, T, Yoshikawa, Y, Tokuyama, S, Kuwabara, M, Akita, H y Miyagi, T. (1999) Biochem Biophys Res Commun 261:21-27; Monti, E, Bassi, MT, Papini, N, Riboni, M, Manzoni, M, Veneranodo, B, Croci, G, Preti, A, Ballabio, A, Tettamanti, G y Borsani, G. (2000) Biochem J 349:343-351). Todas las sialidasas caracterizadas comparten un motivo de cuatro aminoácidos en la porción amino terminal, seguido por el motivo de caja Asp que se repite de tres a cinco veces, dependiendo de la proteína. (Monti, E, Bassi, MT, Papini, N, Riboni, M, Manzoni, M, Veneranodo, B, Croci, G, Preti, A, Ballabio, A, Tettamanti, G y Borsani, G. (2000) Biochem J 349:343-351; Copley, RR, Russell, RB y Ponting, CP. (2001) Protein Sci 10:285-292). Aunque la semejanza global de los aminoácidos de la superfamilia de sialidasas es relativamente baja

con aproximadamente el 20-30 %, el plegamiento global de las moléculas, especialmente los aminoácidos catalíticos, es notablemente similar (Wada, T, Yoshikawa, Y, Tokuyama, S, Kuwabara, M, Akita, H y Miyagi, T. (1999) *Biochem Biophys Res Commun* 261:21-27; Monti, E, Bassi, MT, Papini, N, Riboni, M, Manzoni, M, Veneranodo, B, Croci, G, Preti, A, Ballabio, A, Tettamanti, G y Borsani, G. (2000) *Biochem J* 349:343-351; Copley, RR, Russell, RB y Ponting, CP. (2001) *Protein Sci* 10:285-292).

Las sialidasas se dividen generalmente en dos familias: las sialidasas "pequeñas" tienen un peso molecular de aproximadamente 42 kDa y no requieren iones metálicos divalentes para una actividad máxima; las sialidasas "grandes" tienen un peso molecular superior a 65 kDa y pueden requerir iones metálicos divalentes para su actividad (Wada, T, Yoshikawa, Y, Tokuyama, S, Kuwabara, M, Akita, H y Miyagi, T. (1999) *Biochem Biophys Res Commun* 261:21-27; Monti, E, Bassi, MT, Papini, N, Riboni, M, Manzoni, M, Veneranodo, B, Croci, G, Preti, A, Ballabio, A, Tettamanti, G y Borsani, G. (2000) *Biochem J* 349:343-351; Copley, RR, Russell, RB y Ponting, CP. (2001) *Protein Sci* 10:285-292).

Se han purificado más de quince proteínas sialidasas y varían mucho entre sí en las especificidades de sustrato y la cinética enzimática. Para conferir una protección de amplio espectro contra los virus de la gripe, una sialidasa necesita degradar eficazmente el ácido siálico en ambos enlaces  $\alpha(2,6)$ -Gal y  $\alpha(2,3)$ -Gal y en el contexto de glicoproteínas y algunos glicolípidos. Las sialidasas víricas, como las del *virus de la gripe A*, *virus de la peste aviar* y *virus de la enfermedad de Newcastle*, suelen ser específicas de Neu5Ac  $\alpha(2,3)$ -Gal y solo degradan Neu5Ac  $\alpha(2,6)$ -Gal de forma muy ineficaz. Las sialidasas bacterianas pequeñas generalmente reaccionan mal con el ácido siálico en el contexto de glicoproteínas y glicolípidos. Por el contrario, las sialidasas bacterianas grandes pueden escindir eficazmente el ácido siálico en ambos enlaces ( $\alpha,2-6$ ) y ( $\alpha,2-3$ ) en el contexto de la mayoría de los sustratos naturales (Figura 4; Vimr, DR. (1994) *Trends Microbiol* 2: 271-277; Drzeniek, R. (1973) *Histochem J* 5:271-290; Roggentin, P, Kleineidam, RG y Schauer, R. (1995) *Biol Chem Hoppe-Seyler* 376:569-575; Roggentin, P, Schauer, R, Hoyer, LL y Vimr, ER. (1993) *Mol Microb* 9:915-921). Debido a sus amplias especificidades de sustrato, las sialidasas bacterianas grandes son mejores candidatos.

Entre las sialidasas bacterianas grandes con especificidad de sustrato conocida, mostradas en la Figura 4, la sialidasa de *Vibrio cholerae* requiere  $Ca^{2+}$  para la actividad, por lo que es menos preferida. Las sialidasas más preferidas incluyen la enzima de 71 kDa procedente de *Clostridium perfringens*, la enzima de 113 kDa de *Actinomyces viscosus* y la sialidasa de *Arthrobacter ureafaciens*. Una tercera sialidasa, la enzima de 68 kDa de *Micromonospora viridifaciens*, se conoce por destruir el receptor del virus de la gripe (Air, GM y Laver, WG. (1995) *Virology* 211:278-284), y es también un candidato.

Estas enzimas tienen una alta actividad específica (600 U/mg de proteína para *C. perfringens* (Corfield, AP, Veh, RW, Wember, M, Michalski, JC y Schauer, R. (1981) *Biochem J* 197:293-299) y 680 U/mg de proteína para *A. viscosus* (Teufel, M, Roggentin, P. y Schauer, R. (1989) *Biol Chem Hoppe Seyler* 370:435-443)), son totalmente activas sin hierro metálico divalente, y se han clonado y purificado como proteínas recombinantes a partir de *E. coli* (Roggentin, P, Kleineidam, RG y Schauer, R. (1995) *Biol Chem Hoppe-Seyler* 376:569-575, Teufel, M, Roggentin, P. y Schauer, R. (1989) *Biol Chem Hoppe Seyler* 370:435-443, Sakurada, K, Ohta, T y Hasegawa, M. (1992) *J Bacteriol* 174: 6896-6903). Además, *C. perfringens* es estable en solución a 2-8°C durante varias semanas, y a 4°C en presencia de albúmina durante más de dos años (Wang, FZ, Akula, SM, Pramod, NP, Zeng, L y Chandran, B. (2001) *J Virol* 75:7517-27). *A. viscosus* es lábil frente a la congelación y descongelación, pero es estable a 4°C en tampón de acetato 0,1 M, pH 5 (Teufel, M, Roggentin, P. y Schauer, R. (1989) *Biol Chem Hoppe Seyler* 370:435-443).

Aunque las posibilidades de inducir reacciones inmunes utilizando sialidasas bacterianas es muy baja debido a que las proteínas serán utilizadas por vía tópica en el tracto respiratorio superior y no se absorberán sistémicamente, una enzima humana sería más deseable para un uso a largo plazo en sujetos humanos.

Hasta el momento se han clonado cuatro genes de sialidasa procedentes de ser humano: sialidasa Neu1/G9/lisosómica (Pshezhetsky, A, Richard, C, Michaud, L, Igdoura, S, Wang, S, Elsliger, M, Qu, J, Leclerc, D, Gravel, R, Dallaire, L y Potier, M. (1997) *Nature Genet* 15: 316-320, Milner, CM, Smith, SV, Carrillo MB, Taylor, GL, Hollinshead, M y Campbell, RD. (1997) *J Bio Chem* 272:4549-4558); NEU3, una sialidasa asociada a la membrana aislada a partir de cerebro humano (Wada, T, Yoshikawa, Y, Tokuyama, S, Kuwabara, M, Akita, H y Miyagi, T. (1999) *Biochem Biophys Res Commun* 261:21-27, Monti, E, Bassi, MT, Papini, N, Riboni, M, Manzoni, M, Veneranodo, B, Croci, G, Preti, A, Ballabio, A, Tettamanti, G y Borsani, G. (2000) *Biochem J* 349:343-351), NEU2 una sialidasa de 42 kDa expresada en el músculo esquelético humano a un nivel muy bajo (Monti, E, Preti, A, Nesti, C, Ballabio, A y Borsani G. (1999) *Glycobiol* 9:1313-1321) y NEU4 una proteína de 497 aminoácidos (GenBank NM080741) expresada en todos los tejidos humanos examinados (Monti, E, Preti, A, Venerando, B y Borsani, G. (2002) *Neurochem Res* 27:646-663).

Una comparación de las secuencias de aminoácidos revela que NEU2 (SEQ ID NO: 8) y NEU4 (SEQ ID NO: 9) son ambas sialidasas citosólicas. Se conservan 9 de 12 de los restos de aminoácidos que forman el sitio catalítico de la sialidasa de *S. typhimurium* tanto en NEU2 como en NEU4 (Monti, E, Preti, A, Nesti, C, Ballabio, A y Borsani G. (1999) *Glycobiol* 9:1313-1321, Figura 3). Además, NEU4 también muestra un tramo de aproximadamente 80 restos de aminoácidos (aa 294-373) que parece único entre las sialidasas conocidas de mamífero (Monti, E, Preti, A, Venerando,

B y Borsani, G. (2002) *Neurochem Res* 27:646-663). A diferencia de las grandes sialidasas bacterianas seleccionadas, la especificidad de sustrato de NEU2 y NEU4 es desconocida. Se tendrá que someter a ensayo si NEU2 y NEU4 pueden degradar eficazmente los receptores del virus de la gripe.

5 *Ensayo de sialidasa*

Las enzimas de NEU2, NEU4 y *M. viridifaciens* se almacenarán en PBS y 50 % de glicerol a -20°C. Las enzimas de *C. perfringens* y *A. viscosus* se almacenan en tampón acetato 10 mM (pH 5) a 4°C. Las preparaciones de proteínas se caracterizan por HPLC y electroforesis SDS-PAGE. Las actividades específicas y la estabilidad de las enzimas serán supervisados por el ensayo de sialidasa.

La actividad enzimática de las sialidasas se determina con ácido 2'-(4-metilumbeliferil)-alfa-D-N-acetilneuramínico (4MU-NANA) (Sigma) fluorimétrico como sustrato. Específicamente, las reacciones se establecen por duplicado en tampón citrato de sodio 0,1 M/fosfato pH 5,6, en presencia de 400 microgramos de albúmina sérica bovina, con 4MU-NANA 0,2 mM, con un volumen final de 100 microlitros, y se incuban a 37°C durante 5-10 minutos. Las reacciones se detienen mediante la adición de 1 ml de glicina 0,2 M/NaOH pH 10,2. La emisión de fluorescencia se mide en un fluorómetro con excitación a 365 nm y emisión a 445 nm, usando 4-metilumbeliferona (4-MU) para obtener una curva de calibración.

20 *Ejemplo 5: Comparación de las funciones de las sialidasas in vitro y selección de una sialidasa para estudios posteriores.*

1. Reservas de virus de la gripe

25 Las cepas víricas de la gripe se obtienen a partir de la ATCC y el depósito del hospital St. Jude Children's Research Hospital. Las reservas víricas se cultivan sobre células de riñón canino Madin-Darby (MDCK) en medio esencial mínimo (MEM) complementado con 0,3 % de albúmina de suero bovino y 0,5 microgramos de tripsina por ml. Después de incubar durante 48 a 72 horas, el medio de cultivo se aclara mediante centrifugación a velocidad baja. Las partículas víricas se sedimentan por ultracentrifugación a través de una almohadilla de sacarosa al 25 %. Los virus purificados se suspenden en tampón Tris 0,1 M-50 % de glicerol (pH 7,3) y se almacenan a -20°C. El título vírico se determina mediante ensayo en placa (Tobita, K, Sugiura, A, Enomoto, C y Furuyama, M. (1975) *Med Microbiol Immunol* 162: 9-14), o TCID<sub>50</sub>, que es la dosis de virus requerida para infectar 50 % de las células MDCK.

35 Cepas de la gripe A humanas y animales seleccionadas con especificidad hacia Neu5Ac alfa(2,6)-Gal o Neu5Ac alfa(2,3)-Gal y que tienen una afinidad elevada hacia los receptores (medida por una actividad de hemaglutinación elevada) son elegidas para las pruebas *in vitro*:

1. Las cepas que reconocen el receptor Neu5Ac alfa(2,6)-Gal incluyen los aislados humanos A/aichi/2/68, A/Udm/307/72, A/Prot Chaimers/1/73 y A/Victoria/3/75, etc. (Connor, RJ, Kawaoka, Y, Webster, RG y Paulson JC. (1994) *Virology* 205:17-23).

2. Las cepas que tienen especificidad hacia Neu5Ac alfa(2,3)-Gal incluyen los aislados animales A/duckUkraine/1/63, A/duckMemphis/928/74, A/duckhokk/5/77, A/Equ/Miami/1/63, A/Equ/Ur/1/63, A/Equ/Tokio/71, A/Equ/Prague/71, etc. (Connor, RJ, Kawaoka, Y, Webster, RG y Paulson JC. (1994) *Virology* 205:17-23).

2. Ensayo de hemaglutinación

Este ensayo se utiliza para determinar rápidamente la eficacia de cada enzima para destruir los receptores Neu5Ac alfa(2,6)-Gal y Neu5Ac alfa(2,3)-Gal.

Específicamente, se diluyen 6 ml de glóbulos rojos de pollo (SPAFAS Inc., Norwich, CT) en dos veces el volumen de PBS, se centrifugan durante 5 min a 500 x g y se resuspenden en PBS con el volumen original. Las sialidasas se añaden a los eritrocitos de pollo a diversas concentraciones y se permite incubar a temperatura ambiente durante 30 min. Las células se lavan después tres veces para eliminar las proteínas sialidasas, y luego se resuspenden en PBS hasta 6 ml. Las células de control se incuban con BSA y se lavan. Varias cepas del virus de la gripe, que reconocen ya sea Neu5Ac alfa(2,6)-Gal como Neu5Ac alfa(2,3)-Gal como receptor como se ha indicado anteriormente, se preparan en placas de microtitulación como diluciones en serie en PBS (100 microlitros) de las reservas víricas originales. Las suspensiones de eritrocitos de pollo tratadas con sialidasa o controles (100 microlitros de la solución al 0,5 % preparada anteriormente) se añaden a cada pocillo a 4°C. Las placas se leen después de 2 h. La menor concentración de virus que hace que la célula sanguínea se aglutine, se define como una unidad de hemaglutinación. Estamos buscando enzimas que inhiben eficazmente la hemaglutinación para todas las cepas víricas.

3. Ensayo de inhibición vírica

Monocapas confluentes de células MDCK se tratan con diversas concentraciones de sialidasas durante 1 h, se lavan dos veces con tampón, a continuación se infectan con varias cepas de virus de la gripe. Después de la incubación durante 1 h, las células se lavan de nuevo para eliminar el virus no unido. Para estimar la disminución de los sitios de unión vírica en la superficie celular, las células se recubren con agar y se incuban a 37°C. El número de placas en las células tratadas con sialidasa se compara con el de las células de control. Como alternativa, las células se cultivan en medio regular a 37°C, y los títulos víricos en los medios de cultivo se miden en diversos momentos durante el cultivo como TCID<sub>50</sub>.

Para demostrar que el tratamiento con sialidasas puede inhibir una infección preexistente, monocapas de MDCK se infectan primero con un título bajo de virus. Después de eliminar por lavado los virus no unidos, las células se cultivan a continuación en presencia de una sialidasa. Se añade sialidasa de nuevo aporte al cultivo de células a las 24 h. El título vírico en el medio de cultivo se mide durante un período de 72 horas.

#### 4. Ensayo de citotoxicidad

Las células epiteliales bronquiales humanas primarias se compran (Clonetics) y se cultivan en medio mínimo complementado según las instrucciones del fabricante. Las sialidasas se añaden al medio de cultivo con diversas concentraciones. El crecimiento celular durante un período de 7-10 días será medido. También se observan regularmente las células para estudiar los efectos citopáticos microscópicos.

#### *Ejemplo 6: Construcción y prueba de las proteínas de fusión de sialidasa.*

##### 1. Selección de una secuencia que se une a GAG como dominio de anclaje.

Se selecciona una sialidasa por sus mejores propiedades generales, incluyendo la actividad antivírica, la toxicidad, la estabilidad, la facilidad de producción, etc. A continuación, queremos ligarla genéticamente a una secuencia, que se une a GAG, subclonar los genes de fusión en el vector pQE, expresar y purificar las proteínas de fusión de *E. coli*.

Seleccionamos seis posibles secuencias humanas que se unen a GAG: PF4 (aa 47-70) (SEQ ID NO:2), IL-8 (aa 46-72) (SEQ ID NO:3), AT III (aa 118-151) (SEQ ID NO:4), ApoE (aa 132-165) (SEQ ID NO:5), proteína celular migratoria asociada a angio humana (AAMP) (aa 14-25/SEQ ID NO: 6) y anfirregulina (aa 125-145) (SEQ ID NO: 7) (Figura 2). Estas secuencias generalmente se unen a la heparina con afinidades a nivel nanomolar; sin embargo, sus afinidades pueden variar entre sí en un orden de magnitud (Tabla 1). Dado que no está claro qué dominio de anclaje permitirá el funcionamiento más eficaz de la sialidasa, las cuatro secuencias que se unen a GAG están fusionadas con el gen de la sialidasa, ya sea en el extremo N-terminal o el extremo C-terminal, a través de una secuencia enlazadora genérica GGGGS como las siguientes construcciones:

(dominio que se une a GAG-GGGGS(SEQ ID NO: 10)-Sialidasa); o

(Sialidasa-GGGGS(SEQ ID NO: 10)-dominio que se une a GAG)

Las diferentes proteínas de fusión se comparan mediante un ensayo de inhibición vírica modificado. Específicamente, monocapas confluentes de células MDCK se tratan con una cantidad igual de cada proteína de fusión, con una duración limitada, como 30 min. Las células se lavan después dos veces con tampón para eliminar las proteínas de fusión de sialidasa no unidas, y se incuban en medio de cultivo durante 1 hora adicional. Después, se añaden las cepas de virus de la gripe a las células durante 1 hora y después las células se lavan de nuevo para eliminar el virus no unido. Los títulos víricos en los medios de cultivo se miden durante los cultivos de 72 h como TCID<sub>50</sub>. La proteína sialidasa no fusionada se utiliza para comparar las proteínas de fusión en este ensayo. Si los resultados son demasiado próximos para clasificar todas las proteínas de fusión, haremos el ensayo más riguroso acortando la ventana de tratamiento para las proteínas de fusión, reduciendo las concentraciones de proteínas y aumentando el nivel de estimulación vírica.

##### 2. Optimización de la construcción de la proteína de fusión

Después de seleccionar la mejor proteína de fusión a partir de los experimentos anteriores, la construcción se optimiza aún más sometiendo a ensayo la diferente longitud del enlazador. A este respecto, se preparan las siguientes construcciones:

(Sialidasa-(GGGGS(SEQ ID NO:10))<sub>n</sub> (n=0, 1, 2, 3 o 4) -dominio que se une a GAG)

Las proteínas se expresan y se purifican, y se comparan en el ensayo de protección vírica modificado como se ha descrito anteriormente.

Además, si los datos anteriores indican que una mayor afinidad de la proteína de fusión hacia el sulfato de heparán (HS, de las siglas en inglés) proporciona una potencia mejor, también planeamos someter a ensayo si la potencia se puede mejorar aún más mediante el aumento de la afinidad de la unión a GAG. Esto se puede lograr mediante la creación de un mecanismo de unión a GAG multivalente en la proteína de fusión, en construcciones tales como las siguientes:

(Sialidasa-(GGGGS(SEQ ID NO:10))n-dominio que se une a HS-dominio que se une a GAG); o:

(dominio que se une a GAG-(GGGGS(SEQ ID NO:10))n-Sialidasa-(GGGGS(SEQ ID NO:10))n-dominio que se une a GAG)

5 Las proteínas de fusión purificadas se clasifican en base a sus actividades en el ensayo de protección vírica modificado como se ha descrito anteriormente.

### 3. Ensayo de la citotoxicidad

10 Los efectos de las proteínas de fusión sobre el crecimiento celular normal y la morfología de las células se controlan mediante el cultivo de células epiteliales bronquiales humanas primarias con varias concentraciones de las proteínas de fusión y siguiendo la curva de crecimiento de las células y observando los efectos citopáticos microscópicos.

#### 15 *Ejemplo 7: Proteínas de fusión contra otros microbios infecciosos*

Las proteínas de fusión compuestas de un dominio funcional y un dominio de anclaje están diseñadas para muchas más aplicaciones diferentes. Por ejemplo, una proteína de fusión de sialidasa tal como se propone en esta memoria, también se puede utilizar como agente terapéutico/profiláctico contra infecciones de otros virus y bacterias, además de los virus de la gripe, porque muchos otros microbios infecciosos, tales como paramixovirus (Wassilewa, L. (1977) Arch Virol 54:299-305), coronavirus (Vlasak, R., Luytjes, W., Spaan, W. y Palese, P. (1988) Proc Natl Acad Sci USA 85:4526-4529), rotavirus (Fukudome, K., Yoshie, O. y Konno, T. (1989) Virology 172:196-205) y *Pseudomonas aeruginosa* (Ramphal, R. y Pyle, M. (1983) Infect Immun 41:339-44), etc., también son conocidos por utilizar ácido siálico como receptores celulares. Por ejemplo, la aprotinina fusionada con un dominio de unión a heparina puede preparar una proteína de fusión que se usa para prevenir/tratar una infección de otros virus, además de la gripe, que requieren proteasas de serina del hospedador para la activación, tales como el virus paragripal.

#### *Ejemplo 8. Clonación de proteínas de fusión con dominio catalítico de sialidasa*

30 De acuerdo con la bibliografía publicada sobre las grandes sialidasas bacterianas, la sialidasa de 51 kDa de *Arthrobacter ureafaciens*, la sialidasa de 71 kDa de *Clostridium perfringens* y la sialidasa de 113 kDa de *Actinomyces viscosus* parecen tener actividades específicas similares y una amplia especificidad de sustrato hacia diversos conjugados de ácido siálico (Biology of the Sialic Acids (1995), 270-273; Corfield *et al.*, Biochem. J., (1981) 197(2), 293-299; Roggentin *et al.*, Biol. Chem. Hoppe Seyler, (1995) 376(9), 569-575; Teufel *et al.*, Biol. Chem. Hoppe Seyler, (1989) 370(5), 435-443). Una tercera sialidasa, la enzima de 68 kDa de *Micromonospora viridifaciens*, también era conocida por destruir el receptor vírico de la gripe (Air y Laver, Virology, (1995) 211(1), 278-284; (1995), 270-273).

40 *A. viscosus* forma parte de la flora normal de la cavidad oral humana y el tracto gastrointestinal (Sutter, Rev. Infect. Dis., (1984) 6 Supl 1, pág. 62-66). Dado que la sialidasa de *A. viscosus* es secretada normalmente por la bacteria alojada en la superficie de la mucosa humana, debe ser tolerada por el sistema inmune de la mucosa humana. Por lo tanto, es poco probable que la sialidasa de *A. viscosus* sea inmunogénica cuando se administra por vía tópica a la superficie de las vías respiratorias humanas. Pensamos que esta característica hace que la sialidasa de *A. viscosus* sea un buen candidato para un agente terapéutico.

45 Se determinó que un fragmento de la sialidasa de *A. viscosus*, que se extiende desde el aminoácido 274 hasta el aminoácido 667, debe contener el dominio catalítico (referido como AvCD) de la sialidasa y debe ser completamente activo por sí mismo. Más tarde clonamos el fragmento AvCD y demostramos que este fragmento AvCD y otros fragmentos de la sialidasa de *A. viscosus* que comprenden al menos los aminoácidos 290-666 de la secuencia proteica de la sialidasa de *A. viscosus* (SEQ ID NO: 12), tal como el fragmento que se extiende desde el aminoácido 274 hasta el aminoácido 681, el fragmento que se extiende desde el aminoácido 274 hasta el aminoácido 666, el fragmento que se extiende desde el aminoácido 290 hasta el aminoácido 666 y el fragmento que se extiende desde el aminoácido 290 hasta el aminoácido 681, tienen actividad sialidasa.

55 La secuencia completa de la proteína y el gen de la sialidasa de *A. viscosus* se exponen en SEQ ID NOS: 11 y 12, respectivamente. Basándonos en la homología con sialidasas con estructuras 3D conocidas (*M. viridifaciens* y *S. typhimurium*), establecimos que la secuencia del dominio catalítico (CD) se encontraba entre los aminoácidos 274-667 (SEQ ID NO: 16). Para clonar el dominio catalítico de la sialidasa de *A. viscosus* (AvCD), esta región del gen de la sialidasa de *A. viscosus* se modificó genéticamente con codones optimizados para la expresión en *E. coli* (SEQ ID NO: 15). La secuencia de nucleótidos de AvCD con codones optimizados que codificaba los aminoácidos 274-667 de la sialidasa de *A. viscosus* (SEQ ID NO: 15) se produjo por síntesis química de oligonucleótidos solapantes que se asociaron, se amplificaron por PCR y se clonaron en el vector de expresión pTrc99a (Amersham, Nueva Jersey, EE.UU.).

65 Las construcciones de fusión de sialidasa se prepararon utilizando métodos convencionales de clonación molecular. La construcción His<sub>6</sub>-AvCD se preparó mediante la fusión de seis histidinas (His<sub>6</sub>) con el resto N-terminal de la



secuencia de AvCD. La construcción His<sub>6</sub>-AvCD tiene la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 28 y la secuencia de aminoácidos traducida de SEQ ID NO: 27. Estas secuencias se representan en la Figura 5.

Para preparar la construcción AR-AvCD, un dominio de anclaje se fusionó directamente con el resto N-terminal de la secuencia de AvCD. El dominio de anclaje, conocido como AR, se había obtenido a partir de la secuencia que se une a GAG del precursor de la anfirregulina humana (GenBank n.º AAH09799). Las secuencias de nucleótidos que codificaban los aminoácidos 125 a 145 (Figura 2, SEQ ID NO: 7) del precursor de la anfirregulina humana se sintetizaron químicamente como dos oligonucleótidos solapantes. La construcción AR-AvCD tiene la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 18 y la secuencia de aminoácidos traducida de SEQ ID NO: 19.

Otra construcción, AR-G4S-AvCD, se preparó mediante la fusión de la misma secuencia que codificaba AR, utilizada en la construcción AR-AvCD con una secuencia que codificaba un enlazador de cinco aminoácidos (GGGGS; SEQ ID NO: 10), que a continuación, se fusionó con la secuencia de AvCD, de tal manera que en un producto de traducción, el enlazador estaba fusionado con el extremo N-terminal del dominio catalítico de la sialidasa de *A. viscosus*. La secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 36) y la secuencia de aminoácidos traducida (SEQ ID NO: 37) de esta construcción se representan en la Figura 7. Todas las construcciones se clonaron en el vector de expresión pTrc99a.

Además, se prepararon cuatro construcciones en las que el dominio catalítico de la sialidasa de *A. viscosus* se fusionó con el extremo N-terminal de la AR (dominio que se une a GAG de la anfirregulina humana; SEQ ID NO: 7). En la construcción n.º 4 (SEQ ID NO: 21), el dominio catalítico de la sialidasa de *A. viscosus* consistía en los aminoácidos 274-666 de SEQ ID NO: 12 fusionados con el dominio que se une a GAG de la anfirregulina (SEQ ID NO: 7). En la construcción n.º 5 (SEQ ID NO: 23), el dominio catalítico de la sialidasa de *A. viscosus* consistía en los aminoácidos 274-681 de SEQ ID NO: 12 fusionados con el dominio que se une a GAG de la anfirregulina (SEQ ID NO: 7). En la construcción n.º 6 (SEQ ID NO: 25), el dominio catalítico de la sialidasa de *A. viscosus* consistía en los aminoácidos 290-666 de SEQ ID NO: 12 fusionados con el dominio que se une a GAG de la anfirregulina (SEQ ID NO: 7). En la construcción n.º 7 (SEQ ID NO: 27), el dominio catalítico de la sialidasa de *A. viscosus* consistía en los aminoácidos 290-681 de SEQ ID NO: 12 fusionados con el dominio que se une a GAG de la anfirregulina (SEQ ID NO: 7). Todas estas construcciones muestran una actividad sialidasa comparable en los ensayos.

#### 30 *Ejemplo 9: Producción de proteínas de fusión con dominio catalítico de sialidasa*

Para producir las proteínas de fusión de sialidasa, las construcciones de expresión se transformaron en *E. coli* BL21. Una sola colonia se inoculó en 2,5 ml de caldo de cultivo LB y se cultivó durante una noche a 37°C con agitación. Por la mañana se inocularon 2 ml del cultivo de una noche en 500 ml de medio TB en un matraz de agitación de 2 litros y el cultivo se dejó crecer hasta una DO<sub>600</sub> = 4,0 (2-4 horas) a 37°C con agitación. La expresión de las proteínas se indujo mediante la adición de IPTG hasta tener una concentración final de 1 mM y continuó durante 3 h con agitación. Las células se recogieron por centrifugación a 5.000 x g durante 10 min. Las células se lavaron una vez (se resuspendieron en PBS y se centrifugaron de nuevo) y se resuspendieron en 15 ml de tampón de lisis.

40 Composiciones de los medios y los tampones utilizados en la expresión y purificación de proteínas.  
Medio TB para la expresión de proteínas

#### Solución 1

45 Bacto-triptona - 12 g  
Extracto de levadura - 24 g  
H<sub>2</sub>O hasta 800 ml

#### 50 Solución 2

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (anhidro) – 2,3 g  
K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (anhidro) -12,5 g  
H<sub>2</sub>O hasta 100 ml

55 Las soluciones 1 y 2 se sometieron a autoclave por separado, se enfriaron, mezclaron y se añadió lo siguiente:

60 ml de glicerol al 20 % (esterilizado por filtración)  
20 ml de glucosa al 20 % (esterilizada por filtración)

#### 60 Tampón de lisis

Fosfato 50 mM, pH 8,0  
10 % de glicerol  
NaCl 300 mM

Las células bacterianas suspendidas en tampón de lisis se lisaron mediante ultrasonidos y los restos celulares se separaron por centrifugación. El lisado clarificado se pasó a través de una columna de SP-Sefarosa (volumen de lecho 15 ml, caudal 120 cm/hora). La columna se acondicionó de nuevo con un pH y sal menores, con un volumen de PBS para asegurar una buena retención de Fludase durante la eliminación de la endotoxina. La endotoxina se eliminó por lavado de la columna con 5 volúmenes de PBS que contenía 1 % de Triton X-100, 0,5 % de desoxicolato de sodio y 0,1 % de SDS. Los detergentes se eliminaron por lavado con 3 volúmenes de PBS y 3 volúmenes de tampón de lisis. Las proteínas se eluyeron de la columna con tampón de lisis que contenía NaCl 0,8 M. La fracción eluída de SP-Sefarosa se ajustó a  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1,9 M (la mayoría de las proteínas contaminantes se extraen con sales en esta etapa) y se clarificó mediante centrifugación. El material sobrenadante se cargó en la columna de butil-Sefarosa (caudal de 120 cm/hora). La columna se lavó con 2 volúmenes de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1,3 M y la fusión se eluyó con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0,65 M. Para la etapa final, se realizó una cromatografía de exclusión por tamaño en Sephacryl S-200 equilibrada con tampón PBS, con un caudal de 25 cm/hora. La actividad sialidasa se determinó frente a 4-MU-NANA como se describe en el siguiente párrafo. La concentración de proteína se determinó utilizando el kit Bradford de Bio-Rad. La pureza de la proteína se determinó por SDS-PAGE y se estimó que era >98 %. La actividad específica de la enzima era de aproximadamente 937 U/mg. La endotoxina en las preparaciones finales se midió mediante la prueba LAL (Cambrex) y se estimó que era <0,5 EU/ml.

Para la purificación de la proteína de fusión que contenía His6, el intercambio catiónico de SP-Sefarosa fue reemplazado por cromatografía de afinidad de metal quelato sobre Ni-NTA. Todos los tampones siguieron siendo los mismos con la excepción de que la elución de Ni-NTA se realizó mediante imidazol 0,25 M en tampón de lisis.

*Ejemplo 10: Ensayo con sialidasa para medir la actividad de las proteínas de fusión con dominio catalítico de sialidasa*

La actividad sialidasa de la proteína AR-AvCD codificada por la construcción n.º 2 se sometió a ensayo y se comparó con la de sialidasas naturales purificadas a partir de *C. perfringens* (Sigma, St. Louis, MO) y *A. ureafaciens* (Prozyme, San Leandro, CA). Además, una proteína de fusión producida a partir de una construcción en la que la secuencia GAG de anfirregulina (SEQ ID NO: 7) se había fusionado con sialidasa humana Neu 2 (SEQ ID NO: 8), también se sometió a ensayo para estudiar la actividad sialidasa.

La actividad sialidasa expresada como unidades por mg de sialidasa se midió con el ensayo de sialidasa usando el sustrato fluorogénico artificial 4-MU-NANA (Sigma). Una unidad de sialidasa se define como la cantidad de enzima que libera 10 nmol de MU a partir de 4-MU-NANA en 10 min a 37°C (tampón  $\text{CH}_3\text{COOH}$  50 mM - NaOH, pH 5,5) en una reacción que contiene 20 nmol de 4-MU-NANA en un volumen de 0,2 ml. Las reacciones se detienen mediante la adición de 1 ml de glicina 0,2 M/NaOH pH 10,2. La emisión de fluorescencia se mide en un fluorómetro con excitación a 365 nm y emisión a 445 nm, usando 4-metilumbeliferona (4-MU) para obtener una curva de calibración (Potier *et al.*, Anal. Biochem., (1979) 94(2), 287-296).

Tabla 2. Actividad específica de las sialidasas (unidades por mg).

Sialidasa	Actividad específica
AR-NEU2	8
AR-AvCD	937
<i>C. perfringens</i>	333
<i>A. ureafaciens</i>	82

Nuestros resultados muestran que la proteína de fusión AvCD (AR-AvCD) tiene la mayor actividad específica entre todas las sialidasas sometidas a ensayo (Tabla 2). La actividad específica de AR-AvCD es más de 100 veces mayor que la de una fusión de sialidasa humana (AR-NEU2), y más de dos veces mayor que la de la sialidasa de *C. perfringens*. Los resultados experimentales que comparan la estabilidad de las sialidasas indican una estabilidad muy alta de AR-AvCD: No se detectó una pérdida de actividad para AR-AvCD después de 20 semanas a 25°C o a 4°C en solución. En comparación, la solución AR-NEU2 mostraba una semivida de 5 y 2 semanas cuando se almacenaba a 25°C y 37°C, respectivamente.

*Ejemplo 11: Optimización del extremo N-terminal de las proteínas de fusión con dominio catalítico de sialidasa*

El extremo N-terminal de la proteína de fusión AR-AvCD se escindió parcialmente bajo ciertas condiciones que dieron lugar a pequeños grados de heterogeneidad proteica en la preparación de AR-AvCD purificada. Para resolver este problema, diseñamos un enfoque para optimizar el extremo N-terminal de la construcción de fusión de sialidasa. Una genoteca que contenía AR-AvCD con aminoácidos al azar en el extremo N-terminal se construyó del modo siguiente. AR-AvCD se amplificó por PCR utilizando una pareja de cebadores en la que el cebador que se asociaba en el extremo 5' del gen, contenía una secuencia al azar en las posiciones correspondientes a los aminoácidos 2 y 3. La secuencia de nucleótidos del cebador y la secuencia de aminoácidos codificada se muestran abajo.

tttcgtctcccatgvnnvnnaagcgcaaaaaaaaaaggcgga (SEQ ID NO:32)  
MetXxxXxxLysArgLysLysLysGlyGly (SEQ ID NO:33)

5 En SEQ ID NO: 32, "n" representa cualquier nucleótido (a, c, g o t) y "v" significa los nucleótidos a, g o c. Diseñando la secuencia de una forma (sin permitir el nucleótido t en la primera posición de los codones) evitamos la introducción de codones de parada y también de aminoácidos aromáticos (Phe, Tyr, Trp) y Cys. El sitio de la endonucleasa de restricción *Esp31* (mostrado en negrita) se introdujo para permitir la generación de un extremo protuberante compatible con *NcoI*. La reasociación del cebador con el extremo 3' del gen era portadora de un sitio *HindIII* después del codón de parada. El producto de la PCR se digirió con *Esp31 – HindIII*, se ligó en el vector de expresión pTrc99a digerido con *NcoI - HindIII*. La mezcla de ligación se transformó en *E. coli* y las células se cultivaron durante una noche en un cultivo líquido que contenía ampicilina.

15 Al día siguiente, el cultivo se diluyó con medio fresco, se cultivó hasta tener una  $DO_{600} = 0,8$  y se indujo con IPTG durante 2 horas. Las células se recogieron, se homogeneizaron y las fusiones se sometieron a purificación en dos etapas mediante cromatografía líquida. El lisado clarificado se cargó en SP-Sefarosa equilibrada con tampón de lisis (HEPES 50 mM, pH 8,0, NaCl 0,3 M, 10 % de glicerol). La columna se lavó con NaCl 0,45 M y las fusiones se eluyeron con NaCl 0,9 M. El material eluído se diluyó con glicerol al 10 % para llevar la concentración de NaCl a 0,2 M y se cargó en una columna de heparina-Sefarosa. La columna se desarrolló con un gradiente lineal de NaCl. Las fracciones que contenían actividad sialidasa se determinaron en SDS-PAGE, se sometieron a electrotransferencia sobre una membrana de PVDF y la banda de 43 kDa se sometió a secuenciación amino-terminal.

20 Los restos N-terminales predominantes de la proteína de fusión de sialidasa aislada eran Val o Gly seguidos por los restos N-terminales del marcador AR. A continuación, sintetizamos nuevas construcciones de fusión de sialidasa, las construcciones n.º 2 y n.º 3, mediante la introducción de una Val en frente de la secuencia de AR, de tal manera que los primeros seis aminoácidos codificados por las construcciones n.º 2 y n.º 3 eran (Met-Val-Lys-Arg Lys-Lys (SEQ ID NO: 17)). La secuenciación N-terminal de proteínas realizada a partir de estas nuevas construcciones de fusión, mostró 100 % de homogeneidad con la Met de iniciación eliminada por completo (lo que es deseable para las proteínas terapéuticas) y siendo Val el primer resto N-terminal seguido por la secuencia del marcador AR. Estos datos son compatibles con las publicaciones anteriores que informaban de las normas comunes de procesamiento N-terminal y la estabilidad proteica como una función del resto de aminoácido N-terminal de la proteína (Hirel *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., (1989) 86(21), 8247-8251; Varshavsky, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A, (1996) 93(22), 12142-12149).

35 Las secuencias de nucleótidos de una nueva construcción de fusión n.º 2 (AR-AvCD con N-terminal optimizado) (SEQ ID NO: 18) y la traducción de su secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 19) se representan en la Figura 6. Las secuencias de nucleótidos de la nueva construcción de fusión n.º 3 (AR-G4S-AvCD con extremo N-terminal optimizado) (SEQ ID NO: 36) y la traducción de su secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 37) se representan en la Figura 7. La secuencia de aminoácidos de las proteínas procesadas, aisladas a partir de *E. coli* infectada con la construcción n.º 2, se proporciona en este documento como SEQ ID NO: 38 y la secuencia de aminoácidos de las proteínas procesadas, aisladas a partir de *E. coli* infectada con la construcción n.º 3, se proporciona en este documento como SEQ ID NO: 39.

#### Ejemplo 12: Comparación de las actividades de las construcciones de sialidasa con o sin un dominio de anclaje

45 Para evaluar si la secuencia de AR de hecho mejora la actividad de la superficie celular de una proteína de fusión de sialidasa, incubamos las proteínas purificadas a partir de *E. coli* que se habían transformado con la construcción n.º 2; SEQ ID NO: 18, representada en la Figura 6) o la construcción n.º 1 (His<sub>6</sub>-AvCD; SEQ ID NO: 28, representada en la Figura 5) con células epiteliales bronquiales humanas primarias y la actividad sialidasa unida a las células se midió después de un lavado a fondo. Para las células incubadas con la proteína de la construcción n.º 2 (SEQ ID NO: 19), se encontró que hasta un 10 % de la sialidasa estaba unida a las células, y la actividad sialidasa unida a las células aumentó de una manera dependiente de la dosis con la concentración de entrada de la proteína de la construcción n.º 2. Sin embargo, las células incubadas con la proteína de la construcción n.º 1 (SEQ ID NO: 29) solamente mostraron un nivel de fondo de actividad sialidasa. Además, tratamos las células MDCK con la proteína de la construcción n.º 2 o la proteína de la construcción n.º 1 y medimos el nivel residual de ácido siálico ligado a  $\alpha(2,6)$  en la superficie de las células (Figura 8). Con niveles iguales de actividad enzimática por debajo de 100 mU por pocillo, la proteína de la construcción n.º 2 mostraba una potencia significativamente mayor que la proteína de la construcción n.º 1. Estos resultados indican que el dominio AR de hecho mejora la función de la sialidasa.

#### Ejemplo 13: Actividades in vitro de proteínas de fusión de sialidasa

##### 60 Reservas de virus de la gripe

Cepas víricas de la gripe se obtuvieron a partir de la ATCC y el repositorio del hospital St. Jude Children's Research Hospital. Todos los experimentos con virus de la gripe se llevan a cabo con nivel de Bioseguridad II.

Los virus se propagan en células de riñón canino Madin-Darby (MDCK) en medio esencial mínimo (MEM), complementado con 0,3 % de albúmina de suero bovino y 0,5 microgramos de tripsina por ml. Después de incubar durante 48 a 72 horas, el medio de cultivo se clarifica por centrifugación a velocidad baja. Las partículas víricas se sedimentan por ultracentrifugación a través de una almohadilla de sacarosa al 25 %. Los virus purificados se suspenden en tampón Tris 0,1 M-50 % de glicerol (pH 7,3) y se almacenan a -20°C.

#### Ensayo de protección celular

Para evaluar la capacidad de la proteína de la construcción n.º 2 AR-AvCD para proteger las células frente al virus de la gripe, primero tratamos las células MDCK con AR-AvCD preparado a partir de la construcción n.º 2 o una sialidasa bacteriana de amplio espectro aislada a partir de *A. ureafaciens*, y estimulamos las células con una amplia selección de virus humanos de la gripe (IFV), incluyendo los subtipos H1, H2 y H3 del IFV A humano, IFV B humano, así como una cepa de IFV aviar. Como se muestra en la Figura 9, la proteína de fusión preparada a partir de la construcción n.º 2 mostraba 80 a 100 % de protección celular, lo que era comparable con el efecto de la sialidasa de *A. ureafaciens*.

Para realizar el ensayo, las células MDCK se trataron con 10 mU de proteína AR-AvCD (preparada usando la construcción n.º 2) o la sialidasa aislada a partir de *A. ureafaciens* a 37°C durante 2 horas. Las células se estimularon posteriormente con virus de la gripe con MOI 0,1 durante 1 hora. Las células se lavaron y se incubaron en DMEM:F12 de nuevo aporte, complementado con 0,2 % de ITS (GIBCO) y 0,6 µg/ml de tripsina acetilada (Sigma). Las células se tiñeron con 0,5 % de cristal violeta y 20 % de metanol durante 5 min y se enjuagaron con agua corriente. El nivel de células viables en cada pocillo se cuantificó mediante una extracción de cristal violeta con etanol al 70 % y lectura a 570 nm. La protección celular se calculó en  $100 \times \frac{\text{(muestra tratada con sialidasa - solamente virus)}}{\text{(muestra sin infectar - solo virus)}}$ .

#### Ensayo de inhibición de IFV

Evaluamos la inhibición de la amplificación de IFV mediante la proteína AR-AvCD (preparada utilizando la construcción n.º 2) y la proteína AR-G<sub>4</sub>S-AvCD (preparada utilizando la construcción n.º 3) utilizando un método ELISA basado en células (Belshe *et al.*, *J Virol.*, (1988) 62(5), 1508-1512).

Para realizar el ensayo, se trataron monocapas de MDCK en placas de 96 pocillos con 16 mU de las sialidasas AR-AvCD preparadas a partir de la construcción n.º 2 o AR-G<sub>4</sub>S-AvCD preparada a partir de la construcción n.º 3 en tampón EDB/BSA (acetato de sodio 10 mM, NaCl 150 mM, CaCl<sub>2</sub> 10 mM, MgCl<sub>2</sub> 0,5 mM y 0,5 % de BSA) durante 2 horas a 37°C. Tanto las células tratadas con sialidasa como las no tratadas (tratadas solo con tampón EDB/BSA) se infectaron con MOI 0,1 de virus. Después de 1 hora, las células se lavaron dos veces con PBS y se incubaron en DMEM:F12 complementado con 0,2 % de ITS (Gibco) y 0,6 µg/ml de tripsina acetilada (Sigma). De cuarenta a 48 horas después de la infección, se determinaron los niveles de virus unido a las células usando un ensayo ELISA basado en células. Específicamente, las células se fijaron en glutaraldehído al 0,05 % en PBS y se incubaron con 50 µl de una dilución 10<sup>3</sup> de cualquier antisuero NP anti-gripe A o anti-gripe B (Fitzgerald Inc.) en 0,5 % de BSA y PBS a 37°C durante 1 h. Después del lavado, cada pocillo se incubó con HRP-proteína G en 0,5 % de BSA y PBS durante 1 hora. Después de los lavados finales, 50 µl de citrato de sodio 25 mM (pH 4,5) que contenía 0,02 % de dihidrocloruro de 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (Sigma) y peróxido de hidrógeno al 0,01 % se dejaron reaccionar con las células a temperatura ambiente durante 5 min. Las reacciones se detuvieron mediante la adición de 50 µl de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 M, y se cuantificaron mediante la medición de las densidades ópticas a 450 nm. El porcentaje de inhibición de la replicación vírica se calcula por el  $100 \% \times \frac{\text{(muestras solo de virus - muestras tratadas con sialidasa)}}{\text{(muestras solo de virus - muestras no infectadas)}}$ .

Los datos sobre la CE<sub>50</sub> de inhibición de la replicación vírica y de protección celular y los índices selectivos para las proteínas de fusión recombinantes de sialidasa, AR-AvCD, preparada a partir de la construcción n.º 2 y AR-G<sub>4</sub>S-AvCD, preparada a partir de la construcción n.º 3, para una variedad de virus de la gripe A y B humana, así como virus equinos, se muestran en la Figura 12.

Como se muestra en la Figura 10, las proteínas de fusión de sialidasa inhibían fuertemente la amplificación de una amplia selección de virus de la gripe. En especial, se logró una inhibición vírica del 80-100 % (Figura 10), así como una protección celular (Figura 9) aunque se había eliminado un máximo de 70-80 % del ácido siálico de la superficie celular mediante el tratamiento con sialidasa (Figura 8). Este hallazgo demuestra que no es necesario eliminar completamente el ácido siálico de la superficie celular, con el fin de lograr el efecto terapéutico deseado del tratamiento con las proteínas de fusión sialidasa de la presente invención. El 20-30 % restante de ácido siálico de la superficie, aunque es inaccesible para las proteínas de fusión de sialidasa, es probablemente también inaccesible para los virus de la gripe.

#### Citotoxicidad de las proteínas de fusión de sialidasa

Para evaluar la citotoxicidad de las proteínas AR-AvCD o AR-G<sub>4</sub>S-AvCD (preparadas a partir de las construcciones n.º 2 y n.º 3), las células MDCK se sembraron con baja densidad en placas de 96 pocillos y se cultivaron durante 5 días en DMEM que contenía 10 % de FBS y hasta 20 U de proteína AR-AvCD o proteína AR-G<sub>4</sub>S-AvCD por pocillo

(ambas sialidasas permanecieron totalmente activas durante todo el experimento). La densidad celular en los pocillos tratados con AR-AvCD o AR-G<sub>4</sub>S-AvCD o los pocillos de control se determinó cada día mediante la tinción de las células con cristal violeta y midiendo la absorción a 570 nm. No se observó una inhibición del crecimiento celular, incluso con la mayor concentración de AR-AvCD o AR-G<sub>4</sub>S-AvCD (100 U/ml) en el cultivo. Por lo tanto, la CI<sub>50</sub>, que es la concentración de fármaco que inhibe el crecimiento celular en un 50 %, para AR-AvCD o AR-G<sub>4</sub>S-AvCD es superior a 100 U/ml.

*Ejemplo 14: Actividades in vivo de la proteína de fusión del dominio catalítico de sialidasa*

Los hurones se pueden infectar con virus de la gripe humana sin modificar y producir signos de enfermedad comparables a los de los humanos, que se pueden tratar con compuestos antivíricos, como zanamivir (Relenza). (Mendel *et al.*, *Antimicrob Agents Chemother*, (1998) 42(3), 640-646; Smith y Sweet, *Rev. Infect. Dis.*, (1988) 10(1), 56-75; Reuman *et al.*, *J. Virol. Methods*, (1989) 24(1-2), 27-34). Para evaluar la eficacia *in vivo* de nuestros compuestos, sometimos a ensayo la proteína AR-AvCD (preparada a partir de la construcción n.º 2) en el modelo de hurón. En concreto, 24 hurones jóvenes hembras (0,5-0,8 kg) (Marshall Farms, North Rose, Nueva York) que dieron negativo para la presencia de anticuerpos anti-hemaglutinina en suero, fueron incluidos en el estudio. Dos animales se colocaron en cada jaula y se permitió la aclimatación durante 3 días antes del experimento. Los animales fueron divididos aleatoriamente en tres grupos: 8 animales fueron tratados con tampón de dilución del fármaco y estímulo vírico, 12 animales fueron tratados con AR-AvCD y estímulo vírico, y 4 animales fueron tratados solamente con AR-AvCD. Una preparación de AR-AvCD disuelta en solución salina tamponada con fosfato (PBS) que contenía 500 U/ml de actividad de sialidasa y 0,7 mg/ml de concentración de proteína, se utilizó en el estudio. Los animales en los grupos de tratamiento con fármaco recibieron 1 ml de AR-AvCD en cada dosis, lo que equivale a aproximadamente 1 mg/kg a nivel de dosificación.

Los hurones se anestesiaron y se inocularon por vía intranasal (0,5 ml en cada fosa nasal) con AR-AvCD o PBS dos veces (8 am y 8 pm) y diariamente durante un total de 7 días (2 días antes de la estimulación vírica y 5 días después de la inoculación del virus). Se observaron los hurones después de la aplicación del fármaco en busca de signos de intolerancia. La inoculación vírica se llevó a cabo el día 3 entre las 10-11 am. El estímulo vírico se realizó con virus humano del tipo (H1N1) A/Bayern/7/95 con una dosis de 10<sup>5</sup> TCID<sub>50</sub> (ID<sub>50</sub> de hurones ≥10<sup>4</sup>). Los lavados nasales se recogieron de todos los animales, comenzando 2 días después del tratamiento con AR-AvCD y continuaron hasta el día 7. Para recoger los lavados nasales, se administró por vía intranasal 1 ml de PBS estéril, el líquido estornudado se recogió y se registró su volumen. Los lavados nasales se centrifugaron. Las células sedimentadas se resuspendieron y se contaron en un hemocitómetro bajo un microscopio. Se recogió el material sobrenadante, se dividió en partes alícuotas y se almacenó a -80°C. La concentración de proteína en los lavados nasales exentos de células se determinó utilizando el reactivo proteico de Bio-Rad, según el protocolo del fabricante (Bio-Rad, Hercules, CA). Para la titulación del virus de los lavados nasales, las células MDCK inoculadas se incubaron durante 3 días a 36°C en una incubadora con CO<sub>2</sub>. Las monocapas se inspeccionaron visualmente para estudiar el efecto citopático (CPE) y partes alícuotas del material sobrenadante del cultivo celular de cada pocillo se sometieron a ensayo para estudiar la presencia de virus, mediante un ensayo de hemaglutinación convencional con glóbulos rojos de cobaya. El título vírico se determinó por el método de Spearman Karber ((1996)).

En los animales no infectados a los que se administró AR-AvCD intranasal (n = 4), no se observó ningún efecto aparente sobre el recuento de células inflamatorias y se observó la concentración de proteína en los lavados nasales (Figura 15A y B). Los lavados nasales de estos animales se controlaron durante 7 días y eran negativos para la diseminación vírica. No se detectaron signos de toxicidad relacionada con los fármacos en estos animales con la dosis de fármaco utilizada en este estudio. En el grupo tratado con vehículo, el virus se replicaba en el epitelio nasal de los 8 hurones. La diseminación vírica alcanzó valores máximos de 4,4 a 5,9 log<sub>10</sub>TCID<sub>50</sub> (título medio máximo 4,9), el día 1 o 2 posterior a la estimulación, disminuyó con el tiempo y se convirtió en negativa el día 5 (Figura 13). Por el contrario, solo 3 de 12 hurones tratados con AR-AvCD eran positivos para la diseminación vírica el día 1 después de la estimulación (Figura 13), y sus títulos víricos nasales eran aproximadamente 100 veces más bajos que en los animales tratados con vehículo (media 2,4 ± 0,3 frente a 4,4 ± 0,4 log<sub>10</sub>TCID<sub>50</sub>) (Figura 13). Después del día 1, la respuesta al tratamiento con AR-AvCD variaba sustancialmente. Tres animales estaban completamente protegidos contra la infección, los signos de enfermedad y la respuesta inflamatoria (Figura 13, marcadores de hurón n.º 803, 805, 806). La protección también fue confirmada por la falta de seroconversión el día 14 posterior a la estimulación. Un hurón (marcador n.º 780) no tenía diseminación de virus durante los tres primeros días después de la estimulación, pero murió el día 4 después de la infección debido a una herida no relacionada. La diseminación en los 8 hurones restantes varió durante el curso de la infección, oscilando desde el hurón n.º 812 que tenía diseminación vírica solo un día, hasta el hurón n.º 791 que tenía diseminación vírica durante 5 días.

La infección en los hurones que diseminaban virus durante al menos un día fue confirmada con un aumento superior a 16 veces en el título de anticuerpos anti-HA, posterior a la estimulación (seroconversión). No hubo ningún efecto aparente del tratamiento con AR-AvCD sobre los títulos anti-HA en los sueros después de la estimulación (320-1280, frente a 160-1280, grupo vehículo y grupo tratado con fármacos, respectivamente).

En los hurones que diseminaban el virus a pesar del tratamiento con AR-AvCD (n = 8), la respuesta inflamatoria se redujo y los animales parecían estar más alerta y activos, en comparación con los hurones no tratados que estaban de forma invariable, letárgicos y febriles. Para este grupo de 8 animales infectados, tratados con AR-AvCD, el valor de AUC (área bajo la curva) calculado para las concentraciones de proteína nasal, se redujo en aproximadamente un 40 % (2,68 frente a 4,48, unidades arbitrarias) en comparación con los animales infectados tratados con vehículo (Figura 11B). En los animales infectados tratados con vehículo, el número de células inflamatorias en los lavados nasales se incrementó aproximadamente 100 veces por encima del de los animales no infectados, el día 2 después de la estimulación. Estos niveles se mantuvieron durante 4 días adicionales. Los animales tratados con AR-AvCD mostraron una reducción significativa del número de células inflamatorias en los lavados nasales. Específicamente, el valor de AUC para los recuentos de células se redujo aproximadamente 3 veces en los animales tratados con AR-AvCD, en comparación con los animales infectados tratados con vehículo (1965 frente a 674, unidades arbitrarias, Figura 11A). La reducción observada en la respuesta inflamatoria indica la importancia de la inhibición de la replicación vírica en la etapa temprana de la infección.

#### Ejemplo 15. Inhibición de la adhesión celular bacteriana con proteínas de fusión de sialidasa

##### Bacterias

*S. pneumoniae*: 10 cepas encapsuladas de diferentes serotipos se seleccionan a partir de los aislados clínicos depositados en la ATCC. Las bacterias se mantienen como reservas congeladas y se hacen pases en placas de agar con soja triptico que contienen 3 % de sangre de oveja ((Difco & Micropure Medical Inc.) durante 18 h a 37°C en 5 % de CO<sub>2</sub>. Para marcar los neumococos con radioisótopo, se toma un inóculo de un cultivo en placa de 1 a 2 días, se añade a un caldo de soja triptico que carece de lisina que contiene 70 µCi de [<sup>3</sup>H]lisina por ml y se incuba a 37°C en 5 % de CO<sub>2</sub>. El crecimiento de cada cultivo se controla por absorbancia de luz a 595 nm. Al final de la fase de crecimiento logarítmico, las bacterias se recogen, se lavan dos veces mediante centrifugación (13.000 x 3 min), y se resuspenden en medio L-15 (sin rojo fenol) más 0,1 % de BSA (L-15-BSA) (Cundell y Tuomanen, Microb. Pathog., (1994) 17(6), 361-374) (Barthelson *et al.*, Infect. Immun., (1998) 66(4), 1439-1444).

*H. influenzae*: 5 cepas de tipo b (Hib) y cepas no tipificables (10 NTHi) se obtienen a partir de los aislados clínicos depositados en la ATCC. Todas las cepas se almacenan en infusión de cerebro y corazón (BHI, Difco) que contiene hemina (ICN) y NAD (Sigma) y se mantienen congeladas hasta el uso; después se cultivan sobre agar BHI complementado con hemina y NAD y se cultivan durante 14 horas a 37°C con 5 % de CO<sub>2</sub>. (Kawakami *et al.*, Microbiol. Immunol., (1998) 42(10), 697-702). Para marcar las bacterias con [<sup>3</sup>H], se inoculan células de *H. influenzae* en caldo BHI que contiene hemina, NAD y [<sup>3</sup>H]leucina a 250 µCi/ml y se dejan crecer hasta la fase logarítmica tardía y después se recogen, se lavan y se resuspenden en L-15-BSA (Barthelson *et al.*, Infect. Immun., (1998) 66(4), 1439-1444).

##### Ensayo de adhesión celular

Todas las bacterias marcadas con [<sup>3</sup>H] se suspenden en L-15-BSA después del lavado, la concentración bacteriana se determina por recuento visual con una cámara de Petroff-Hausser, la radiactividad se determina por recuento de centelleo y se calcula la actividad específica de las células marcadas con [<sup>3</sup>H]. Se utilizan preparaciones de bacterias con 7 cpm/1000 células o mayor. Las bacterias se diluyen hasta 5 x 10<sup>8</sup> células/ml. Monocapas de células BEAS-2B se incuban con una suspensión bacteriana marcada con [<sup>3</sup>H] que contiene 5 x 10<sup>7</sup> bacterias a 37°C en 5 % de CO<sub>2</sub>. Después de 30 min, las bacterias no unidas se eliminan con 5 lavados con L-15-BSA. Las bacterias fijadas a las muestras de tejido WD-AEH se cuantifican por recuento de centelleo.

##### Desialilación de las células BEAS-2B a través de proteínas de fusión de sialidasa y efectos sobre la adhesión celular de *H. influenzae* y *S. pneumoniae*.

Las células BEAS-2B se incuban con 1-50 mU de AR-AvCD durante 2 horas. El ensayo de adhesión celular se lleva a cabo utilizando cepas de *H. influenzae* y *S. pneumoniae*, tal y como se ha descrito anteriormente. Las células tratadas de forma simulada se utilizan como control positivo. La eficacia de AR-AvCD se cuantifica como la CE<sub>50</sub>, que es la cantidad de enzima necesaria para lograr una inhibición del 50 % de la adhesión bacteriana.

#### Ejemplo 16. Mejora de la eficacia de la transducción del vector VAA usando proteínas de fusión de sialidasa

##### Experimentos *in vitro*

Un experimento que muestra el efecto de AR-AvCD, se lleva a cabo de una manera similar al procedimiento publicado (Bals *et al.*, J Virol., (1999) 73(7), 6085-6088). Una monocapa de células bien diferenciadas de epitelio de las vías respiratorias (WDAE) se mantiene en cámaras Transwell (Karp *et al.*, Methods Mol. Biol., (2002) 188, 115-137; Wang *et al.*, J Virol., (1998) 72(12), 9818-9826). Con el fin de eliminar el ácido siálico de la superficie celular, el medio de cultivo se reemplaza con medio exento de suero en el que se disuelven 0,5-10 unidades de AR-AvCD. Las células se tratan desde 30 min a 6 horas. Las monocapas de células se lavan, se transducen con VAA, y la eficacia de la transducción se estima utilizando procedimientos convencionales. Varias cámaras Transwell se tratan solamente con medio (sin AR-AvCD) para servir como control (eficacia de la transducción basal). Unos controles adicionales pueden

incluir las cámaras Transwell tratadas solo con AR-AvCD para evaluar el efecto citotóxico de la desialilación. Un virus informador se utiliza para facilitar la detección de las células transducidas. Ejemplos de VAA informador y su uso se han descrito en la bibliografía e incluyen AAV-CMV-eGFP, AAV2LacZ (Bals *et al.*, J Virol., (1999) 73(7), 6085-6088; Wang *et al.*, Hum. Gene Ther., (2004) 15(4), 405-413) y fosfatasa alcalina (Halbert *et al.*, Nat. Biotechnol., (2002) 20(7), 697-701). La eficacia se estima por microscopía óptica de las células que se habían fijado y tratado con sustrato apropiado (si se utilizan virus que contienen lacZ o AP) o microscopía de fluorescencia de células vivas (si se utiliza GFP). Según los experimentos realizados en NexBio con células epiteliales primarias NHBE (Cambrex, Walkersville, MD), la cantidad máxima de eliminación de ácido siálico se logra en menos de una hora cuando se utilizan 10 unidades de AR-AvCD por cámara Transwell. Otras líneas celulares utilizadas (por ejemplo, MDCK) se convierten en desialiladas administrando mucho menos AR-AvCD (0,1 U durante 1 hora). Por tanto, nuestra estimación es que un tratamiento de WDAE con 10 U de AR-AvCD durante 2 horas será suficiente para eliminar el ácido siálico accesible y proporcionar una mejora significativa de la transducción de células WDAE con VAA.

#### Ensayo del efecto del tratamiento con AR-AvCD sobre la transducción de VAA en un modelo animal.

Para demostrar el efecto del tratamiento con AR-AvCD en un modelo animal, se llevó a cabo un experimento similar al descrito anteriormente (Flotte *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A, (1993) 90(22), 10613-10617; Halbert *et al.*, Nat. Biotechnol., (2002) 20(7), 697-701). Varias horas (1-6) antes de la administración de VAA, AR-AvCD se administra en los pulmones de ratones mediante aspiración nasal de aerosol o polvo liofilizado de AR-AvCD de acuerdo con el protocolo publicado previamente (Flotte *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A, (1993) 90(22), 10613-10617). VAA que es portador del gen informador (fosfatasa alcalina) se suministra por aspiración nasal, los ratones son sacrificados 4 semanas más tarde y las células transducidas se detectan en los pulmones fijados, tal y como se ha descrito previamente (Halbert *et al.*, J Virol., (1998) 72(12), 9795-9805).

*Ejemplo 17. El tratamiento con sialidasa inhibe las funciones de mastocitos y la contracción del músculo liso en la tráquea.*

Empleando métodos experimentales descritos anteriormente (Cocchiara *et al.*, J Neuroimmunol., (1997) 75(1-2), 9-18), se demostró que el tratamiento con los compuestos de la presente invención evita la liberación de histamina inducida por la sustancia P (SP) en los mastocitos. Empleando otro conjunto de experimentos (Stenton *et al.*, J Pharmacol. Exp. Ther., (2002) 302(2), 466-474), el tratamiento con los compuestos de la presente invención inhibe la liberación de  $\beta$ -hexosaminidasa en los mastocitos estimulados con dos péptidos que activan PAR (PAR significa receptores activados con proteinasa).

Los compuestos de la presente invención se administran por vía intratraqueal a cobayas y la reactividad de las vías respiratorias se evalúa en los animales tal y como se ha descrito anteriormente (Jarreau *et al.*, Am. Rev. Respir. Dis., (1992) 145(4 Pt 1), 906-910; Stenton *et al.*, J Pharmacol. Exp. Ther., (2002) 302(2), 466-474). El tratamiento con sialidasa no debe inducir una hiperreactividad no específica de las vías respiratorias, a juzgar por la reacción de varios inductores. Además, el tratamiento con sialidasa debe reducir la broncoconstricción inducida por la sustancia P. Del mismo modo, los compuestos de la presente invención se utilizan para tratar la tráquea y el pulmón aislados a partir de cobaya y rata (Kai *et al.*, Eur. J. Pharmacol., (1992) 220(2-3), 181-185; Stenton *et al.*, J Pharmacol. Exp. Ther., (2002) 302(2), 466-474). Un tratamiento de nuevo con sialidasa recombinante no tendrá ningún efecto sobre las contracciones del músculo liso inducidas por acetilcolina, histamina y 5-hidroxitriptamina. Además, inhibirá la contracción traqueal inducida por antígeno (ovoalbúmina) o el compuesto 48/80.

#### Bibliografía

Achyuthan, KE y Achyuthan AM. 2001. Comparative enzymology, biochemistry and pathophysiology of human exo-sialidases (neuraminidases). Comparative Biochem & Physiol parte B 129:29-64.

Air, GM y Laver, WG. 1995. Red cells bound to influenza virus N9 neuraminidase are not released by the N9 neuraminidase activity. Virology 211:278-284.

Auerswald EA, Horlein D, Reinhardt G, Schroder W y Schnabel E. 1988. Expression, isolation and characterization of recombinant [Arg15, Glu52] Aprotinin. Biol Chem Hoppe-Seyler Vol 369, Supl., págs. 27-35.

Barbey-Morel CL, Oeltmann TN, Edwards KM y Wright PF. 1987. Role of respiratory tract proteases in infectivity of influenza A virus. J Infect Dis 155:667-672.

Bessette PH, Aslund F, Beckwith J y Georgiou G. 1999. Efficient folding of proteins with multiple disulfide bonds in the Escherichia coli cytoplasm. Proc Natl Acad Sci USA 96:13703-13708.

Callan RJ, Hartmann FA, West SE y Hinshaw VS. 1997. Cleavage of influenza A virus H1 hemagglutinin by swine respiratory bacterial proteases. J Virol 71:7579-7585.

- Connor, RJ, Kawaoka, Y, Webster, RG y Paulson JC. 1994. Receptor specificity in human, avian, and equine H2 and H3 influenza virus isolates. *Virology* 205:17-23.
- 5 Copley, RR, Russell, RB y Ponting, CP. 2001. Sialidase-like Asp-boxes: sequence-similar structures within different protein folds. *Prot Sci* 10:285-292.
- Corfield, AP, Veh, RW, Wember, M, Michalski, JC y Schauer, R. 1981. The release of N-acetyl- and N-glycoloyl-neuraminic acid from soluble complex carbohydrates and erythrocytes by bacterial, viral and mammalian sialidases. *Biochem J* 197:293-299.
- 10 Crennell, SJ, Garman, E, Laver, G, Vimr, E y Taylor, G. 1994. Crystal structure of *Vibrio Cholerae* neuraminidase reveals dual lectin-like domains in addition to the catalytic domain. *Structure* 2:535-544.
- Drzeniek, R. Substrate specificity of neuraminidases. 1973. *Histochem J* 5:271-290.
- 15 Endo Y, Carroll KN, Ikizler MR y Wright PF. 1996. Growth of influenza virus in primary, differentiated epithelial cells derived from adenoids. *J Virol* 70:2055-2058.
- Fritz H y Wunderer G. 1983. Biochemistry and applications of aprotinin, the kallikrein inhibitor from bovine organs. *Arzneim-Forsch* 33:479-494.
- 20 Fukudome, K., Yoshie, O. y Konno, T. 1989. Comparison of human, simian, and bovine rotaviruses for requirement of sialic acid in hemagglutination and cell adsorption. *Virology* 172:196-205.
- 25 Garten W, Bosch FX, Linder D, Rott R y Klenk HD. 1981. Proteolytic activation of the influenza virus hemagglutinin: the structure of the cleavage site and the enzymes involved in cleavage. *Virology* 115:361-374.
- Goger, B, Halden, Y, Rek, A, Mosl, R, Pye, D, Gallagher, J y Kungl, AJ. 2002. Different affinities of glycosaminoglycan oligosaccharides for monomeric and dimeric interleukin-8: a model for chemokine regulation at inflammatory sites. *Biochem* 41:1640-1646.
- 30 Gotoh B, Ogasawara T, Toyoda T, Inocencio N, Hamaguchi M y Nagai Y. 1990. An endoprotease homologous to the blood clotting factor X as a determinant of viral tropism in chick embryo. *EMBO J* 9:4189-4195.
- 35 Granoff, A. y Webster, R. G., ed. *Encyclopedia of Virology*, 2ª Edición, Vol 2.
- Gust, ID, Hampson, AW. y Lavanchy, D. 2001. Planning for the next pandemic. *Rev Med Virol* 11:59-70.
- 40 Hayden, FG. 1996. Amantadine and rimantadine-mechanisms. In *Antiviral drug resistance* (editor, D. D. Richman), pág. 59-77. Chichester, UK: John Wiley & Sons Ltd.
- Hosoya M, Matsuyama S, Baba M, Susuki H y Shigeta S. 1992. Effects of protease inhibitors on replication of various myxoviruses. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 36:1432-1436.
- 45 Ito, T. 2000. Interspecies transmission and receptor recognition of influenza a virus. *Microbiol Immunol* 44(6):423-430.
- Janakiraman, MN, White, CL, Laver, WG, Air, GM y Luo, M. 1994. Structure of influenza virus neuraminidase B/lee/40 complexed with sialic acid and a dehydro analog at 1.8-Å resolution: implications for the catalytic mechanism. *Biochemistry* 33:8172-8179.
- 50 Kido, H, Niwa, Y, Beppu, Y y Towatari, T. 1996. Cellular proteases involved in the pathogenicity of enveloped animal viruses, human immunodeficiency virus, influenza virus A and sendai virus. *Advan Enzyme Regul* 36:325-347.
- 55 Kido H, Chen Y y Murakami M. 1999. Cellular proteinases and viral infection: influenza virus, sendai virus and HIV-1, p.205-217. In B. Dunn (editor), *Proteases of infectious agents*. Academic Press, Nueva York, N.Y.
- Klenk, HD y Rott, R. 1988. The molecular biology of influenza virus pathogenicity. *Adv Vir Res* 34:247-281.
- 60 Klenk, HD y Garten W. 1994. Host cell proteases controlling virus pathogenicity. *Trend Micro* 2:39-43.
- Kreisel, W, Volk, BA, Buchsel, R. y Reutter, W. 1980. Different half-lives of the carbohydrate and protein moieties of a 110,000-dalton glycoproteins isolated from plasma membranes of rat liver. *Proc Natl Acad Sci USA* 77:1828-1831.
- 65



- Krunkosky TM, Fischer BM, Martin LD, Jones N, Akley NJ y Adler KB. 2000. Effects of TNF- $\beta$  on expression of ICAM-1 in human airway epithelial cells in vitro. *Am J Respir Cell Mol Biol* 22:685-692.
- 5 Lazarowitz SG, Goldberg AR y Choppin PW. 1973. Proteolytic cleavage by plasmin of the HA polypeptide of influenza virus: host cell activation of serum plasminogen. *Virology* 56:172-180.
- Lee, MK y Lander, AD. 1991. Analysis of affinity and structural selectivity in the binding of proteins to glycosaminoglycans: development of a sensitive electrophoretic approach. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:2768-2772.
- 10 Meltzer, MI, Cox, NJ y Fukuda, K. 1999. The economic impact of pandemic influenza in the United States: priorities for intervention. *Emerg Infect Dis* 5:659-671.
- Meyer, FA, King, M y Gelman, RA., 1975. On the role of sialic acid in the rheological properties of mucus. *Biochimica et Biophysica Acta* 392: 223-232.
- 15 Milner, CM, Smith, SV, Carrillo MB, Taylor, GL, Hollinshead, M y Campbell, RD. 1997. Identification of a sialidase encoded in the human major histocompatibility complex. *J Bio Chem* 272:4549-4558.
- Monti, E, Preti, A, Venerando, B y Borsani, G. 2002. Recent development in mammalian sialidase molecular biology. *Neurochem Res* 27:646-663.
- 20 Monti, E, Preti, A, Nesti, C, Ballabio, A y Borsani G. 1999. Expression of a novel human sialidase encoded by the NEU2 gene. *Glycobiol* 9:1313-1321.
- 25 Monti, E, Bassi, MT, Papini, N, Riboni, M, Manzoni, M, Veneranodo, B, Croci, G, Preti, A, Ballabio, A, Tettamanti, G y Borsani, G. 2000. Identification and expression of NEU3, a novel human sialidase associated to the plasma membrane. *Biochem J* 349:343-351.
- 30 Murakami M, Towatari T, Ohuchi M, Shiota M, Akao M, Okumura Y, Parry MA y Kido H. 2001. Mini-plasmin found in the epithelial cells of bronchioles triggers infection by broad-spectrum influenza A viruses and Sendai virus. *Eur J Biochem* 268: 2847-2855.
- Nakayama, K. 1997. Furin: a mammalian subtilisin/kex2p-like endoprotease involved in process of a wide variety of precursor proteins. *Biochem* 327:625-635.
- 35 Ovcharenko AV y Zhimov OP. 1994. Aprotinin aerosol treatment of influenza and paramyxovirus bronchopneumonia of mice. *Antiviral Res* 23:107-118.
- 40 Pshezhetsky, A, Richard, C, Michaud, L, Igdoura, S, Wang, S, Elsliger, M, Qu, J, Leclerc, D, Gravel, R, Dallaire, L y Potier, M. 1997. Cloning, expression and chromosomal mapping of human lysosomal sialidase and characterization of mutations in sialidosis. *Nature Genet* 15: 316-320.
- Ramphal, R. y Pyle, M. 1983. Evidence for mucins and sialic acid as receptors for *Pseudomonas aeruginosa* in the lower respiratory tract. *Infect Immun* 41:339-44.
- 45 Roggentin, P, Kleineidam, RG y Schauer, R. 1995. Diversity in the properties of two sialidase isoenzymes produced by *Clostridium perfringens* spp. *Biol Chem Hoppe-Seyler* 376:569-575.
- 50 Roggentin, P, Schauer, R, Hoyer, LL y Vimr, ER. 1993. The sialidase superfamily and its spread by horizontal gene transfer. *Mol Microb* 9:915-921.
- Rosenberg A. editor. *Biology of the Sialic Acids*. 1995. Págs. 270-273.
- 55 Sakurada, K, Ohta, T y Hasegawa, M. 1992. Cloning, expression and characterization of the *Micromonospora viridifaciens* neuraminidase gene in *Streptomyces lividans*. *J Bacteriol* 174: 6896-6903.
- Schauer, S. editor, págs 233. *Sialic Acids Chemistry, Metabolism and Function*. Springer-Verlag, 1982.
- 60 Schauer, R. 1982. Chemistry, metabolism, and biological functions of sialic acids. *Adv. Carbohydrate Chem & Biochem* 40:131-235.
- Scheiblaue H, Reinacher M, Tashiro M y Rott R. 1992. Interactions between bacteria and influenza A virus in the development of influenza pneumonia. *J Infec Dis* 166:783-791.

- Sinn PL, Williams G, Vongpunsawad S, Cattaneo R y McCray PB. 2002. Measles virus preferentially transduces the basolateral surface of well-differentiated human airway epithelia. *J Virol* 76:2403-2409.
- 5 Skehel, JJ y Wiley, DC. 2000. Receptor binding and membrane fusion in virus entry: the influenza hemagglutinin. *Annu Rev Biochem* 69:531-569.
- Tashiro M, Klenk HD y Rott R. 1987. Inhibitory effect of a protease inhibitor, leupeptin, on the development of influenza pneumonia, mediated by concomitant bacteria. *J Gen Virol* 68:2039-2043.
- 10 Tashiro M, Ciborowski P, Reinacher M, Pulverer G, Klenk HD y Rott R. 1987. Synergistic role of staphylococcal proteases in the induction of influenza virus pathogenicity. *Virology* 157:421-430.
- Teufel, M, Roggentin, P. y Schauer, R. 1989. Properties of sialidase isolated from *Actinomyces viscosus* DSM43798. *Biol Chem Hoppe Seyler* 370:435-443.
- 15 Tobita, K, Sugiura, A, Enomoto, C y Furuyama, M. 1975. Plaque assay and primary isolation of influenza A viruses in an established line of canine kidney cells (MDCK) in the presence of trypsin. *Med Microbiol Immunol* 162:9-14.
- Venturi M, Seifert C y Hunte C. 2001. High level production of functional antibody Fab fragments in an oxidizing bacterial cytoplasm. *J Mol Biol* 315:1-8.
- 20 Vimr, DR. 1994. Microbial sialidases: does bigger always mean better? *Trends Microbiol* 2: 271-277.
- Vlasak, R., Luytjes, W., Spaan, W. y Palese, P. 1988. Human and bovine coronaviruses recognize sialic acid-containing receptors similar to those of influenza C viruses. *Proc Natl Acad Sci USA* 85:4526-4529.
- 25 Wada, T, Yoshikawa, Y, Tokuyama, S, Kuwabara, M, Akita, H y Miyagi, T. 1999. Cloning, expression, and chromosomal mapping of a human ganglioside sialidase. *Biochem Biophys Res Commun* 261:21-27.
- Wang, FZ, Akula, SM, Pramod, NP, Zeng, L y Chandran, B. 2001. Human herpesvirus 8 envelope glycoproteins K8.1A interaction with the target cells involves heparan sulfate. *J Virol* 75:7517-27
- 30 Wassilewa, L. 1977. Cell receptor for paramyxoviruses. *Arch Virol* 54:299-305.
- Weisgraber, KH, Rail, SC, Mahley, RW, Milne, RW y Marcel, Y. 1986. Human apolipoprotein E, determination
- 35 Witt, DP y Lander AD. 1994. Differential binding of chemokines to glycosaminoglycan subpopulations. *Curr Bio* 4:394-400.
- Wood, J. 2001. Developing vaccines against pandemic influenza. *Phil Trans R Soc Lond B* 356:1953-1960.
- Xiang Y y Moss B. 2003. Molluscum contagiosum virus interleukin-18 (IL-18) binding protein is secreted as a full-length form that bind cell surface glycosaminoglycans through the C-terminal tail and a furin-cleaved form with only the IL-18 binding domain. *J Virol* 77:2623-2630.
- 45 Zambon, M. 2001. The pathogenesis of influenza in humans. *Rev Med Virol* 11:227-241.
- Zhang L, Peeples ME, Boucher RC, Collins PL y Pickles RJ. 2002. Respiratory syncytial virus infection of human airway epithelial cells is polarized, specific to ciliated cells, and without obvious cytopathology. *J Virol* 76:5654-5666.
- 50 Zhirnov OP, Ovchartenko AV y Bukrinskaya AG. 1982. Protective effect of protease inhibitors in influenza virus infected animals. *Arch Virol* 73:263-272
- 55 Zhirnov OP, Ovcharenko AV y Bukrinskaya AG. 1982. A modified plaque assay method for accurate analysis of infectivity of influenza viruses with uncleaved hemagglutinin. *Arch Virol* 71:177-183.
- Zhirnov OP. 1983. Proteolytic activation of myxoviruses and a new strategy in the treatment of viral diseases. *Problems Virol*. 4:9-12. (en ruso).
- 60 Zhirnov OP, Ovcharenko AV y Bukrinskaya AG. 1984. Suppression of influenza virus replication in infected mice by protease inhibitors. *J Gen Virol* 65:191-196.
- Zhirnov OP, Ovcharenko AV y Bukrinskaya AG. 1985. Myxovirus replication in chicken embryos can be suppressed by aprotinin due to the blockage of viral glycoprotein cleavage. *J Gen Virol* 66:1633-1638.
- 65

- Zhirnov OP. 1987. High protection of animals lethally infected with influenza virus by aprotinin-rimantadine combination. *J Med Virol* 21:161-167.
- 5 Zhirnov OP, Ikizler MR y Wright PF. 2002. Cleavage of influenza A virus hemagglutinin in human respiratory epithelium is cell associated and sensitive to exogenous antiproteases. *J Virol* 76:8682-8689.
- Bartlett J.G., Breiman R.F., Mandell L.A., y File T.M., Jr. (1998) Community-acquired pneumonia in adults: guidelines for management. *The Infectious Diseases Society of America. Clin.Infect.Dis.* 26, 811-838.
- 10 Andrews J., Nadjim B., Gant V., y Shetty N. (2003) Community-acquired pneumonia. *Curr.Opin.Pulm.Med.* 9, 175-180.
- File T.M. (2000) The epidemiology of respiratory tract infections. *Semin.Respir.Infect.* 15, 184-194.
- 15 Macfarlane J. (1994) An overview of community acquired pneumonia with lessons learned from the British Thoracic Society Study. *Semin.Respir.Infect.* 9, 153-165.
- Matsushima T., Miyashita N., y File T.M., Jr. (2002) Etiology and management of community-acquired pneumonia in Asia. *Curr.Opin.Infect.Dis.* 15, 157-162.
- 20 Ball P. (1995) Epidemiology and treatment of chronic bronchitis and its exacerbations. *Chest* 108, 43S-52S.
- Faden H. (2001) The microbiologic and immunologic basis for recurrent otitis media in children. *Eur.J Pediatr.* 160, 407-413.
- 25 Garcia-Rodriguez, JA y Martinez, MJF. Dynamics of nasopharyngeal colonization by potential respiratory pathogens. *J Antimicrob Chemother* 50[Supl S2], 59-73. 2002.
- Soriano F. y Rodriguez-Cerrato V. (2002) Pharmacodynamic and kinetic basis for the selection of pneumococcal resistance in the upper respiratory tract. *J Antimicrob Chemother* 50 Supl S2, 51-58.
- 30 Mbaki N., Rikitomi N., Nagatake T., y Matsumoto K. (1987) Correlation between Branhamella catarrhalis adherence to oropharyngeal cells and seasonal incidence of lower respiratory tract infections. *Tohoku J Exp.Med.* 153, 111-121.
- 35 Zopf D. y Roth S. (1996) Oligosaccharide anti-infective agents. *Lancet* 347, 1017-1021.
- Cundell D.R., Weiser J.N., Shen J., Young A., y Tuomanen E.I. (1995) Relationship between colonial morphology and adherence of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect.Immun.* 63, 757-761.
- 40 Karlsson K.A. (1998) Meaning and therapeutic potential of microbial recognition of host glycoconjugates. *Mol.Microbiol.* 29, 1-11.
- Andersson B., Porras O., Hanson L.A., Lagergard T., y Svanborg-Eden C. (1986) Inhibition of attachment of *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* by human milk and receptor oligosaccharides. *J Infect.Dis.* 153, 232-237.
- 45 Bals R., Xiao W., Sang N., Weiner D.J., Meegalla R.L., y Wilson J.M. (1999) Transduction of well-differentiated airway epithelium by recombinant adeno-associated virus is limited by vector entry. *J Virol.* 73, 6085-6088.
- 50 Barthelson R., Mobasser A., Zopf D., y Simon P. (1998) Adherence of *Streptococcus pneumoniae* to respiratory epithelial cells is inhibited by sialylated oligosaccharides. *Infect.Immun.* 66, 1439-1444.
- Cundell D.R. y Tuomanen E.I. (1994) Receptor specificity of adherence of *Streptococcus pneumoniae* to human type-II pneumocytes and vascular endothelial cells in vitro. *Microb.Pathog.* 17, 361-374.
- 55 Fakh M.G., Murphy T.F., Pattoli M.A., y Berenson C.S. (1997) Specific binding of *Haemophilus influenzae* to minor gangliosides of human respiratory epithelial cells. *Infect.Immun.* 65, 1695-1700.
- 60 Kawakami K., Ahmed K., Utsunomiya Y., Rikitomi N., Hori A., Oishi K., y Nagatake T. (1998) Attachment of nontypable *Haemophilus influenzae* to human pharyngeal epithelial cells mediated by a ganglioside receptor. *Microbiol.Immunol.* 42, 697-702.
- Solzbacher D., Hanisch F.G., van Alphen L., Gilsdorf J.R., y Schroten H. (2003) Mucin in middle ear effusions inhibits attachment of *Haemophilus influenzae* to mucosal epithelial cells. *Eur.Arch.Otorhinolaryngol.* 260, 141-147.
- 65

- van Alphen L., Geelen-van den Broek L., Blaas L., van Ham M., y Dankert J. (1991) Blocking of fimbria-mediated adherence of *Haemophilus influenzae* by sialyl gangliosides. *Infect-Immun.* 59, 4473-4477.
- 5 Ahmed K., Matsumoto K., Rikitomi N., y Nagatake T. (1996) Attachment of *Moraxella catarrhalis* to pharyngeal epithelial cells is mediated by a glycosphingolipid receptor. *FEMS Microbiol.Lett.* 135, 305-309.
- Hazlett L.D., Moon M., y Berk R.S. (1986) In vivo identification of sialic acid as the ocular receptor for *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect.Immun.* 51, 687-689.
- 10 Baker N., Hansson G.C., Leffler H., Riise G., y Svanborg-Eden C. (1990) Glycosphingolipid receptors for *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect.Immun.* 58, 2361-2366.
- Schultze B., Gross H.J., Brossmer R., y Herrler G. (1991) The S protein of bovine coronavirus is a hemagglutinin recognizing 9-O-acetylated sialic acid as a receptor determinant. *J virol.* 65, 6232-6237.
- 15 Wuppermann F.N., Hegemann J.H., y Jantos C.A. (2001) Heparan sulfate-like glycosaminoglycan is a cellular receptor for *Chlamydia pneumoniae*. *J Infect.Dis.* 184, 181-187.
- Beswick E.J., Travelstead A., y Cooper M.D. (2003) Comparative studies of glycosaminoglycan involvement in *Chlamydia pneumoniae* and *C. trachomatis* invasion of host cells. *J Infect.Dis.* 187, 1291-1300.
- 20 Martinez I. y Melero J.A. (2000) Binding of human respiratory syncytial virus to cells: implication of sulfated cell surface proteoglycans. *J Gen. Virol.* 81, 2715-2722.
- Thomas R.J. y Brooks T.J. (2004) Oligosaccharide receptor mimics inhibit *Legionella pneumophila* attachment to human respiratory epithelial cells. *Microb.Pathog.* 36, 83-92.
- 25 Hirno S., Kelm S., Schauer R., Nilsson B., y Wadstrom T. (1996) Adhesion of *Helicobacter pylori* strains to alpha-2,3-linked sialic acids. *Glycoconj.J* 13, 1005-1011.
- 30 Simon P.M., Goode P.L., Mobasser A., y Zopf D. (1997) Inhibition of *Helicobacter pylori* binding to gastrointestinal epithelial cells by sialic acid-containing oligosaccharides. *Infect.Immun.* 65, 750-757.
- Miller-Podraza H., Bergstrom J., Milh M.A., y Karlsson K.A. (1997) Recognition of glycoconjugates by *Helicobacter pylori*. Comparison of two sialic acid-dependent specificities based on haemagglutination and binding to human erythrocyte glycoconjugates. *Glycoconj. J* 14, 467-471.
- 35 Crocker P.R. y Varki A. (2001) Siglecs, sialic acids and innate immunity. *Trends Immunol.* 22, 337-342.
- 40 Angata T. y Brinkman-Van der Linden E. (2002) I-type lectins. *Biochim.Biophys.Acta* 1572, 294-316.
- Lyczak J.B., Cannon C.L., y Pier G.B. (2002) Lung infections associated with cystic fibrosis. *Clin.Microbiol.Rev.* 15, 194-222.
- 45 Flotte T.R. y Carter B.J. (1998) Adeno-associated virus vectors for gene therapy of cystic fibrosis. *Methods Enzymol.* 292, 717-732.
- Wagner J.A., Reynolds T., Moran M.L., Moss R.B., Wine J.J., Flotte T.R., y Gardner P. (1998) Efficient and persistent gene transfer of VAA-CFTR in maxillary sinus. *Lancet* 351, 1702-1703.
- 50 Martinez I. y Melero J.A. (2000) Binding of human respiratory syncytial virus to cells: implication of sulfated cell surface proteoglycans. *J Gen. Virol.* 81, 2715-2722.
- Park P.W., Pier G.B., Hinkes M.T., y Bemfield M. (2001) Exploitation of syndecan-1 shedding by *Pseudomonas aeruginosa* enhances virulence. *Nature* 411, 98-102.
- 55 Monti E., Preti A., Venerando B., y Borsani G. (2002) Recent development in mammalian sialidase molecular biology. *Neurochem.Res.* 27, 649-663. (1995) *Biology of the Sialic Acids*, 270-273.
- 60 Roggentin P., Kleineidam R.G., y Schauer R. (1995) Diversity in the properties of two sialidase isoenzymes produced by *Clostridium perfringens* spp. *Biol.Chem.Hoppe Seyler* 376, 569-575.
- Sutter V.L. (1984) Anaerobes as normal oral flora. *Rev.Infect.Dis.* 6 Supl 1, S62-S66.
- 65 Gaskell A., Crennell S., y Taylor G. (1995) The three domains of a bacterial sialidase: a beta-propeller, an immunoglobulin module and a galactose-binding jelly-roll. *Structure.* 3, 1197-1205.

- Alvarez P., Buscaglia C.A., y Campetella O. (2004) Improving protein pharmacokinetics by genetic fusion to simple amino acid sequences. *J.Biol.Chem.* 279, 3375-3381.
- 5 Potier M., Mameli L., Belisle M., Dallaire L., y Melancon S.B. (1979) Fluorometric assay of neuraminidase with a sodium (4-methylumbelliferyl-alpha-D-N-acetylneuraminat) substrate. *Anal.Biochem.* 94, 287-296.
- Hirel P.H., Schmitter M.J., Dessen P., Fayat G., y Blanquet S. (1989) Extent of N-terminal methionine excision from *Escherichia coli* proteins is governed by the side-chain length of the penultimate amino acid. *Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A* 86, 8247-8251.
- 10 Varshavsky A. (1996) The N-end rule: functions, mysteries, uses. *Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A* 93, 12142-12149.
- Belshe R.B., Smith M.H., Hall C.B., Betts R., y Hay A.J. (1988) Genetic basis of resistance to rimantadine emerging during treatment of influenza virus infection. *J Virol.* 62, 1508-1512.
- 15 Mendel D.B., Tai C.Y., Escarpe P.A., Li W., Sidwell R.W., Huffman J.H., Sweet C., Jakeman K.J., Merson J., Lacy S.A., Lew W., Williams M.A., Zhang L., Chen M.S., Bischofberger N., y Kim C.U. (1998) Oral administration of a prodrug of the influenza virus neuraminidase inhibitor GS 4071 protects mice and ferrets against influenza infection. *Antimicrob Agents Chemother* 42, 640-646.
- 20 Smith H. y Sweet C. (1988) Lessons for human influenza from pathogenicity studies with ferrets. *Rev.Infect.Dis.* 10, 56-75.
- Reuman P.D., Keely S., y Schiff G.M. (1989) Assessment of signs of influenza illness in the ferret model. *J. Virol.Methods* 24, 27-34.
- 25 *Virology Methods Manual.* 1996. Londres, San Diego, Nueva York, Boston, Sídney, Tokio, Toronto: Academic Press, Harcourt Brace & Company.
- 30 Karp P.H., Moninger T.O., Weber S.P., Nesselhauf T.S., Launspach J.L., Zabner J., y Welsh M.J. (2002) An in vitro model of differentiated human airway epithelia. *Methods for establishing primary cultures. Methods Mol.Biol.* 188, 115-137.
- 35 Wang G., Davidson B.L., Melchert P., Slepishkin V.A., van Es H.H., Bodner M., Jolly D.J., y McCray P.B., Jr. (1998) Influence of cell polarity on retrovirus-mediated gene transfer to differentiated human airway epithelia. *J Virol.* 72, 9818-9826.
- Wang A.Y., Peng P.D., Ehrhardt A., Storm T.A., y Kay M.A. (2004) Comparison of adenoviral and adeno-associated viral vectors for pancreatic gene delivery in vivo. *Hum.Gene Ther.* 15, 405-413.
- 40 Halbert C.L., Allen J.M., y Miller A.D. (2002) Efficient mouse airway transduction following recombination between VAA vectors carrying parts of a larger gene. *Nat.Biotechnol.* 20, 697-701.
- 45 Flotte T.R., Afione S.A., Conrad C., McGrath S.A., Solow R., Oka H., Zeitlin P.L., Guggino W.B., y Carter B.J. (1993) Stable in vivo expression of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator with an adeno-associated virus vector. *Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A* 90, 10613-10617.
- 50 Halbert C.L., Standaert T.A., Wilson C.B., y Miller A.D. (1998) Successful readministration of adeno-associated virus vectors to the mouse lung requires transient immunosuppression during the initial exposure. *J Virol.* 72, 9795-9805.
- 55 Cocchiara R., Bongiovanni A., Albeggiani G., Azzolina A., Lampiasi N., Di Blasi F., y Geraci D. (1997) Inhibitory effect of neuraminidase on SP-induced histamine release and TNF-alpha mRNA in rat mast cells: evidence of a receptor-independent mechanism. *J Neuroimmunol.* 75, 9-18.
- Stenton G.R., Nohara O., Dery R.E., Vliagoftis H., Gilchrist M., Johri A., Wallace J.L., Hollenberg M.D., Moqbel R., y Befus A.D. (2002) Proteinase-activated receptor (PAR)-1 and -2 agonists induce mediator release from mast cells by pathways distinct from PAR-1 and PAR-2. *J Pharmacol. Exp.Ther.* 302, 466-474.
- 60 Jarreau P.H., Harf A., Levame M., Lambre C.R., Lorino H., y Macquin-Mavier I. (1992) Effects of neuraminidase on airway reactivity in the guinea pig. *Am.Rev.Respir.Dis.* 145, 906-910.
- 65 Kai H., Makise K., Matsumoto S., Ishii T., Takahama K., Isohama Y., y Miyata T. (1992) The influence of neuraminidase treatment on tracheal smooth muscle contraction. *Eur.J.Pharmacol.* 220, 181-185.

Todos los encabezamientos son para la conveniencia del lector y no deberían usarse para limitar el significado del texto a continuación del encabezamiento, a menos que se especifique así.

**LISTADO DE SECUENCIAS**

5  
10  
15  
20  
25  
30  
35  
40  
45

<110> FANG, Fang  
MALAKHOV, Michael

<120> UNA NUEVA CLASE DE MOLÉCULAS TERAPÉUTICAS A BASE DE PROTEÍNAS

<130> P42741EP1/SJL

<150> US 10/939.262  
<151> 10-09-2004

<150> EP 05790917.8  
<151> 21-07-2005

<160> 39

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1  
<211> 58  
<212> PRT  
<213> *Bos taurus*

<400> 1

```

Arg Pro Asp Phe Cys Leu Glu Pro Pro Tyr Thr Gly Pro Cys Lys Ala
 1                               5                               10                               15

Arg Ile Ile Arg Tyr Phe Tyr Asn Ala Lys Ala Gly Leu Cys Gln Thr
                20                               25                               30

Phe Val Tyr Gly Gly Cys Arg Ala Lys Arg Asn Asn Phe Lys Ser Ala
                35                               40                               45

Glu Asp Cys Met Arg Thr Cys Gly Gly Ala
 50                               55
    
```

<210> 2  
<211> 24  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

<400> 2

```

Asn Gly Arg Arg Ile Cys Leu Asp Leu Gln Ala Pro Leu Tyr Lys Lys
 1                               5                               10                               15

Ile Ile Lys Lys Leu Leu Glu Ser
                20
    
```

<210> 3  
<211> 27  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

<400> 3

ES 2 721 172 T3

Gly Arg Glu Leu Cys Leu Asp Pro Lys Glu Asn Trp Val Gln Arg Val  
 1 5 10 15

Val Glu Lys Phe Leu Lys Arg Ala Glu Asn Ser  
 20 25

5 <210> 4  
 <211> 34  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<400> 4

10 Gln Ile His Phe Phe Phe Ala Lys Leu Asn Cys Arg Leu Tyr Arg Lys  
 1 5 10 15

Ala Asn Lys Ser Ser Lys Leu Val Ser Ala Asn Arg Leu Phe Gly Asp  
 20 25 30

Lys Ser

15 <210> 5  
 <211> 34  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<400> 5

20 Glu Leu Arg Val Arg Leu Ala Ser His Leu Arg Lys Leu Arg Lys Arg  
 1 5 10 15

Leu Leu Arg Asp Ala Asp Asp Leu Gln Lys Arg Leu Ala Val Tyr Gln  
 20 25 30

Ala Gly

25 <210> 6  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<400> 6

Arg Arg Leu Arg Arg Met Glu Ser Glu Ser Glu Ser  
 1 5 10

30 <210> 7  
 <211> 21  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<400> 7

Lys Arg Lys Lys Lys Gly Gly Lys Asn Gly Lys Asn Arg Arg Asn Arg  
 1 5 10 15

Lys Lys Lys Asn Pro  
 20

40 <210> 8  
 <211> 379  
 <212> PRT  
 45 <213> *Homo sapiens*

ES 2 721 172 T3

<400> 8

Met Ala Ser Leu Pro Val Leu Gln Lys Glu Ser Val Phe Gln Ser Gly  
 1 5 10 15

Ala His Ala Tyr Arg Ile Pro Ala Leu Leu Tyr Leu Pro Gly Gln Gln  
 20 25 30

Ser Leu Leu Ala Phe Ala Glu Gln Arg Ala Ser Lys Lys Asp Glu His  
 35 40 45

Ala Glu Leu Ile Val Leu Arg Arg Gly Asp Tyr Asp Ala Pro Thr His  
 50 55 60

Gln Val Gln Trp Gln Ala Gln Glu Val Val Ala Gln Ala Arg Leu Asp  
 65 70 75 80

Gly His Arg Ser Met Asn Pro Cys Pro Leu Tyr Asp Ala Gln Thr Gly  
 85 90 95

Thr Leu Phe Leu Phe Phe Ile Ala Ile Pro Gly Gln Val Thr Glu Gln  
 100 105 110

Gln Gln Leu Gln Thr Arg Ala Asn Val Thr Arg Leu Cys Gln Val Thr  
 115 120 125

Ser Thr Asp His Gly Arg Thr Trp Ser Ser Pro Arg Asp Leu Thr Asp  
 130 135 140



ES 2 721 172 T3

Ala Ala Ile Gly Pro Ala Tyr Arg Glu Trp Ser Thr Phe Ala Val Gly  
 145 150 155 160

Pro Gly His Cys Leu Gln Leu Asn Asp Arg Ala Arg Ser Leu Val Val  
 165 170 175

Pro Ala Tyr Ala Tyr Arg Lys Leu His Pro Ile Gln Arg Pro Ile Pro  
 180 185 190

Ser Ala Phe Cys Phe Leu Ser His Asp His Gly Arg Thr Trp Ala Arg  
 195 200 205

Gly His Phe Val Ala Gln Asp Thr Leu Glu Cys Gln Val Ala Glu Val  
 210 215 220

Glu Thr Gly Glu Gln Arg Val Val Thr Leu Asn Ala Arg Ser His Leu  
 225 230 235 240

Arg Ala Arg Val Gln Ala Gln Ser Thr Asn Asp Gly Leu Asp Phe Gln  
 245 250 255

Glu Ser Gln Leu Val Lys Lys Leu Val Glu Pro Pro Pro Gln Gly Cys  
 260 265 270

Gln Gly Ser Val Ile Ser Phe Pro Ser Pro Arg Ser Gly Pro Gly Ser  
 275 280 285

Pro Gln Trp Leu Leu Tyr Thr His Pro Thr His Ser Trp Gln Arg Ala  
 290 295 300

Asp Leu Gly Ala Tyr Leu Asn Pro Arg Pro Pro Ala Pro Glu Ala Trp  
 305 310 315 320

Ser Glu Pro Val Leu Leu Ala Lys Gly Ser Cys Ala Tyr Ser Asp Leu  
 325 330 335

Gln Ser Met Gly Thr Gly Pro Asp Gly Ser Pro Leu Phe Gly Cys Leu  
 340 345 350

Tyr Glu Ala Asn Asp Tyr Glu Glu Ile Val Phe Leu Met Phe Thr Leu  
 355 360 365

Lys Gln Ala Phe Pro Ala Glu Tyr Leu Pro Gln  
 370 375

5 <210> 9  
 <211> 424  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

10 <400> 9

ES 2 721 172 T3

Leu Ala Gly Gly Ser Val Arg Trp Gly Ala Leu His Val Leu Gly Thr  
 1 5 10 15  
 Ala Ala Leu Ala Glu His Arg Ser Met Asn Pro Cys Pro Val His Asp  
 20 25 30  
 Ala Gly Thr Gly Thr Val Phe Leu Phe Phe Ile Ala Val Leu Gly His  
 35 40 45  
 Thr Pro Glu Ala Val Gln Ile Ala Thr Gly Arg Asn Ala Ala Arg Leu  
 50 55 60  
 Cys Cys Val Ala Ser Arg Asp Ala Gly Leu Ser Trp Gly Ser Ala Arg  
 65 70 75 80  
 Asp Leu Thr Glu Glu Ala Ile Gly Gly Ala Val Gln Asp Trp Ala Thr  
 85 90 95  
 Phe Ala Val Gly Pro Gly His Gly Val Gln Leu Pro Ser Gly Arg Leu  
 100 105 110  
 Leu Val Pro Ala Tyr Thr Tyr Arg Val Asp Arg Leu Glu Cys Phe Gly  
 115 120 125  
 Lys Ile Cys Arg Thr Ser Pro His Ser Phe Ala Phe Tyr Ser Asp Asp  
 130 135 140  
 His Gly Arg Thr Trp Arg Cys Gly Gly Leu Val Pro Asn Leu Arg Ser  
 145 150 155 160  
 Gly Glu Cys Gln Leu Ala Ala Val Asp Gly Gly Gln Ala Gly Ser Phe  
 165 170 175  
 Leu Tyr Cys Asn Ala Arg Ser Pro Leu Gly Ser Arg Val Gln Ala Leu  
 180 185 190  
 Ser Thr Asp Glu Gly Thr Ser Phe Leu Pro Ala Glu Arg Val Ala Ser  
 195 200 205  
 Leu Pro Glu Thr Ala Trp Gly Cys Gln Gly Ser Ile Val Gly Phe Pro  
 210 215 220  
 Ala Pro Ala Pro Asn Arg Pro Arg Asp Asp Ser Trp Ser Val Gly Pro  
 225 230 235 240  
 Arg Ser Pro Leu Gln Pro Pro Leu Leu Gly Pro Gly Val His Glu Pro  
 245 250 255  
 Pro Glu Glu Ala Ala Val Asp Pro Arg Gly Gly Gln Val Pro Gly Gly  
 260 265 270  
 Pro Phe Ser Arg Leu Gln Pro Arg Gly Asp Gly Pro Arg Gln Pro Gly  
 275 280 285

ES 2 721 172 T3

Pro Arg Pro Gly Val Ser Gly Asp Val Gly Ser Trp Thr Leu Ala Leu  
 290 295 300

Pro Met Pro Phe Ala Ala Pro Pro Gln Ser Pro Thr Trp Leu Leu Tyr  
 305 310 315 320

Ser His Pro Val Gly Arg Arg Ala Arg Leu His Met Gly Ile Arg Leu  
 325 330 335

Ser Gln Ser Pro Leu Asp Pro Arg Ser Trp Thr Glu Pro Trp Val Ile  
 340 345 350

Tyr Glu Gly Pro Ser Gly Tyr Ser Asp Leu Ala Ser Ile Gly Pro Ala  
 355 360 365

Pro Glu Gly Gly Leu Val Phe Ala Cys Leu Tyr Glu Ser Gly Ala Arg  
 370 375 380

Thr Ser Tyr Asp Glu Ile Ser Phe Cys Thr Phe Ser Leu Arg Glu Val  
 385 390 395 400

Leu Glu Asn Val Pro Ala Ser Pro Lys Pro Pro Asn Leu Gly Asp Lys  
 405 410 415

Pro Arg Gly Cys Cys Trp Pro Ser  
 420

5 <210> 10  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Construcción sintética  
 <400> 10

15 Gly Gly Gly Gly Ser  
 1 5

20 <210> 11  
 <211> 2706  
 <212> ADN  
 <213> *Actinomyces viscosus*  
 <400> 11

# ES 2 721 172 T3

atgacatcgc atagtccttt ctcccggagg cgcttgcgg ccctcctggg ctccttgcca	60
ctggccgcca cggcctgat cgccgcgca ccccggcgc acgccgtccc cacgtctgac	120
ggcctggccg acgtcaccaat cacgcagggtg aacgcgcccg cggacggcct ctactccgtc	180
ggcgatgtca tgacctcaa catcacctg accaacacca gcggcgagge ccactcctac	240
gccccggcct cgacgaacct gtccgggaac gtctccaagt gccggtggcg caacgtcccg	300
gccgggacga ccaagaccga ctgcaccggc ctggccacgc acacggtgac cgccgaggac	360
ctcaaggccg gtggcttac ccgcagatc gcctacgagg tcaaggccgt ggagtagcc	420
gggaaggccc tgagcaccac ggagacgatc aagggcgca cgagcccagt caaggccaac	480
tcgtgcggg tcgagtcgat cacgccgtcg tcgagccagg agaactacaa gctggggcag	540
accgtcagct acacggtgcg cgtgcgctcg gtgtcggaca agacgatcaa cgtcggccc	600
accgaatcct ccttcgacga cctgggcccgc cagtgccact ggggcggcct caagccgggc	660
aagggcgccc tctacaactg caagccgctc acccacacga tcacgcaagc cgacgtcgac	720
gccggccgct ggacgccatc gatcacctg acggccaccg gaaccgacgg cgccaccctc	780
cagacgtca cggccaccgg caaccggatc aacgtcgtcg gcgaccacc gcaggccacg	840
ccgcaccgg cgcccgacgc gagcacggag ctgccggcct caatgagcca ggcccagcac	900
ctggccgcca acacggccac cgacaactac cgcacccgg cgatcaccac cgccccaat	960
ggggacctgc tcctctcta cgacgagcg ccgaaggaca acggcaacgg cggcagcgac	1020
gcccccaacc cgaaccacat cgtccagcgc cgctccaccg acggcggcaa gacctggtcg	1080
gcgccacct acatcacca gggcacggag accggcaaga aggtcggcta ctccgaccgc	1140
agctacgtcg tcgatacca gacgggcaag atcttcaact tccacgtcaa gtctacgac	1200

ES 2 721 172 T3

cagggctggg ggggctcgg cgggcgacc gaccggaga accggggcat catccagcc 1260  
gaggtgtcga cctccacgga caacggctgg acctggacgc accgcacgat caccgcgac 1320  
atcacgaagg acaagccgtg gaccgcggt ttcgggcct cgggccagg catccagatt 1380  
cagcacgggc cccacgccgg gcgctcgtg cagcagtaca cgatcaggac cgccggcggc 1440  
gcggtgcagg cgtctcgtt ctactccgac gaccacggga agacgtggca ggccggcacg 1500  
ccgatcggga ccggcatgga tgagaacaag gtcgttgagc tctccgacgg ctccctcatg 1560  
ctcaactcgc gcgctcggga tggctccggc ttccgcaagg tggcccactc caccgacggt 1620  
gggcagacct ggagcgagcc ggtgtccgac aagaacctgc ccgactcggg ggacaacgcc 1680  
cagatcatcc gagcctccc gaacgccgg cgggacgacc cgcgcgcaa ggtgctgctg 1740  
ctgagccact caccgaacce gcggccgtgg tcgctgacc gcggcaccat ctcgatgtcc 1800  
tgcgacgacg gcgctcctg gacgaccagc aaggtcttcc acgagccctt cgtcggatac 1860  
acgacgatcg cgggtgcagtc cgacggcagc atcgggctgc tcagcgagga cgcccacaac 1920  
ggcgccgact acggcggcat ctggtaccgc aacttcacga tgaactggct cggcgagcag 1980  
tgcggccaga agccggcgga gccgagccc gcgcccgcgc cgacggcggc accctcagcg 2040  
gcaccgacgg agaagccggc cccgtcggcc gcgcccagcg ctgagccac gcaggcaccg 2100  
gcaccatect ccgcccga gccgagcgt gcgcccagc cgagcagcgc cccggcggc 2160  
gagcccacga ccgctccgag cacggagccc acaccggctc ctgcgcccag ctccgcacct 2220  
gagcagaccg atgggcccac cgtgcgccc gcaccggaga cgtectctgc accggccc 2280  
gaaccgacgc agggcccga ggtgggcct tctgttgagc ccacgcaggc tccgggtgcg 2340  
cagccgagct cagcaccaa gccggggggc acgggtcggg ccccgctcggg ggtgaaccgg 2400  
aaggcgaccg gggcgccgac ggagcctggg acgcccgat cgagcgcgag cccggcaccg 2460  
agccggaacg cggcgccgac gccgaagcc ggcatggagc ccgatgagat tgatcggccc 2520  
tctgacggca ccatggcga gccgaccggt ggcgccagcg gcgagtgct cgcgcccagc 2580  
caggcggcga agggcggcag caggctgtct cgcacggga ccaacgcgct gctgatcctg 2640  
ggccttgccg gtgtcgcggt tgcggcggg tacctgctgc tgggggctcg ccgttcgaag 2700  
aactga 2706

5 <210> 12  
<211> 901  
<212> PRT  
<213> *Actinomyces viscosus*

10 <400> 12

# ES 2 721 172 T3

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

ES 2 721 172 T3

Ser Thr Pro Glu Thr Ile Lys Gly Ala Thr Ser Pro Val Lys Ala Asn  
145 150 155 160

Ser Leu Arg Val Glu Ser Ile Thr Pro Ser Ser Ser Gln Glu Asn Tyr  
165 170 175

Lys Leu Gly Asp Thr Val Ser Tyr Thr Val Arg Val Arg Ser Val Ser  
180 185 190

Asp Lys Thr Ile Asn Val Ala Ala Thr Glu Ser Ser Phe Asp Asp Leu  
195 200 205

Gly Arg Gln Cys His Trp Gly Gly Leu Lys Pro Gly Lys Gly Ala Val  
210 215 220

Tyr Asn Cys Lys Pro Leu Thr His Thr Ile Thr Gln Ala Asp Val Asp  
225 230 235 240

Ala Gly Arg Trp Thr Pro Ser Ile Thr Leu Thr Ala Thr Gly Thr Asp  
245 250 255

Gly Ala Thr Leu Gln Thr Leu Thr Ala Thr Gly Asn Pro Ile Asn Val  
260 265 270

Val Gly Asp His Pro Gln Ala Thr Pro Ala Pro Ala Pro Asp Ala Ser  
275 280 285

Thr Glu Leu Pro Ala Ser Met Ser Gln Ala Gln His Leu Ala Ala Asn  
290 295 300

Thr Ala Thr Asp Asn Tyr Arg Ile Pro Ala Ile Thr Thr Ala Pro Asn  
305 310 315 320

Gly Asp Leu Leu Ile Ser Tyr Asp Glu Arg Pro Lys Asp Asn Gly Asn  
325 330 335

ES 2 721 172 T3

Gly Gly Ser Asp Ala Pro Asn Pro Asn His Ile Val Gln Arg Arg Ser  
 340 345 350

Thr Asp Gly Gly Lys Thr Trp Ser Ala Pro Thr Tyr Ile His Gln Gly  
 355 360 365

Thr Glu Thr Gly Lys Lys Val Gly Tyr Ser Asp Pro Ser Tyr Val Val  
 370 375 380

Asp His Gln Thr Gly Thr Ile Phe Asn Phe His Val Lys Ser Tyr Asp  
 385 390 395 400

Gln Gly Trp Gly Gly Ser Arg Gly Gly Thr Asp Pro Glu Asn Arg Gly  
 405 410 415

Ile Ile Gln Ala Glu Val Ser Thr Ser Thr Asp Asn Gly Trp Thr Trp  
 420 425 430

Thr His Arg Thr Ile Thr Ala Asp Ile Thr Lys Asp Lys Pro Trp Thr  
 435 440 445

Ala Arg Phe Ala Ala Ser Gly Gln Gly Ile Gln Ile Gln His Gly Pro  
 450 455 460

His Ala Gly Arg Leu Val Gln Gln Tyr Thr Ile Arg Thr Ala Gly Gly  
 465 470 475 480

Ala Val Gln Ala Val Ser Val Tyr Ser Asp Asp His Gly Lys Thr Trp  
 485 490 495

Gln Ala Gly Thr Pro Ile Gly Thr Gly Met Asp Glu Asn Lys Val Val  
 500 505 510

Glu Leu Ser Asp Gly Ser Leu Met Leu Asn Ser Arg Ala Ser Asp Gly  
 515 520 525



ES 2 721 172 T3

Ser Gly Phe Arg Lys Val Ala His Ser Thr Asp Gly Gly Gln Thr Trp  
530 535 540

Ser Glu Pro Val Ser Asp Lys Asn Leu Pro Asp Ser Val Asp Asn Ala  
545 550 555 560

Gln Ile Ile Arg Ala Phe Pro Asn Ala Ala Pro Asp Asp Pro Arg Ala  
565 570 575

Lys Val Leu Leu Leu Ser His Ser Pro Asn Pro Arg Pro Trp Ser Arg  
580 585 590

Asp Arg Gly Thr Ile Ser Met Ser Cys Asp Asp Gly Ala Ser Trp Thr  
595 600 605

Thr Ser Lys Val Phe His Glu Pro Phe Val Gly Tyr Thr Thr Ile Ala  
610 615 620

Val Gln Ser Asp Gly Ser Ile Gly Leu Leu Ser Glu Asp Ala His Asn  
625 630 635 640

Gly Ala Asp Tyr Gly Gly Ile Trp Tyr Arg Asn Phe Thr Met Asn Trp  
645 650 655

Leu Gly Glu Gln Cys Gly Gln Lys Pro Ala Glu Pro Ser Pro Ala Pro  
660 665 670

Ser Pro Thr Ala Ala Pro Ser Ala Ala Pro Thr Glu Lys Pro Ala Pro  
675 680 685

Ser Ala Ala Pro Ser Ala Glu Pro Thr Gln Ala Pro Ala Pro Ser Ser  
690 695 700

Ala Pro Glu Pro Ser Ala Ala Pro Glu Pro Ser Ser Ala Pro Ala Pro

ES 2 721 172 T3

```

705                                710                                715                                720
Glu Pro Thr Thr Ala Pro Ser Thr Glu Pro Thr Pro Ala Pro Ala Pro
              725                                730                                735
Ser Ser Ala Pro Glu Gln Thr Asp Gly Pro Thr Ala Ala Pro Ala Pro
              740                                745                                750
Glu Thr Ser Ser Ala Pro Ala Ala Glu Pro Thr Gln Ala Pro Thr Val
              755                                760                                765
Ala Pro Ser Val Glu Pro Thr Gln Ala Pro Gly Ala Gln Pro Ser Ser
              770                                775                                780
Ala Pro Lys Pro Gly Ala Thr Gly Arg Ala Pro Ser Val Val Asn Pro
              785                                790                                795                                800
Lys Ala Thr Gly Ala Ala Thr Glu Pro Gly Thr Pro Ser Ser Ser Ala
              805                                810                                815
Ser Pro Ala Pro Ser Arg Asn Ala Ala Pro Thr Pro Lys Pro Gly Met
              820                                825                                830
Glu Pro Asp Glu Ile Asp Arg Pro Ser Asp Gly Thr Met Ala Gln Pro
              835                                840                                845
Thr Gly Gly Ala Ser Ala Pro Ser Ala Ala Pro Thr Gln Ala Ala Lys
              850                                855                                860
Ala Gly Ser Arg Leu Ser Arg Thr Gly Thr Asn Ala Leu Leu Ile Leu
              865                                870                                875                                880
Gly Leu Ala Gly Val Ala Val Val Gly Gly Tyr Leu Leu Leu Arg Ala
              885                                890                                895
Arg Arg Ser Lys Asn
              900

```

5 <210> 13  
 <211> 1887  
 <212> ADN  
 <213> *Actinomyces viscosus*

10 <400> 13

ES 2 721 172 T3

ggcgaccacc cgcaggccac gcccgaccg gcgcccgcg cgagcacgga gctgccggcc 60  
 tcaatgagcc aggccagca cctggccgcc aacacggcca cggacaacta ccgcatcccc 120  
 gcgatcacca cggccccaa tggggacctg ctcatctcct acgacgagcg cccgaaggac 180  
 aacggcaacg gcggcagcga cggccccaac ccgaaccaca tegtccagcg ccgetccacc 240  
 gacggcggca agacctggtc ggcgcccacc tacatccacc agggcacgga gaccggcaag 300  
 aaggtcggct actccgaccc gagctacgtc gtcgatcacc agacgggcac gatcttcaac 360  
 ttccacgtca agtcctacga ccagggctgg ggcggctcgc gggcgggcac cgaccggag 420  
 aaccggggca tcatccaggc cgaggtgctg acctccacgg acaacggctg gacctggacg 480  
 caccgcacga tcaccggga catcacgaag gacaagcctt ggaccgcgcg tttcgcggcc 540  
 tcgggccagg gcatccagat tcagcacggg cccacgcgg ggcgcctggt gcagcagtac 600  
 acgatcagga ccgcccggcg cgcggtgcag gccgtctcgg tctactccga cgaccacggg 660  
 aagacgtggc aggccggcac gccgatcggg accggcatgg atgagaacaa ggtcgttgag 720  
 ctctccgacg gctccctcat gctcaactcg cgcgcctcgg atggctccgg ctccgcaag 780  
 gtggcccact ccaccgacgg tgggcagacc tggagcgagc cgggtgtccga caagaacctg 840  
 cccgactcgg tggacaacgc ccagatcatt cgagccttcc cgaacgccgc gccggacgac 900  
 ccgcgccca aggtgctgct gctgagccac tcaccgaacc cgcggccgtg gtcgctgac 960  
 cgcggcacca tctcgatgtc ctgcgacgac ggcgcctcct ggacgaccag caaggtcttc 1020  
 cacgagccct tcgtcggata cacgacgacg gcggtgcagt ccgacggcag catcgggctg 1080  
 ctacgcgagc acgcccaca cggcgcggac tacggcggca tctggtaccg caacttcacg 1140  
 atgaactggc tcggcgagca gtgcggccag aagccggcgg agccgagccc ggcgcctcgg 1200  
 ccgacggcgg caccctcagc ggcaccgacg gagaagccgg ccccgctcggc cgcgcccagc 1260  
 gctgagccca cgcaggcacc ggcaccatcc tccgcgcccg agccgagcgc tgcgcccag 1320  
 ccgagcagcg ccccgcgcc ggagcccacg accgctccga gcacggagcc cacaccggct 1380  
 cctgcgcccga gctccgcacc tgagcagacc gatgggcccga ccgctgcgcc cgcaccggag 1440  
 acgtcctctg caccggcgc cgaaccgacg caggccccga cggtagcgc tctgtgtgag 1500  
 cccacgcagg ctccgggtgc gcagccgagc tcagcaccca agccgggggc gacgggtcgg 1560  
 gcccgctcgg tggtagaacc gaagcgacg gggcgggcga cggagcctgg gacgccgtca 1620  
 tcgagcgcga gcccgccacc gagccggaac gcggcgccga cggcgaagcc gggcatggag 1680  
 cccgatgaga ttgatcggcc gtctgacggc accatggcgc agccgaccgg tggcgcagc 1740  
 gcgcccagtg ccgcccggac gcagggcggc aaggccggca gcaggctgtc tcgcacggg 1800  
 accaacgcgc tgctgatcct ggccttgcg ggtgtcgcgg ttgtcggcgg gtacctgctg 1860  
 ctgcgggctc gccgttcgaa gaactga 1887

5 <210> 14  
 <211> 628  
 <212> PRT  
 <213> *Actinomyces viscosus*

ES 2 721 172 T3

<400> 14

Gly Asp His Pro Gln Ala Thr Pro Ala Pro Ala Pro Asp Ala Ser Thr  
 1 5 10 15

Glu Leu Pro Ala Ser Met Ser Gln Ala Gln His Leu Ala Ala Asn Thr  
 20 25 30

Ala Thr Asp Asn Tyr Arg Ile Pro Ala Ile Thr Thr Ala Pro Asn Gly  
 35 40 45

Asp Leu Leu Ile Ser Tyr Asp Glu Arg Pro Lys Asp Asn Gly Asn Gly  
 50 55 60

Gly Ser Asp Ala Pro Asn Pro Asn His Ile Val Gln Arg Arg Ser Thr  
 65 70 75 80

Asp Gly Gly Lys Thr Trp Ser Ala Pro Thr Tyr Ile His Gln Gly Thr  
 85 90 95

Glu Thr Gly Lys Lys Val Gly Tyr Ser Asp Pro Ser Tyr Val Val Asp  
 100 105 110

His Gln Thr Gly Thr Ile Phe Asn Phe His Val Lys Ser Tyr Asp Gln  
 115 120 125

Gly Trp Gly Gly Ser Arg Gly Gly Thr Asp Pro Glu Asn Arg Gly Ile  
 130 135 140

Ile Gln Ala Glu Val Ser Thr Ser Thr Asp Asn Gly Trp Thr Trp Thr  
 145 150 155 160

His Arg Thr Ile Thr Ala Asp Ile Thr Lys Asp Lys Pro Trp Thr Ala  
 165 170 175

Arg Phe Ala Ala Ser Gly Gln Gly Ile Gln Ile Gln His Gly Pro His  
 180 185 190

Ala Gly Arg Leu Val Gln Gln Tyr Thr Ile Arg Thr Ala Gly Gly Ala  
 195 200 205

Val Gln Ala Val Ser Val Tyr Ser Asp Asp His Gly Lys Thr Trp Gln  
 210 215 220

Ala Gly Thr Pro Ile Gly Thr Gly Met Asp Glu Asn Lys Val Val Glu  
 225 230 235 240

ES 2 721 172 T3

Leu Ser Asp Gly Ser Leu Met Leu Asn Ser Arg Ala Ser Asp Gly Ser  
 245 250 255

Gly Phe Arg Lys Val Ala His Ser Thr Asp Gly Gly Gln Thr Trp Ser  
 260 265 270

Glu Pro Val Ser Asp Lys Asn Leu Pro Asp Ser Val Asp Asn Ala Gln  
 275 280 285

Ile Ile Arg Ala Phe Pro Asn Ala Ala Pro Asp Asp Pro Arg Ala Lys  
 290 295 300

Val Leu Leu Leu Ser His Ser Pro Asn Pro Arg Pro Trp Ser Arg Asp  
 305 310 315 320

Arg Gly Thr Ile Ser Met Ser Cys Asp Asp Gly Ala Ser Trp Thr Thr  
 325 330 335

Ser Lys Val Phe His Glu Pro Phe Val Gly Tyr Thr Thr Ile Ala Val  
 340 345 350

Gln Ser Asp Gly Ser Ile Gly Leu Leu Ser Glu Asp Ala His Asn Gly  
 355 360 365

Ala Asp Tyr Gly Gly Ile Trp Tyr Arg Asn Phe Thr Met Asn Trp Leu  
 370 375 380

Gly Glu Gln Cys Gly Gln Lys Pro Ala Glu Pro Ser Pro Ala Pro Ser  
 385 390 395 400

Pro Thr Ala Ala Pro Ser Ala Ala Pro Thr Glu Lys Pro Ala Pro Ser  
 405 410 415

Ala Ala Pro Ser Ala Glu Pro Thr Gln Ala Pro Ala Pro Ser Ser Ala  
 420 425 430

ES 2 721 172 T3

Pro Glu Pro Ser Ala Ala Pro Glu Pro Ser Ser Ala Pro Ala Pro Glu  
 435 440 445

Pro Thr Thr Ala Pro Ser Thr Glu Pro Thr Pro Ala Pro Ala Pro Ser  
 450 455 460

Ser Ala Pro Glu Gln Thr Asp Gly Pro Thr Ala Ala Pro Ala Pro Glu  
 465 470 475 480

Thr Ser Ser Ala Pro Ala Ala Glu Pro Thr Gln Ala Pro Thr Val Ala  
 485 490 495

Pro Ser Val Glu Pro Thr Gln Ala Pro Gly Ala Gln Pro Ser Ser Ala  
 500 505 510

Pro Lys Pro Gly Ala Thr Gly Arg Ala Pro Ser Val Val Asn Pro Lys  
 515 520 525

Ala Thr Gly Ala Ala Thr Glu Pro Gly Thr Pro Ser Ser Ser Ala Ser  
 530 535 540

Pro Ala Pro Ser Arg Asn Ala Ala Pro Thr Pro Lys Pro Gly Met Glu  
 545 550 555 560

Pro Asp Glu Ile Asp Arg Pro Ser Asp Gly Thr Met Ala Gln Pro Thr  
 565 570 575

Gly Gly Ala Ser Ala Pro Ser Ala Ala Pro Thr Gln Ala Ala Lys Ala  
 580 585 590

Gly Ser Arg Leu Ser Arg Thr Gly Thr Asn Ala Leu Leu Ile Leu Gly  
 595 600 605

Leu Ala Gly Val Ala Val Val Gly Gly Tyr Leu Leu Leu Arg Ala Arg  
 610 615 620

Arg Ser Lys Asn  
 625

5 <210> 15  
 <211> 1182  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Construcción sintética

<400> 15

ES 2 721 172 T3

```

ggagatcatc cacaagctac accagcacct gcaccagatg ctagcactga gctgccagca      60
agcatgtctc aggctcagca tcttgca gca aatacggcta ctgataatta tcgcattcca      120
gcgattacaa ccgctccgaa tggtgattta ctgattagct atgatgaacg gccgaaggac      180
aatggaaatg gtggttccga tgcccctaac ccgaatcata ttgttcagcg tcgctccaca      240
gatggcggta aaacttggag cgcgccaaacc tatattcatc agggtagcga gactggcaag      300
aaagtgggat attccgaccc ctcttatgtg gtggatcatc aaaccggtag aatcttcaat      360
tttcatgtga aatcatacga tcagggtgg ggaggtagcc gtgggggaac agaccggaa      420
aaccgcgga ttattcagc agaggtgtct acgagcacgg ataatggatg gacgtggaca      480
catcgcacca tcaccgcgga tattacgaaa gataaacctg ggaccgcgcg ttttgcggcg      540
tcggccaag gcattcagat ccagcatggg ccgcatgccg gccgtctggt gcaacagtat      600
accattcgta cggccggtgg agcgggtgcag gctgtatcgg tttattccga tgatcatggg      660
aaaacgtggc aggctggcac cccgattggg acgggtatgg atgaaaaca agttgtagag      720
ctgtctgacg gctctctgat gctgaacagt cgtgcgtcgg acgggagcgg ctttcgtaag      780
gttgcgcata gcactgatgg tgggcagacc tggccgaac cggtttcgga caaaaatttg      840
ccggattcgg ttgataatgc ccagataatt cgtgcgtttc ctaatgctgc ccccgatgac      900
ccgcgcgca aagtaacttct tctgagtcac tccccaaac cactccgtg gtcccgggat      960
cgtggtacga taagcatgtc atgtgatgac gggcctcat ggaccacttc caaagtttt      1020
caogaaccgt ttgtgggcta cagactatt gcagttcaga gtgatggaag catcggtctg      1080
ctgtcggagg acgcgacaa tggcgtgat tatggtggca tctggtatcg taattttacg      1140
atgaactggc tgggagaaca atgtggacaa aaaccgagg aa                                1182

```

5 <210> 16  
 <211> 394  
 <212> PRT  
 <213> *Actinomyces viscosus*

10 <400> 16

# ES 2 721 172 T3

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



ES 2 721 172 T3

Gly Trp Gly Gly Ser Arg Gly Gly Thr Asp Pro Glu Asn Arg Gly Ile  
 130 135 140

Ile Gln Ala Glu Val Ser Thr Ser Thr Asp Asn Gly Trp Thr Trp Thr  
 145 150 155 160

His Arg Thr Ile Thr Ala Asp Ile Thr Lys Asp Lys Pro Trp Thr Ala  
 165 170 175

Arg Phe Ala Ala Ser Gly Gln Gly Ile Gln Ile Gln His Gly Pro His  
 180 185 190

Ala Gly Arg Leu Val Gln Gln Tyr Thr Ile Arg Thr Ala Gly Gly Ala  
 195 200 205

Val Gln Ala Val Ser Val Tyr Ser Asp Asp His Gly Lys Thr Trp Gln  
 210 215 220

Ala Gly Thr Pro Ile Gly Thr Gly Met Asp Glu Asn Lys Val Val Glu  
 225 230 235 240

Leu Ser Asp Gly Ser Leu Met Leu Asn Ser Arg Ala Ser Asp Gly Ser  
 245 250 255

Gly Phe Arg Lys Val Ala His Ser Thr Asp Gly Gly Gln Thr Trp Ser  
 260 265 270

Glu Pro Val Ser Asp Lys Asn Leu Pro Asp Ser Val Asp Asn Ala Gln  
 275 280 285

Ile Ile Arg Ala Phe Pro Asn Ala Ala Pro Asp Asp Pro Arg Ala Lys  
 290 295 300

Val Leu Leu Leu Ser His Ser Pro Asn Pro Arg Pro Trp Ser Arg Asp  
 305 310 315 320

Arg Gly Thr Ile Ser Met Ser Cys Asp Asp Gly Ala Ser Trp Thr Thr  
 325 330 335

Ser Lys Val Phe His Glu Pro Phe Val Gly Tyr Thr Thr Ile Ala Val  
 340 345 350

Gln Ser Asp Gly Ser Ile Gly Leu Leu Ser Glu Asp Ala His Asn Gly  
 355 360 365

Ala Asp Tyr Gly Gly Ile Trp Tyr Arg Asn Phe Thr Met Asn Trp Leu  
 370 375 380

Gly Glu Gln Cys Gly Gln Lys Pro Ala Glu  
 385 390

ES 2 721 172 T3

<210> 17  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 5  
 <220>  
 <223> Construcción sintética  
 <400> 17  
 10  
 Met Val Lys Arg Lys Lys  
 1 5  
 <210> 18  
 <211> 1281  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 15  
 <220>  
 <223> Construcción sintética  
 20  
 <400> 18  
 ccatggttaa gcgcaaaaaa aaaggcggca aaaacggtaa aaatcgtcgt aaccgtaaga 60  
 aaaaaaatcc tggagatcat ccacaagcta caccagcacc tgcaccagat gctagcactg 120  
 agctgccagc aagcatgtct caggctcagc atcttgagc aaatacggct actgataatt 180  
 atcgcatcc agcgattaca accgctccga atggtgattt actgattagc tatgatgaac 240  
 ggccgaagga caatggaat ggtggtccg atgcccctaa cccgaatcat attgttcagc 300  
 gtcgctccac agatggcggg aaaacttggg gcgcgccaac ctatattcat cagggtacgg 360  
 agactggcaa gaaagtggga tattccgacc cctcttatgt ggtggatcat caaaccggta 420  
 caatcttcaa ttttcatgtg aaatcatacg atcagggctg gggaggtagc cgtgggggaa 480  
 cagacccgga aaaccgagg attattcagg cagaggtgtc tacgagcacg gataatggat 540  
 ggacgtggac acatcgacc atcaccgagg atattacgaa agataaacgg tggaccgcgc 600  
 gttttgcggc gtcgggcaa ggcattcaga tccagcatgg gccgcatgcc ggccgtctgg 660  
 tgcaacagta taccattcgt acggccgggt gagcgggtgca ggctgtatcg gtttattccg 720  
 atgatcatgg gaaaacgtgg caggctggca ccccgattgg gacgggtatg gatgaaaaca 780  
 aagttgtaga gctgtctgac ggctctctga tgctgaacag tcgtgcgtcg gacgggagcg 840  
 gctttcgtaa ggttgcgcat agcactgatg gtgggcagac ctggtccgaa ccggtttcgg 900  
 acaaaaattt gccggattcg gttgataatg cccagataat tcgtgcgttt cctaagtctg 960  
 ccccgatga cccgcgcgcg aaagtacttc ttctgagtca ttccccaaat ccacgtccgt 1020  
 ggtcccggga tcgtggtacg ataagcatgt catgtgatga cggggcctca tggaccactt 1080  
 ccaaagtttt tcacgaaccg tttgtgggct acacgactat tgcagttcag agtgatggaa 1140  
 gcatcggctc gctgtcggag gacgcgaca atggcgctga ttatgggtggc atctggatc 1200  
 gtaattttac gatgaactgg ctgggagaac aatgtggaca aaaaccgcg gaataagctt 1260  
 aaaaaccgca ggaataagct t 1281  
 25 <210> 19

# ES 2 721 172 T3

<211> 444  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

5 <220>  
 <223> Construcción sintética

<400> 19

```

Met Val Lys Arg Lys Lys Lys Gly Gly Lys Asn Gly Lys Asn Arg Arg
1          5          10          15

Asn Arg Lys Lys Lys Asn Pro Gly Asp His Pro Gln Ala Thr Pro Ala
20          25          30

Pro Ala Pro Asp Ala Ser Thr Glu Leu Pro Ala Ser Met Ser Gln Ala
35          40          45

Gln His Leu Ala Ala Asn Thr Ala Thr Asp Asn Tyr Arg Ile Pro Ala
50          55          60

Ile Thr Thr Ala Pro Asn Gly Asp Leu Leu Ile Ser Tyr Asp Glu Arg
65          70          75          80

Pro Lys Asp Asn Gly Asn Gly Gly Ser Asp Ala Pro Asn Pro Asn His
85          90          95

Ile Val Gln Arg Arg Ser Thr Asp Gly Gly Lys Thr Trp Ser Ala Pro
100         105

Thr Tyr Ile His Gln Gly Thr Glu Thr Gly Lys Lys Val Gly Tyr Ser
115         120         125

Asp Pro Ser Tyr Val Val Asp His Gln Thr Gly Thr Ile Phe Asn Phe
130         135         140

His Val Lys Ser Tyr Asp Gln Gly Trp Gly Gly Ser Arg Gly Gly Thr
145         150         155         160
  
```

10

ES 2 721 172 T3

Asp Pro Glu Asn Arg Gly Ile Ile Gln Ala Glu Val Ser Thr Ser Thr  
 165 170 175  
 Asp Asn Gly Trp Thr Trp Thr His Arg Thr Ile Thr Ala Asp Ile Thr  
 180 185 190  
 Lys Asp Lys Pro Trp Thr Ala Arg Phe Ala Ala Ser Gly Gln Gly Ile  
 195 200 205  
 Gln Ile Gln His Gly Pro His Ala Gly Arg Leu Val Gln Gln Tyr Thr  
 210 215 220  
 Ile Arg Thr Ala Gly Gly Ala Val Gln Ala Val Ser Val Tyr Ser Asp  
 225 230 235 240  
 Asp His Gly Lys Thr Trp Gln Ala Gly Thr Pro Ile Gly Thr Gly Met  
 245 250 255  
 Asp Glu Asn Lys Val Val Glu Leu Ser Asp Gly Ser Leu Met Leu Asn  
 260 265 270  
 Ser Arg Ala Ser Asp Gly Ser Gly Phe Arg Lys Val Ala His Ser Thr  
 275 280 285  
 Asp Gly Gly Gln Thr Trp Ser Glu Pro Val Ser Asp Lys Asn Leu Pro  
 290 295 300  
 Asp Ser Val Asp Asn Ala Gln Ile Ile Arg Ala Phe Pro Asn Ala Ala  
 305 310 315 320  
 Pro Asp Asp Pro Arg Ala Lys Val Leu Leu Leu Ser His Ser Pro Asn  
 325 330 335  
 Pro Arg Pro Trp Ser Arg Asp Arg Gly Thr Ile Ser Met Ser Cys Asp

# ES 2 721 172 T3

340	345	350
Asp Gly Ala Ser Trp Thr Thr 355	Ser Lys Val Phe His Glu Pro Phe Val 360	Glu Pro Phe Val 365
Gly Tyr Thr Thr Ile Ala Val Gln Ser Asp Gly Ser Ile Gly Leu Leu 370	Val Gln Ser Asp Gly Ser Ile Gly Leu Leu 375	Ser Ile Gly Leu Leu 380
Ser Glu Asp Ala His Asn Gly Ala Asp Tyr Gly Gly Ile Trp Tyr Arg 385	Asn Gly Ala Asp Tyr Gly Gly Ile Trp Tyr Arg 390	Gly Gly Ile Trp Tyr Arg 395
Asn Phe Thr Met Asn Trp Leu Gly Glu Gln Cys Gly Gln Lys Pro Ala 405	Trp Leu Gly Glu Gln Cys Gly Gln Lys Pro Ala 410	Gln Lys Pro Ala 415
Glu Gly Ala Asp Tyr Gly Gly Ile Trp Tyr Arg Asn Phe Thr Met Asn 420	Tyr Gly Gly Ile Trp Tyr Arg Asn Phe Thr Met Asn 425	Asn Phe Thr Met Asn 430
Trp Leu Gly Glu Gln Cys Gly Gln Lys Pro Ala Glu 435	Glu Gln Lys Pro Ala Glu 440	

- 5 <210> 20
- <211> 1248
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
  
- <220>
- 10 <223> Construcción sintética
  
- <400> 20

```

atgggagatc atccacaagc tacaccagca cctgcaccag atgctagcac tgagctgcca      60
gcaagcatgt ctcaggctca gcatcttgca gcaaatacgg ctactgataa ttatcgcatt      120
ccagcgatta caaccgctcc gaatggtgat ttactgatta gctatgatga acggccgaag      180
gacaatgga atggtggttc cgatgccct aaccggaatc atattgttca gcgctcctcc      240
acagatggcg gtaaaacttg gagcgcgcca acctatattc atcagggtac ggagactggc      300
aagaaagtgg gatattcoga ccctcttat gtggtggatc atcaaaccgg tacaatcttc      360
    
```

ES 2 721 172 T3

aattttcatg tgaaatcata cgatcagggc tggggaggta gccgtggggg aacagaccgc 420  
 gaaaaccgcg ggattattca ggagaggtg tctacgagca cggataatgg atggacgtgg 480  
 acacatcgca ccatcaccgc ggatattacg aaagataaac cgtggaccgc gcgttttgcg 540  
 gcgtccggcc aaggcattca gatccagcat gggcccgatg ccggccgtct ggtgcaacag 600  
 tatacattc gtacggccgg tggagcggg caggctgtat cggtttattc cgatgatcat 660  
 gggaaaacgt ggcaggctgg caccocgatt gggacgggta tggatgaaaa caaagttgta 720  
 gagctgtctg acggctctct gatgtgaac agtcgtgcgt cggacgggag cggctttcgt 780  
 aaggttgctc atagcaactga tgggtggcag acctggtccg aaccggtttc ggacaaaaat 840  
 ttgccggatt cggttgataa tgcccagata attcgtgcgt ttccctaatgc tgcccccgat 900  
 gaccgcgcg cgaaagtact tcttctgagt cattcccaa atccacgtcc gtgggtcccgg 960  
 gatcgtggta cgataagcat gtcattgat gacggggcct catggaccac ttccaaagtt 1020  
 ttccacgaac cgtttgtggg ctacacgact attgcagttc agagtgatgg aagcatcgg 1080  
 ctgctgtcgg aggacgcgca caatggcgt gattatggg gcatctggta tcgtaatttt 1140  
 acgatgaact ggctgggaga acaatgtgga caaaaaccgc cgaagcgcaa aaaaaaggc 1200  
 ggcaaaaacg gtaaaaatcg tcgtaaccgt aagaaaaaaa atccttga 1248

<210> 21

<211> 415

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Construcción sintética

<400> 21

Met Gly Asp His Pro Gln Ala Thr Pro Ala Pro Ala Pro Asp Ala Ser  
 1 5 10 15

Thr Glu Leu Pro Ala Ser Met Ser Gln Ala Gln His Leu Ala Ala Asn  
 20 25 30

ES 2 721 172 T3

Thr Ala Thr Asp Asn Tyr Arg Ile Pro Ala Ile Thr Thr Ala Pro Asn  
 35 40 45

Gly Asp Leu Leu Ile Ser Tyr Asp Glu Arg Pro Lys Asp Asn Gly Asn  
 50 55 60

Gly Gly Ser Asp Ala Pro Asn Pro Asn His Ile Val Gln Arg Arg Ser  
 65 70 75 80

Thr Asp Gly Gly Lys Thr Trp Ser Ala Pro Thr Tyr Ile His Gln Gly  
 85 90 95

Thr Glu Thr Gly Lys Lys Val Gly Tyr Ser Asp Pro Ser Tyr Val Val  
 100 105 110

Asp His Gln Thr Gly Thr Ile Phe Asn Phe His Val Lys Ser Tyr Asp  
 115 120 125

Gln Gly Trp Gly Gly Ser Arg Gly Gly Thr Asp Pro Glu Asn Arg Gly  
 130 135 140

Ile Ile Gln Ala Glu Val Ser Thr Ser Thr Asp Asn Gly Trp Thr Trp  
 145 150 155 160

Thr His Arg Thr Ile Thr Ala Asp Ile Thr Lys Asp Lys Pro Trp Thr  
 165 170 175

Ala Arg Phe Ala Ala Ser Gly Gln Gly Ile Gln Ile Gln His Gly Pro  
 180 185 190

His Ala Gly Arg Leu Val Gln Gln Tyr Thr Ile Arg Thr Ala Gly Gly  
 195 200 205

Ala Val Gln Ala Val Ser Val Tyr Ser Asp Asp His Gly Lys Thr Trp  
 210 215 220

ES 2 721 172 T3

Gln Ala Gly Thr Pro Ile Gly Thr Gly Met Asp Glu Asn Lys Val Val  
 225 230 235 240

Glu Leu Ser Asp Gly Ser Leu Met Leu Asn Ser Arg Ala Ser Asp Gly  
 245 250 255

Ser Gly Phe Arg Lys Val Ala His Ser Thr Asp Gly Gly Gln Thr Trp  
 260 265 270

Ser Glu Pro Val Ser Asp Lys Asn Leu Pro Asp Ser Val Asp Asn Ala  
 275 280 285

Gln Ile Ile Arg Ala Phe Pro Asn Ala Ala Pro Asp Asp Pro Arg Ala  
 290 295 300

Lys Val Leu Leu Leu Ser His Ser Pro Asn Pro Arg Pro Trp Ser Arg  
 305 310 315 320

Asp Arg Gly Thr Ile Ser Met Ser Cys Asp Asp Gly Ala Ser Trp Thr  
 325 330 335

Thr Ser Lys Val Phe His Glu Pro Phe Val Gly Tyr Thr Thr Ile Ala  
 340 345 350

Val Gln Ser Asp Gly Ser Ile Gly Leu Leu Ser Glu Asp Ala His Asn  
 355 360 365

Gly Ala Asp Tyr Gly Gly Ile Trp Tyr Arg Asn Phe Thr Met Asn Trp  
 370 375 380

Leu Gly Glu Gln Cys Gly Gln Lys Pro Ala Lys Arg Lys Lys Lys Gly  
 385 390 395 400

Gly Lys Asn Gly Lys Asn Arg Arg Asn Arg Lys Lys Lys Asn Pro  
 405 410 415

- 5 <210> 22
- <211> 1293
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- 10 <223> Construcción sintética
- <400> 22



ES 2 721 172 T3

atgggagatc atccacaagc tacaccagca cctgcaccag atgctagcac tgagctgcca 60  
 gcaagcatgt ctcaggctca gcatcttgca gcaaatacgg ctactgataa ttatcgcatt 120  
 ccagcgatta caaccgctcc gaatggtgat ttactgatta gctatgatga acggccgaag 180  
 gacaatggaa atggtggttc cgatgccctt aaccggaatc atattgttca gcgtcgctcc 240  
 acagatggcg gtaaaacttg gagcgcgcca acctatattc atcagggtac ggagactggc 300  
 aagaaagtgg gatattccga cccctcttat gtggtggatc atcaaaccgg tacaatcttc 360  
 aatthttcatg tgaatcata cgatcagggc tggggaggta gccgtggggg aacagaccgg 420  
 gaaaaccgcg ggattattca ggcagagggtg tctacgagca cggataatgg atggacgtgg 480  
 acacatcgca ccatcaccgc ggatattacg aaagataaac cgtggaccgc gcgttttgcg 540  
 gcgtccggcc aaggcattca gatccagcat gggccgcatg ccggccgtct ggtgcaacag 600  
 tatacattc gtacggccgg tggagcgggtg caggctgtat cggtttattc cgatgatcat 660  
 gggaaaacgt ggcaggctgg caccctgatt gggacgggta tggatgaaaa caaagttgta 720  
 gagctgtctg acggctctct gatgtgtaac agtcgtgctt cggacgggag cggctttcgt 780  
 aaggttgctg atagcactga tgggtggcag acctggtccg aaccggttcc ggacaaaaat 840  
 ttgccggatt cggttgataa tgcccagata attcgtgctt ttctaatagc tgccccgat 900  
 gaccgcgctg cgaaagtact tcttctgagt cattcccaa atccacgtcc gtggtcccgg 960  
 gatcgtggtg cgataagcat gtcattgtgat gacggggcct catggaccac ttccaaagtt 1020  
 tttcacgaac cgtttggtgg ctacacgact attgcagttc agagtgatgg aagcatcggg 1080  
 ctgctgtcgg aggacgcgca caatggcgtt gattatggtg gcatctggta tcgtaatttt 1140  
 acgatgaact ggctgggaga acaatgtgga caaaaaccgg cggaaccgag cccagcccct 1200  
 agccctactg cagcaccgtc cgctgcaaag cgcaaaaaaa aaggcggcaa aaacggtaaa 1260  
 aatcgtcgtg accgtaagaa aaaaaatcct tga 1293

5 <210> 23  
 <211> 430  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Construcción sintética

<400> 23

# ES 2 721 172 T3

Met	Gly	Asp	His	Pro	Gln	Ala	Thr	Pro	Ala	Pro	Ala	Pro	Asp	Ala	Ser
1				5					10					15	
Thr	Glu	Leu	Pro	Ala	Ser	Met	Ser	Gln	Ala	Gln	His	Leu	Ala	Ala	Asn
			20					25					30		
Thr	Ala	Thr	Asp	Asn	Tyr	Arg	Ile	Pro	Ala	Ile	Thr	Thr	Ala	Pro	Asn
		35					40					45			
Gly	Asp	Leu	Leu	Ile	Ser	Tyr	Asp	Glu	Arg	Pro	Lys	Asp	Asn	Gly	Asn
	50					55					60				
Gly	Gly	Ser	Asp	Ala	Pro	Asn	Pro	Asn	His	Ile	Val	Gln	Arg	Arg	Ser
65					70					75					80
Thr	Asp	Gly	Gly	Lys	Thr	Trp	Ser	Ala	Pro	Thr	Tyr	Ile	His	Gln	Gly
				85					90					95	
Thr	Glu	Thr	Gly	Lys	Lys	Val	Gly	Tyr	Ser	Asp	Pro	Ser	Tyr	Val	Val
			100					105					110		

ES 2 721 172 T3

Asp His Gln Thr Gly Thr Ile Phe Asn Phe His Val Lys Ser Tyr Asp  
 115 120 125

Gln Gly Trp Gly Gly Ser Arg Gly Gly Thr Asp Pro Glu Asn Arg Gly  
 130 135 140

Ile Ile Gln Ala Glu Val Ser Thr Ser Thr Asp Asn Gly Trp Thr Trp  
 145 150 155 160

Thr His Arg Thr Ile Thr Ala Asp Ile Thr Lys Asp Lys Pro Trp Thr  
 165 170 175

Ala Arg Phe Ala Ala Ser Gly Gln Gly Ile Gln Ile Gln His Gly Pro  
 180 185 190

His Ala Gly Arg Leu Val Gln Gln Tyr Thr Ile Arg Thr Ala Gly Gly  
 195 200 205

Ala Val Gln Ala Val Ser Val Tyr Ser Asp Asp His Gly Lys Thr Trp  
 210 215 220

Gln Ala Gly Thr Pro Ile Gly Thr Gly Met Asp Glu Asn Lys Val Val  
 225 230 235 240

Glu Leu Ser Asp Gly Ser Leu Met Leu Asn Ser Arg Ala Ser Asp Gly  
 245 250 255

Ser Gly Phe Arg Lys Val Ala His Ser Thr Asp Gly Gly Gln Thr Trp  
 260 265 270

Ser Glu Pro Val Ser Asp Lys Asn Leu Pro Asp Ser Val Asp Asn Ala  
 275 280 285

Gln Ile Ile Arg Ala Phe Pro Asn Ala Ala Pro Asp Asp Pro Arg Ala  
 290 295 300

# ES 2 721 172 T3

Lys Val Leu Leu Leu Ser His Ser Pro Asn Pro Arg Pro Trp Ser Arg  
 305 310 315 320  
 Asp Arg Gly Thr Ile Ser Met Ser Cys Asp Asp Gly Ala Ser Trp Thr  
 325 330 335  
 Thr Ser Lys Val Phe His Glu Pro Phe Val Gly Tyr Thr Thr Ile Ala  
 340 345 350  
 Val Gln Ser Asp Gly Ser Ile Gly Leu Leu Ser Glu Asp Ala His Asn  
 355 360 365  
 Gly Ala Asp Tyr Gly Gly Ile Trp Tyr Arg Asn Phe Thr Met Asn Trp  
 370 375 380  
 Leu Gly Glu Gln Cys Gly Gln Lys Pro Ala Glu Pro Ser Pro Ala Pro  
 385 390 395 400  
 Ser Pro Thr Ala Ala Pro Ser Ala Ala Lys Arg Lys Lys Lys Gly Gly  
 405 410 415  
 Lys Asn Gly Lys Asn Arg Arg Asn Arg Lys Lys Lys Asn Pro  
 420 425 430

<210> 24  
 <211> 1203  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Construcción sintética

<400> 24

```

atgggagagc tgccagcaag catgtctcag gctcagcatc ttgcagcaaa tacggctact      60
gataattatc gcattccagc gattacaacc gctccgaatg gtgatttact gattagctat      120
gatgaacggc cgaaggacaa tggaaatggt ggttccgatg cccctaaccg gaatcatatt      180
gttcagcgtc gctccacaga tggcggtaaa acttggagcg cgccaaccta tattcatcag      240
  
```

ES 2 721 172 T3

```

ggtacggaga ctggcaagaa agtgggatat tccgaccct cttatgtggt ggatcatcaa 300
accggtacaa tcttcaatth tcatgtgaaa tcatacgatc agggctgggg aggtagccgt 360
gggggaacag acccgaaaa cgcgggatt attcaggcag aggtgtctac gagcacggat 420
aatggatgga cgtggacaca tgcaccatc accgcgata ttacgaaaga taaaccgtgg 480
accgcgcgtt ttgcgcgtc cggccaaggc attcagatcc agcatgggcc gcatgcgggc 540
cgtctggtgc aacagtatac cattcgtacg gccggtggag cggtgacggc tgtatcggtt 600
tattccgatg atcatgggaa aacgtggcag gctggcacc cgaattggac gggatggat 660
gaaaacaaag ttgtagagct gtctgacggc tctctgatgc tgaacagtcg tgcgtcggac 720
gggagcggct ttcgtaaggt tgcgcatagc actgatggtg ggcagacctg gtccgaaccg 780
gtttcggaca aaaatttgc ggattcgggt gataatgcc agataattcg tgcgtttcct 840
aatgctgccc ccgatgacc gcgcgcgaaa gtacttcttc tgagtcattc cccaaatcca 900
cgtccgtggt cccgggatcg tggtagata agcatgtcat gtgatgacgg ggcctcatgg 960
accacttcca aagttttca cgaaccgttt gtgggtaca cgactattgc agttcagagt 1020
gatggaagca tcggtctgct gtcggaggac gcgcacaatg gcgctgatta tgggtggatc 1080
tggatcgta attttacgat gaactggctg ggagaacaat gtggacaaaa acccggaag 1140
cgcaaaaaaa aaggcggcaa aaacggtaa aatcgtcgta accgtaagaa aaaaaatcct 1200
tga 1203

```

5 <210> 25  
 <211> 400  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Construcción sintética

<400> 25

Met Gly Glu Leu Pro Ala Ser Met Ser Gln Ala Gln His Leu Ala Ala  
 1 5 10 15

ES 2 721 172 T3

Asn Thr Ala Thr Asp Asn Tyr Arg Ile Pro Ala Ile Thr Thr Ala Pro  
 20 25 30

Asn Gly Asp Leu Leu Ile Ser Tyr Asp Glu Arg Pro Lys Asp Asn Gly  
 35 40 45

Asn Gly Gly Ser Asp Ala Pro Asn Pro Asn His Ile Val Gln Arg Arg  
 50 55 60

Ser Thr Asp Gly Gly Lys Thr Trp Ser Ala Pro Thr Tyr Ile His Gln  
 65 70 75 80

Gly Thr Glu Thr Gly Lys Lys Val Gly Tyr Ser Asp Pro Ser Tyr Val  
 85 90 95

Val Asp His Gln Thr Gly Thr Ile Phe Asn Phe His Val Lys Ser Tyr  
 100 105 110

Asp Gln Gly Trp Gly Gly Ser Arg Gly Gly Thr Asp Pro Glu Asn Arg  
 115 120 125

Gly Ile Ile Gln Ala Glu Val Ser Thr Ser Thr Asp Asn Gly Trp Thr  
 130 135 140

Trp Thr His Arg Thr Ile Thr Ala Asp Ile Thr Lys Asp Lys Pro Trp  
 145 150 155 160

Thr Ala Arg Phe Ala Ala Ser Gly Gln Gly Ile Gln Ile Gln His Gly  
 165 170 175

Pro His Ala Gly Arg Leu Val Gln Gln Tyr Thr Ile Arg Thr Ala Gly  
 180 185 190

Gly Ala Val Gln Ala Val Ser Val Tyr Ser Asp Asp His Gly Lys Thr  
 195 200 205

ES 2 721 172 T3

Trp Gln Ala Gly Thr Pro Ile Gly Thr Gly Met Asp Glu Asn Lys Val  
 210 215 220

Val Glu Leu Ser Asp Gly Ser Leu Met Leu Asn Ser Arg Ala Ser Asp  
 225 230 235 240

Gly Ser Gly Phe Arg Lys Val Ala His Ser Thr Asp Gly Gly Gln Thr  
 245 250 255

Trp Ser Glu Pro Val Ser Asp Lys Asn Leu Pro Asp Ser Val Asp Asn  
 260 265 270

Ala Gln Ile Ile Arg Ala Phe Pro Asn Ala Ala Pro Asp Asp Pro Arg  
 275 280 285

Ala Lys Val Leu Leu Leu Ser His Ser Pro Asn Pro Arg Pro Trp Ser  
 290 295 300

Arg Asp Arg Gly Thr Ile Ser Met Ser Cys Asp Asp Gly Ala Ser Trp  
 305 310 315 320

Thr Thr Ser Lys Val Phe His Glu Pro Phe Val Gly Tyr Thr Thr Ile  
 325 330 335

Ala Val Gln Ser Asp Gly Ser Ile Gly Leu Leu Ser Glu Asp Ala His  
 340 345 350

Asn Gly Ala Asp Tyr Gly Gly Ile Trp Tyr Arg Asn Phe Thr Met Asn  
 355 360 365

Trp Leu Gly Glu Gln Cys Gly Gln Lys Pro Ala Lys Arg Lys Lys Lys  
 370 375 380

Gly Gly Lys Asn Gly Lys Asn Arg Arg Asn Arg Lys Lys Lys Asn Pro  
 385 390 395 400

<210> 26  
 <211> 1248  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

5

<220>  
 <223> Construcción sintética

10

<400> 26

# ES 2 721 172 T3

```

atgggagagc tgccagcaag catgtctcag gctcagcadc ttgcagcaaa tacggetact      60
gataattatc gcattccagc gattacaacc gctccgaatg gtgatttact gattagctat      120
gatgaacggc cgaaggacaa tggaaatggt ggttccgatg cccctaacc gaatcatatt      180
gttcagcgtc gctccacaga tggcggtaaa acttggagcg cgccaaccta tattcatcag      240
ggtacggaga ctggcaagaa agtgggatat tccgaccctt cttatgtggt ggatcatcaa      300
accggtacaa tcttcaatth tcatgtgaaa tcatacgatc agggctgggg aggtagccgt      360
gggggaacag acccggaaaa ccgcgggatt attcaggcag aggtgtctac gagcacggat      420
aatggatgga cgtggacaca tcgcaccatc accgcggata ttacgaaaga taaaccgtgg      480
accgcgcggt ttgcgcgctc cggccaaggc attcagatcc agcatgggcc gcatgcgggc      540
cgtctgggtc aacagtatac cattcgtacg gccggtggag cgggtgcaggc tgtatcggtt      600
tattccgatg atcatgggaa aacgtggcag gctggcacc cgaattgggac gggtatggat      660
gaaaacaaaag ttgtagagct gtctgacggc tctctgatgc tgaacagtcg tgcgtcggac      720
gggagcggct ttcgtaaggt tgcgcatagc actgatggtg ggcagacctg gtccgaaccg      780
gtttcggaca aaaatthgcc ggattcggtt gataatgccc agataattcg tgcgtttcct      840
aatgctgccc ccgatgacc cgcgcgcaaa gtacttcttc tgagtcattc cccaaatcca      900
cgtccgtggt cccgggatcg tggtagata agcatgtcat gtgatgacgg ggcctcatgg      960
accaattcca aagthtttca cgaaccgttt gtgggctaca cgactattgc agttcagagt     1020
gatggaagca tcggtctgct gtcggaggac gcgcacaatg gcgctgatta tggtagcatc     1080
tggtagcgtg atthttacgat gaactggctg ggagaacaat gtggacaaaa acccgcgcaa     1140
ccgagcccag cccctagccc tactgcagca ccgtccgctg caaagcgcaa aaaaaaggc      1200
ggcaaaaacg gtaaaaatcg tcgtaaccgt aagaaaaaaa atccttga      1248

```

- 5 <210> 27
- <211> 415
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
  
- 10 <220>
- <223> Construcción sintética
  
- <400> 27



ES 2 721 172 T3

Met Gly Glu Leu Pro Ala Ser Met Ser Gln Ala Gln His Leu Ala Ala  
 1 5 10 15

Asn Thr Ala Thr Asp Asn Tyr Arg Ile Pro Ala Ile Thr Thr Ala Pro  
 20 25 30

Asn Gly Asp Leu Leu Ile Ser Tyr Asp Glu Arg Pro Lys Asp Asn Gly  
 35 40 45

Asn Gly Gly Ser Asp Ala Pro Asn Pro Asn His Ile Val Gln Arg Arg  
 50 55 60

Ser Thr Asp Gly Gly Lys Thr Trp Ser Ala Pro Thr Tyr Ile His Gln  
 65 70 75 80

Gly Thr Glu Thr Gly Lys Lys Val Gly Tyr Ser Asp Pro Ser Tyr Val  
 85 90 95

Val Asp His Gln Thr Gly Thr Ile Phe Asn Phe His Val Lys Ser Tyr  
 100 105 110

Asp Gln Gly Trp Gly Gly Ser Arg Gly Gly Thr Asp Pro Glu Asn Arg  
 115 120 125

ES 2 721 172 T3

Gly Ile Ile Gln Ala Glu Val Ser Thr Ser Thr Asp Asn Gly Trp Thr  
 130 135 140

Trp Thr His Arg Thr Ile Thr Ala Asp Ile Thr Lys Asp Lys Pro Trp  
 145 150 155 160

Thr Ala Arg Phe Ala Ala Ser Gly Gln Gly Ile Gln Ile Gln His Gly  
 165 170 175

Pro His Ala Gly Arg Leu Val Gln Gln Tyr Thr Ile Arg Thr Ala Gly  
 180 185 190

Gly Ala Val Gln Ala Val Ser Val Tyr Ser Asp Asp His Gly Lys Thr  
 195 200 205

Trp Gln Ala Gly Thr Pro Ile Gly Thr Gly Met Asp Glu Asn Lys Val  
 210 215 220

Val Glu Leu Ser Asp Gly Ser Leu Met Leu Asn Ser Arg Ala Ser Asp  
 225 230 235 240

Gly Ser Gly Phe Arg Lys Val Ala His Ser Thr Asp Gly Gly Gln Thr  
 245 250 255

Trp Ser Glu Pro Val Ser Asp Lys Asn Leu Pro Asp Ser Val Asp Asn  
 260 265 270

Ala Gln Ile Ile Arg Ala Phe Pro Asn Ala Ala Pro Asp Asp Pro Arg  
 275 280 285

Ala Lys Val Leu Leu Leu Ser His Ser Pro Asn Pro Arg Pro Trp Ser  
 290 295 300

Arg Asp Arg Gly Thr Ile Ser Met Ser Cys Asp Asp Gly Ala Ser Trp  
 305 310 315 320

ES 2 721 172 T3

Thr Thr Ser Lys Val Phe His Glu Pro Phe Val Gly Tyr Thr Thr Ile  
 325 330 335

Ala Val Gln Ser Asp Gly Ser Ile Gly Leu Leu Ser Glu Asp Ala His  
 340 345 350

Asn Gly Ala Asp Tyr Gly Gly Ile Trp Tyr Arg Asn Phe Thr Met Asn  
 355 360 365

Trp Leu Gly Glu Gln Cys Gly Gln Lys Pro Ala Glu Pro Ser Pro Ala  
 370 375 380

Pro Ser Pro Thr Ala Ala Pro Ser Ala Ala Lys Arg Lys Lys Lys Gly  
 385 390 395 400

Gly Lys Asn Gly Lys Asn Arg Arg Asn Arg Lys Lys Lys Asn Pro  
 405 410 415

<210> 28  
 <211> 1221  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Construcción sintética

<400> 28

```

ccatggggca tcaccatcac catcatctag agggagatca tccacaagct acaccagcac      60
ctgcaccaga tgctagcact gagctgccag caagcatgtc tcaggctcag catcttgcag      120
caaatacggc tactgataat tatcgattc cagcgattac aaccgctccg aatggtgatt      180
tactgattag ctatgatgaa cggccgaagg acaatggaaa tggtggttcc gatgccctca      240
accggaatca tattgttcag cgtcgctcca cagatggcgg taaaacttgg agcgcgccaa      300
cctatattca tcagggtacg gagactggca agaaagtggg atattccgac ccctcttatg      360
  
```

ES 2 721 172 T3

```

tggTggatca tcaaaccggt acaatcttca attttcatgt gaaatcatac gatcagggct 420
ggggaggttag ccgtggggga acagaccggy aaaaccgcyg gattattcag gcagaggtgt 480
ctacgagcac ggataatgga tggacgtgga cacatcgcac catcaccgcy gatattacga 540
aagataaacc gtggaccgcy cgttttgcgy cgtccggcca aggcattcag atccagcatg 600
ggccgcatgc cggccgtctg gtgcaacagt ataccattcg tacggccggt ggagcgggtgc 660
aggctgtatc ggtttattcc gatgatcatg ggaaaacgtg gcaggctggc accccgattg 720
ggacgggtat ggatgaaaac aaagttgtag agctgtctga cggctctctg atgctgaaca 780
gtcgtgcgtc ggacgggagc ggctttcgta aggttgcgca tagcactgat ggtgggcaga 840
cctggctcga accggtttcc gacaaaaatt tgccggattc ggttgataat gccagataa 900
ttcgtgcgtt tccaatgct gccccgatg acccgcgcgc gaaagtactt cttctgagtc 960
attccccaaa tccacgtccg tggccccggg atcgtggtac gataagcatg tcatgtgatg 1020
acggggcctc atggaccact tccaaagttt ttcacgaacc gtttgtgggc tacacgacta 1080
ttgcagttca gagtgatgga agcatcggtc tgctgtcgga ggacgcgcac aatggcgcgtg 1140
attatggtgg catctggtat cgtaatttta cgatgaactg gctgggagaa caatgtggac 1200
aaaaaccgcy ggaataagct t 1221

```

5 <210> 29  
 <211> 404  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Construcción sintética

<400> 29

Met Gly His His His His His His Leu Glu Gly Asp His Pro Gln Ala  
 1 5 10 15

Thr Pro Ala Pro Ala Pro Asp Ala Ser Thr Glu Leu Pro Ala Ser Met  
 20 25 30

ES 2 721 172 T3

Ser Gln Ala Gln His Leu Ala Ala Asn Thr Ala Thr Asp Asn Tyr Arg  
35 40 45

Ile Pro Ala Ile Thr Thr Ala Pro Asn Gly Asp Leu Leu Ile Ser Tyr  
50 55 60

Asp Glu Arg Pro Lys Asp Asn Gly Asn Gly Gly Ser Asp Ala Pro Asn  
65 70 75 80

Pro Asn His Ile Val Gln Arg Arg Ser Thr Asp Gly Gly Lys Thr Trp  
85 90 95

Ser Ala Pro Thr Tyr Ile His Gln Gly Thr Glu Thr Gly Lys Lys Val  
100 105 110

Gly Tyr Ser Asp Pro Ser Tyr Val Val Asp His Gln Thr Gly Thr Ile  
115 120 125

Phe Asn Phe His Val Lys Ser Tyr Asp Gln Gly Trp Gly Gly Ser Arg  
130 135 140

Gly Gly Thr Asp Pro Glu Asn Arg Gly Ile Ile Gln Ala Glu Val Ser  
145 150 155 160

Thr Ser Thr Asp Asn Gly Trp Thr Trp Thr His Arg Thr Ile Thr Ala  
165 170 175

Asp Ile Thr Lys Asp Lys Pro Trp Thr Ala Arg Phe Ala Ala Ser Gly  
180 185 190

Gln Gly Ile Gln Ile Gln His Gly Pro His Ala Gly Arg Leu Val Gln  
195 200 205

Gln Tyr Thr Ile Arg Thr Ala Gly Gly Ala Val Gln Ala Val Ser Val  
210 215 220

ES 2 721 172 T3

Tyr Ser Asp Asp His Gly Lys Thr Trp Gln Ala Gly Thr Pro Ile Gly  
 225 230 235 240  
 Thr Gly Met Asp Glu Asn Lys Val Val Glu Leu Ser Asp Gly Ser Leu  
 245 250  
 Met Leu Asn Ser Arg Ala Ser Asp Gly Ser Gly Phe Arg Lys Val Ala  
 260 265 270  
 His Ser Thr Asp Gly Gly Gln Thr Trp Ser Glu Pro Val Ser Asp Lys  
 275 280 285  
 Asn Leu Pro Asp Ser Val Asp Asn Ala Gln Ile Ile Arg Ala Phe Pro  
 290 295 300  
 Asn Ala Ala Pro Asp Asp Pro Arg Ala Lys Val Leu Leu Leu Ser His  
 305 310 315 320  
 Ser Pro Asn Pro Arg Pro Trp Ser Arg Asp Arg Gly Thr Ile Ser Met  
 325 330 335  
 Ser Cys Asp Asp Gly Ala Ser Trp Thr Thr Ser Lys Val Phe His Glu  
 340 345 350  
 Pro Phe Val Gly Tyr Thr Thr Ile Ala Val Gln Ser Asp Gly Ser Ile  
 355 360 365  
 Gly Leu Leu Ser Glu Asp Ala His Asn Gly Ala Asp Tyr Gly Gly Ile  
 370 375 380  
 Trp Tyr Arg Asn Phe Thr Met Asn Trp Leu Gly Glu Gln Cys Gly Gln  
 385 390 395 400  
 Lys Pro Ala Glu

- 5 <210> 30
- <211> 1257
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- 10 <220>
- <223> Construcción sintética
- <400> 30

# ES 2 721 172 T3

```

ccatgaagcg caaaaaaaaaa ggcggcaaaa acggtaaaaa tcgtcgtaac cgtaagaaaa      60
aaaatcctgg agatcatcca caagctacac cagcacctgc accagatgct agcactgagc      120
tgccagcaag catgtctcag gctcagcatc ttgcagcaaa tacggctact gataattatc      180
gcattccagc gattacaacc gctccgaatg gtgatttact gattagctat gatgaacggc      240
cgaaggacaa tggaaatggg ggttccgatg cccctaacce gaatcatatt gttcagcgtc      300
gctccacaga tggcggtaaa acttgagcgc cgccaaccta tattcatcag ggtacggaga      360
ctggcaagaa agtgggatat tccgaccctt cttatgtggt ggatcatcaa accggtacaa      420
tcttcaattt tcatgtgaaa tcatacgatc agggctgggg aggtagccgt gggggaacag      480
accgggaaaa ccgcgggatt attcaggcag aggtgtctac gagcacggat aatggatgga      540
cgtggacaca tcgcaccatc accgcggata ttacgaaaga taaaccgtgg accgcgcgtt      600
ttgcccgtc  cggccaaggc attcagatcc agcatgggcc gcatgccggc cgtctggtgc      660
aacagtatac cattcgtacg gccggtggag cggtcgaggc tgtatcgggt tattccgatg      720
atcatgggaa aacgtggcag gctggcacc  cgattgggac gggtatggat gaaaacaaag      780
ttgtagagct gtctgacggc tctctgatgc tgaacagtcg tgcgtcggac gggagcggct      840
ttcgtaaggt tgcgcatagc actgatggtg ggcagacctg gtccgaaccg gtttcggaca      900
aaaatttgcc ggattcgggt gataatgccc agataattcg tgcgtttcct aatgctgccc      960
ccgatgacct gcgcgcgaaa gtacttcttc tgagtcattc cccaaatcca cgtccgtggt     1020
cccgggatcg tggtagata  agcatgtcat gtgatgacgg ggcctcatgg accacttcca     1080
aagtttttca cgaaccgttt gtgggtaca  cgactattgc agttcagagt gatggaagca     1140
tcggtctgct gtcggaggac gcgcacaatg gcgctgatta tggtggcac  tggtatcgta     1200
attttacgat gaactggctg ggagaacaat gtggacaaaa acccgcgaa  taagctt      1257

```

- 5 <210> 31
- <211> 416
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
  
- 10 <220>
- <223> Construcción sintética
  
- <400> 31

# ES 2 721 172 T3

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



# ES 2 721 172 T3

Pro Ser Tyr Val Val Asp His Gln Thr Gly Thr Ile Phe Asn Phe His  
 130 135 140

Val Lys Ser Tyr Asp Gln Gly Trp Gly Gly Ser Arg Gly Gly Thr Asp  
 145 150 155 160

Pro Glu Asn Arg Gly Ile Ile Gln Ala Glu Val Ser Thr Ser Thr Asp  
 165 170 175

Asn Gly Trp Thr Trp Thr His Arg Thr Ile Thr Ala Asp Ile Thr Lys  
 180 185 190

Asp Lys Pro Trp Thr Ala Arg Phe Ala Ala Ser Gly Gln Gly Ile Gln  
 195 200 205

Ile Gln His Gly Pro His Ala Gly Arg Leu Val Gln Gln Tyr Thr Ile  
 210 215 220

\  
 Arg Thr Ala Gly Gly Ala Val Gln Ala Val Ser Val Tyr Ser Asp Asp  
 225 230 235 240

His Gly Lys Thr Trp Gln Ala Gly Thr Pro Ile Gly Thr Gly Met Asp  
 245 250 255

Glu Asn Lys Val Val Glu Leu Ser Asp Gly Ser Leu Met Leu Asn Ser  
 260 265 270

Arg Ala Ser Asp Gly Ser Gly Phe Arg Lys Val Ala His Ser Thr Asp  
 275 280 285

Gly Gly Gln Thr Trp Ser Glu Pro Val Ser Asp Lys Asn Leu Pro Asp  
 290 295 300

Ser Val Asp Asn Ala Gln Ile Ile Arg Ala Phe Pro Asn Ala Ala Pro

ES 2 721 172 T3

305                                      310                                      315                                      320

Asp Asp Pro Arg Ala Lys Val Leu Leu Leu Ser His Ser Pro Asn Pro  
  325                                      330                                      335

Arg Pro Trp Ser Arg Asp Arg Gly Thr Ile Ser Met Ser Cys Asp Asp  
  340                                      345                                      350

Gly Ala Ser Trp Thr Thr Ser Lys Val Phe His Glu Pro Phe Val Gly  
  355                                      360                                      365

Tyr Thr Thr Ile Ala Val Gln Ser Asp Gly Ser Ile Gly Leu Leu Ser  
  370                                      375                                      380

Glu Asp Ala His Asn Gly Ala Asp Tyr Gly Gly Ile Trp Tyr Arg Asn  
385                                      390                                      395                                      400

Phe Thr Met Asn Trp Leu Gly Glu Gln Cys Gly Gln Lys Pro Ala Glu  
  405                                      410                                      415

- 5 <210> 32
- <211> 43
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- 10 <220>
- <223> Construcción sintética
- 15 <220>
- <221> misc\_feature
- <222> (17)..(18)
- <223> n es a, c, g o t
- 20 <220>
- <221> misc\_feature
- <222> (20)..(21)
- <223> n es a, c, g o t
- 25 <400> 32  
tttcgtctc ccatgvnnvn naagcgcaaa aaaaaagggc gca 43
- 30 <210> 33
- <211> 10
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- 35 <220>
- <223> Construcción sintética
- 40 <220>
- <221> misc\_feature
- <222> (2)..(3)
- <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
- <400> 33

Met Xaa Xaa Lys Arg Lys Lys Lys Gly Gly  
1 5 10

- 45 <210> 34
- <211> 1272

ES 2 721 172 T3

<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

5 <220>  
<223> Construcción sintética

<400> 34

```

ccatgaagcg caaaaaaaaaa ggcggcaaaa acggtaaaaa tcgtcgtaac cgtaagaaaa      60
aaaatcctgg tgggtggtgg tctggagatc atccacaagc tacaccagca cctgcaccag      120
atgctagcac tgagctgcca gcaagcatgt ctcaggctca gcatcttgca gcaaatacgg      180
ctactgataa ttatcgatt ccagcgatta caaccgctcc gaatggtgat ttactgatta      240
gctatgatga acggccgaag gacaatggaa atggtggttc cgatgccctc aaccggaatc      300
atattgttca gcgtcgtcc acagatggcg gtaaaacttg gagcgcgcca acctatattc      360
atcagggtac ggagactggc aagaaagtgg gatattccga ccctcttat gtggtggatc      420
atcaaaccgg tacaatcttc aattttcatg tgaatcata cgatcagggc tggggaggta      480
10 gccgtggggg aacagaccgg gaaaaccggg ggattattca ggcagagggt tctacgagca      540
cggataatgg atggactgg acacatcgca ccatcaccgc ggatattacg aaagataaac      600
cgtggaccgc gcgttttgcg gcgtccggcc aaggcattca gatccagcat gggccgcatg      660
ccggccgtct ggtgcaacag tataccattc gtacggccgg tggagcgggt caggctgtat      720
cggtttattc cgatgatcat gggaaaacgt ggcaggctgg caccctgatt gggacgggta      780
tggatgaaaa caaagtgtga gagctgtctg acggctctct gatgctgaac agtcgtgcgt      840
cggacgggag cggctttcgt aaggttgcgc atagcactga tgggtggcag acctggtccg      900
aaccggtttc ggacaaaaat ttgccggatt cggttgataa tgcccagata attcgtgcgt      960
ttcctaatgc tgccccgat gaccgcgcg cgaaagtact tcttctgagt cattccccaa     1020
atccacgtcc gtggtcccgg gatcgtggta cgataagcat gtcattgtgat gacggggcct     1080
catggaccac ttccaaagtt ttccacgaac cgtttgtggg ctacacgact attgcagttc     1140
agagtgatgg aagcatcggc ctgctgtcgg aggacgcgca caatggcgct gattatgggt     1200
gcatctggta tcgtaatttt acgatgaact ggcctgggaga acaatgtgga caaaaaccgg     1260
cggaataagc tt                                                                1272

```

15 <210> 35  
<211> 421  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

20 <220>  
<223> Construcción sintética

<400> 35

Met Lys Arg Lys Lys Lys Gly Gly Lys Asn Gly Lys Asn Arg Arg Asn  
1 5 10 15

Arg Lys Lys Lys Asn Pro Gly Gly Gly Gly Ser Gly Asp His Pro Gln

# ES 2 721 172 T3

	20		25		30
Ala Thr	Pro Ala Pro Ala Pro Asp Ala Ser Thr	Glu Leu Pro Ala Ser			
	35		40		45
Met Ser	Gln Ala Gln His Leu Ala Ala Asn Thr	Ala Thr Asp Asn Tyr			
	50		55		60
Arg Ile	Pro Ala Ile Thr Thr Ala Pro Asn Gly	Asp Leu Leu Ile Ser			
	65		70		75
Tyr Asp	Glu Arg Pro Lys Asp Asn Gly	Asn Gly Ser Asp Ala Pro			
		85		90	95
Asn Pro	Asn His Ile Val Gln Arg Arg Ser Thr	Asp Gly Gly Lys Thr			
		100		105	110
Trp Ser	Ala Pro Thr Tyr Ile His Gln Gly Thr	Glu Thr Gly Lys Lys			
	115		120		125
Val Gly	Tyr Ser Asp Pro Ser Tyr Val Val Asp	His Gln Thr Gly Thr			
	130		135		140
Ile Phe	Asn Phe His Val Lys Ser Tyr Asp	Gln Gly Trp Gly Gly Ser			
	145		150		155
Arg Gly	Gly Thr Asp Pro Glu Asn Arg Gly	Ile Ile Gln Ala Glu Val			
		165		170	175
Ser Thr	Ser Thr Asp Asn Gly Trp Thr Trp Thr	His Arg Thr Ile Thr			
		180		185	190
Ala Asp	Ile Thr Lys Asp Lys Pro Trp Thr	Ala Arg Phe Ala Ala Ser			
	195		200		205
Gly Gln	Gly Ile Gln Ile Gln His Gly Pro	His Ala Gly Arg Leu Val			

ES 2 721 172 T3

```

                210                215                220
Gln Gln Tyr Thr Ile Arg Thr Ala Gly Gly Ala Val Gln Ala Val Ser
225                230                235                240

Val Tyr Ser Asp Asp His Gly Lys Thr Trp Gln Ala Gly Thr Pro Ile
                245                250                255

Gly Thr Gly Met Asp Glu Asn Lys Val Val Glu Leu Ser Asp Gly Ser
                260                265                270

Leu Met Leu Asn Ser Arg Ala Ser Asp Gly Ser Gly Phe Arg Lys Val
                275                280                285

Ala His Ser Thr Asp Gly Gly Gln Thr Trp Ser Glu Pro Val Ser Asp
                290                295                300

Lys Asn Leu Pro Asp Ser Val Asp Asn Ala Gln Ile Ile Arg Ala Phe
305                310                315                320

Pro Asn Ala Ala Pro Asp Asp Pro Arg Ala Lys Val Leu Leu Leu Ser
                325                330                335

His Ser Pro Asn Pro Arg Pro Trp Ser Arg Asp Arg Gly Thr Ile Ser
                340                345                350

Met Ser Cys Asp Asp Gly Ala Ser Trp Thr Thr Ser Lys Val Phe His
                355                360                365

Glu Pro Phe Val Gly Tyr Thr Thr Ile Ala Val Gln Ser Asp Gly Ser
                370                375                380

Ile Gly Leu Leu Ser Glu Asp Ala His Asn Gly Ala Asp Tyr Gly Gly
385                390                395                400

Ile Trp Tyr Arg Asn Phe Thr Met Asn Trp Leu Gly Glu Gln Cys Gly
                405                410                415

Gln Lys Pro Ala Glu
                420

```

5 <210> 36  
 <211> 1275  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Construcción sintética

<400> 36

ES 2 721 172 T3

ccatgggtaa ggccaaaaaa aaaggcggca aaaacggtaa aaatcgtcgt aaccgtaaga 60  
 aaaaaaatcc tgggtggtggt ggttctggag atcatccaca agctacacca gcacctgcac 120  
 cagatgctag cactgagctg ccagcaagca tgtctcaggc tcagcatctt gcagcaaata 180  
 cggtactga taattatcgc attccagcga ttacaaccgc tccgaatggt gatttactga 240  
 ttagctatga tgaacggccg aaggacaatg gaaatggtgg ttccgatgcc cctaaccgga 300  
 atcatattgt tcagcgtcgc tccacagatg gcggtaaaac ttggagcgcg ccaacctata 360  
 ttcacaggg tacggagact ggcaagaaag tgggatattc cgaccctct tatgtggtgg 420  
 atcatcaaac cggtaacaatc ttcaattttc atgtgaaatc atacgatcag ggctggggag 480  
 gtagccgtgg gggaacagac ccggaaaacc gcgggattat tcaggcagag gtgtctacga 540  
 gcacggataa tggatggacg tggacacatc gcaccatcac cgcggatatt acgaaagata 600  
 aaccgtggac cgcgcgtttt gcggcgtccg gccaaaggcat tcagatccag catgggcccgc 660  
 atgccggccg tctggtgcaa cagtatacca ttcgtacggc cggaggagcg gtgcaggctg 720  
 tatcggttta ttccgatgat catgggaaaa cgtggcaggc tggcaccctg attgggacgg 780  
 gtatggatga aaacaaagt gttagactgt ctgacggctc tctgatgctg aacagtcgtg 840  
 cgtcggacgg gagcggcttt cgtaaaggtg cgcatagcac tgatgggtgg cagacctggt 900  
 ccgaaccggt ttcggacaaa aatttgccgg attcggttga taatgcccag ataattcgtg 960  
 cgtttctaa tgctgcccc gatgaccgcg gcgcgaaagt acttcttctg agtcattccc 1020  
 caaatccacg tccgtggtcc cgggatcgtg gtacgataag catgtcatgt gatgacgggg 1080  
 cctcatggac cacttccaaa gtttttcacg aaccgtttgt gggctacacg actattgcag 1140  
 ttcagagtga tgggaagcatc ggtctgctgt cggaggacgc gcacaatggc gctgattatg 1200  
 gtggcatctg gtatcgtaat tttacgatga actggctggg agaacaatgt ggacaaaaac 1260  
 ccgcggaata agctt 1275

5 <210> 37  
 <211> 422  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Construcción sintética  
 <400> 37

ES 2 721 172 T3

Met Val Lys Arg Lys Lys Lys Gly Gly Lys Asn Gly Lys Asn Arg Arg  
1 5 10 15

Asn Arg Lys Lys Lys Asn Pro Gly Gly Gly Gly Ser Gly Asp His Pro  
20 25 30

Gln Ala Thr Pro Ala Pro Ala Pro Asp Ala Ser Thr Glu Leu Pro Ala  
35 40 45

Ser Met Ser Gln Ala Gln His Leu Ala Ala Asn Thr Ala Thr Asp Asn  
50 55 60

Tyr Arg Ile Pro Ala Ile Thr Thr Ala Pro Asn Gly Asp Leu Leu Ile  
65 70 75 80

Ser Tyr Asp Glu Arg Pro Lys Asp Asn Gly Asn Gly Gly Ser Asp Ala  
85 90 95

Pro Asn Pro Asn His Ile Val Gln Arg Arg Ser Thr Asp Gly Gly Lys  
100 105 110

Thr Trp Ser Ala Pro Thr Tyr Ile His Gln Gly Thr Glu Thr Gly Lys  
115 120 125

Lys Val Gly Tyr Ser Asp Pro Ser Tyr Val Val Asp His Gln Thr Gly  
130 135 140

Thr Ile Phe Asn Phe His Val Lys Ser Tyr Asp Gln Gly Trp Gly Gly  
145 150 155 160

Ser Arg Gly Gly Thr Asp Pro Glu Asn Arg Gly Ile Ile Gln Ala Glu  
165 170 175

Val Ser Thr Ser Thr Asp Asn Gly Trp Thr Trp Thr His Arg Thr Ile  
180 185 190

Thr Ala Asp Ile Thr Lys Asp Lys Pro Trp Thr Ala Arg Phe Ala Ala  
195 200 205

Ser Gly Gln Gly Ile Gln Ile Gln His Gly Pro His Ala Gly Arg Leu  
210 215 220

Val Gln Gln Tyr Thr Ile Arg Thr Ala Gly Gly Ala Val Gln Ala Val  
225 230 235 240

Ser Val Tyr Ser Asp Asp His Gly Lys Thr Trp Gln Ala Gly Thr Pro  
245 250 255

Ile Gly Thr Gly Met Asp Glu Asn Lys Val Val Glu Leu Ser Asp Gly  
260 265 270

Ser Leu Met Leu Asn Ser Arg Ala Ser Asp Gly Ser Gly Phe Arg Lys  
275 280 285

ES 2 721 172 T3

Val Ala His Ser Thr Asp Gly Gly Gln Thr Trp Ser Glu Pro Val Ser  
 290 295 300

Asp Lys Asn Leu Pro Asp Ser Val Asp Asn Ala Gln Ile Ile Arg Ala  
 305 310 315 320

Phe Pro Asn Ala Ala Pro Asp Asp Pro Arg Ala Lys Val Leu Leu Leu  
 325 330 335

Ser His Ser Pro Asn Pro Arg Pro Trp Ser Arg Asp Arg Gly Thr Ile  
 340 345 350

Ser Met Ser Cys Asp Asp Gly Ala Ser Trp Thr Thr Ser Lys Val Phe  
 355 360 365

His Glu Pro Phe Val Gly Tyr Thr Thr Ile Ala Val Gln Ser Asp Gly  
 370 375 380

Ser Ile Gly Leu Leu Ser Glu Asp Ala His Asn Gly Ala Asp Tyr Gly  
 385 390 395 400

Gly Ile Trp Tyr Arg Asn Phe Thr Met Asn Trp Leu Gly Glu Gln Cys  
 405 410 415

Gly Gln Lys Pro Ala Glu  
 420

5 <210> 38  
 <211> 416  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Construcción sintética

<400> 38

Met Lys Arg Lys Lys Lys Gly Gly Lys Asn Gly Lys Asn Arg Arg Asn  
 1 5 10 15



# ES 2 721 172 T3

Arg Lys Lys Lys Asn Pro Gly Asp His Pro Gln Ala Thr Pro Ala Pro  
 20 25 30

Ala Pro Asp Ala Ser Thr Glu Leu Pro Ala Ser Met Ser Gln Ala Gln  
 35 40 45

His Leu Ala Ala Asn Thr Ala Thr Asp Asn Tyr Arg Ile Pro Ala Ile  
 50 55 60

Thr Thr Ala Pro Asn Gly Asp Leu Leu Ile Ser Tyr Asp Glu Arg Pro  
 65 70 75 80

Lys Asp Asn Gly Asn Gly Gly Ser Asp Ala Pro Asn Pro Asn His Ile  
 85 90 95

Val Gln Arg Arg Ser Thr Asp Gly Gly Lys Thr Trp Ser Ala Pro Thr  
 100 105 110

Tyr Ile His Gln Gly Thr Glu Thr Gly Lys Lys Val Gly Tyr Ser Asp  
 115 120 125

Pro Ser Tyr Val Val Asp His Gln Thr Gly Thr Ile Phe Asn Phe His  
 130 135 140

Val Lys Ser Tyr Asp Gln Gly Trp Gly Gly Ser Arg Gly Gly Thr Asp  
 145 150 155 160

Pro Glu Asn Arg Gly Ile Ile Gln Ala Glu Val Ser Thr Ser Thr Asp  
 165 170 175

Asn Gly Trp Thr Trp Thr His Arg Thr Ile Thr Ala Asp Ile Thr Lys  
 180 185 190

Asp Lys Pro Trp Thr Ala Arg Phe Ala Ala Ser Gly Gln Gly Ile Gln

# ES 2 721 172 T3

195	200	205
Ile Gln His Gly Pro His Ala Gly Arg Leu Val Gln Gln Tyr Thr Ile 210 215 220		
Arg Thr Ala Gly Gly Ala Val Gln Ala Val Ser Val Tyr Ser Asp Asp 225 230 235 240		
His Gly Lys Thr Trp Gln Ala Gly Thr Pro Ile Gly Thr Gly Met Asp 245 250 255		
Glu Asn Lys Val Val Glu Leu Ser Asp Gly Ser Leu Met Leu Asn Ser 260 265 270		
Arg Ala Ser Asp Gly Ser Gly Phe Arg Lys Val Ala His Ser Thr Asp 275 280 285		
Gly Gly Gln Thr Trp Ser Glu Pro Val Ser Asp Lys Asn Leu Pro Asp 290 295 300		
Ser Val Asp Asn Ala Gln Ile Ile Arg Ala Phe Pro Asn Ala Ala Pro 305 310 315 320		
Asp Asp Pro Arg Ala Lys Val Leu Leu Leu Ser His Ser Pro Asn Pro 325 330 335		
Arg Pro Trp Ser Arg Asp Arg Gly Thr Ile Ser Met Ser Cys Asp Asp 340 345 350		
Gly Ala Ser Trp Thr Thr Ser Lys Val Phe His Glu Pro Phe Val Gly 355 360 365		
Tyr Thr Thr Ile Ala Val Gln Ser Asp Gly Ser Ile Gly Leu Leu Ser 370 375 380		
Glu Asp Ala His Asn Gly Ala Asp Tyr Gly Gly Ile Trp Tyr Arg Asn 385 390 395 400		
Phe Thr Met Asn Trp Leu Gly Glu Gln Cys Gly Gln Lys Pro Ala Glu 405 410 415		

- 5 <210> 39
- <211> 421
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
  
- 10 <220>
- <223> Construcción sintética
  
- <400> 39

# ES 2 721 172 T3

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

# ES 2 721 172 T3

Val Gly Tyr Ser Asp Pro Ser Tyr Val Val Asp His Gln Thr Gly Thr  
 130 135 140

Ile Phe Asn Phe His Val Lys Ser Tyr Asp Gln Gly Trp Gly Gly Ser  
 145 150 155 160

Arg Gly Gly Thr Asp Pro Glu Asn Arg Gly Ile Ile Gln Ala Glu Val  
 165 170 175

Ser Thr Ser Thr Asp Asn Gly Trp Thr Trp Thr His Arg Thr Ile Thr  
 180 185 190

Ala Asp Ile Thr Lys Asp Lys Pro Trp Thr Ala Arg Phe Ala Ala Ser  
 195 200 205

Gly Gln Gly Ile Gln Ile Gln His Gly Pro His Ala Gly Arg Leu Val  
 210 215 220

Gln Gln Tyr Thr Ile Arg Thr Ala Gly Gly Ala Val Gln Ala Val Ser  
 225 230 235 240

Val Tyr Ser Asp Asp His Gly Lys Thr Trp Gln Ala Gly Thr Pro Ile  
 245 250 255

Gly Thr Gly Met Asp Glu Asn Lys Val Val Glu Leu Ser Asp Gly Ser  
 260 265 270

Leu Met Leu Asn Ser Arg Ala Ser Asp Gly Ser Gly Phe Arg Lys Val  
 275 280 285

Ala His Ser Thr Asp Gly Gly Gln Thr Trp Ser Glu Pro Val Ser Asp  
 290 295 300

Lys Asn Leu Pro Asp Ser Val Asp Asn Ala Gln Ile Ile Arg Ala Phe

ES 2 721 172 T3

305					310						315					320
Pro	Asn	Ala	Ala	Pro	Asp	Asp	Pro	Arg	Ala	Lys	Val	Leu	Leu	Leu	Ser	
				325					330						335	
His	Ser	Pro	Asn	Pro	Arg	Pro	Trp	Ser	Arg	Asp	Arg	Gly	Thr	Ile	Ser	
			340					345					350			
Met	Ser	Cys	Asp	Asp	Gly	Ala	Ser	Trp	Thr	Thr	Ser	Lys	Val	Phe	His	
		355					360					365				
Glu	Pro	Phe	Val	Gly	Tyr	Thr	Thr	Ile	Ala	Val	Gln	Ser	Asp	Gly	Ser	
	370						375					380				
Ile	Gly	Leu	Leu	Ser	Glu	Asp	Ala	His	Asn	Gly	Ala	Asp	Tyr	Gly	Gly	
385					390					395					400	
Ile	Trp	Tyr	Arg	Asn	Phe	Thr	Met	Asn	Trp	Leu	Gly	Glu	Gln	Cys	Gly	
				405					410						415	
Gln	Lys	Pro	Ala	Glu												
				420												

## REIVINDICACIONES

1. Un método para preparar una composición farmacéutica, que comprende:

5 (a) proporcionar una proteína de dominio catalítico de sialidasa que comprende un dominio catalítico de una sialidasa, en donde la proteína comprende una secuencia de dominio catalítico seleccionada entre:

- 10 (i) la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 14, en donde dicha secuencia carece de los aminoácidos 1 a 273 de la secuencia de cualquiera de los aminoácidos expuesta en SEQ ID NO. 12;
- (ii) una secuencia de aminoácidos que comienza en el aminoácido 274 de la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 12 y termina en el aminoácido 666 de la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 12, y carece de los aminoácidos 1 a 273 y 667 a 901 de la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO. 12;
- 15 (iii) una secuencia de aminoácidos que comienza en el aminoácido 274 de la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 12 y termina en el aminoácido 681 de la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 12, y carece de los aminoácidos 1 a 273 y 682 a 901 de la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO. 12;
- (iv) una secuencia de aminoácidos que comienza en el aminoácido 290 de la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 12 y termina en el aminoácido 666 de la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 12, y carece de los aminoácidos 1 a 289 y 667 a 901 de la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 12; y
- 20 (v) una secuencia de aminoácidos que comienza en el aminoácido 290 de la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 12 y termina en el aminoácido 681 de la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 12, y carece de los aminoácidos 1 a 289 y 682 a 901 de la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 12,
- 25

en donde la proteína de dominio catalítico de sialidasa tiene actividad sialidasa; y

(b) combinar la proteína de dominio catalítico de sialidasa con un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable creando de este modo una composición farmacéutica.

30

2. Un método para preparar una composición farmacéutica, que comprende:

35 (a) proporcionar una proteína de fusión que comprende al menos un dominio catalítico de una sialidasa y al menos un dominio de anclaje, en donde dicha proteína se selecciona entre:

- (i) una proteína en donde el dominio catalítico de la sialidasa comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 14, en donde dicha secuencia carece de los aminoácidos 1 a 273 de la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 12 y el dominio de anclaje es un dominio que se une a glicosaminoglicano (GAG) de anfirregulina humana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7;
- 40 (ii) una proteína en donde el dominio catalítico de la sialidasa comprende una secuencia de aminoácidos que comienza en el aminoácido 274 de la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 12 y termina en el aminoácido 666 de la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 12, y carece de los aminoácidos 1 a 273 y 667 a 901 de la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 12 y el dominio de anclaje es un dominio que se une a glicosaminoglicano (GAG) de anfirregulina humana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7;
- 45 (iii) una proteína en donde el dominio catalítico de la sialidasa comprende una secuencia de aminoácidos que comienza en el aminoácido 274 de la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 12 y termina en el resto de aminoácido 681 de la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 12, y carece de los aminoácidos 1 a 273 y 682 a 901 de la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 12 y el dominio de anclaje es un dominio que se une a glicosaminoglicano (GAG) de anfirregulina humana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7;
- 50 (iv) una proteína en donde el dominio catalítico de la sialidasa comprende una secuencia de aminoácidos que comienza en el aminoácido 290 de la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 12 y termina en el resto de aminoácido 666 de la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 12, y carece de los aminoácidos 1 a 289 y 667 a 901 de la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 12 y el dominio de anclaje es un dominio que se une a glicosaminoglicano (GAG) de anfirregulina humana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7; y
- 55 (v) una proteína en donde el dominio catalítico de la sialidasa comprende una secuencia de aminoácidos que comienza en el aminoácido 290 de la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 12 y termina en el resto de aminoácido 681 de la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 12 y carece de los aminoácidos 1 a 289 y 682 a 901 de la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 12 y el dominio de anclaje es un dominio que se une a glicosaminoglicano (GAG) de anfirregulina humana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7;
- 60
- 65

en donde la proteína de dominio catalítico de sialidasa tiene actividad sialidasa; y

(b) combinar la proteína de fusión con un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable creando de este modo una composición farmacéutica.

- 5 3. El método de la reivindicación 2 en donde la proteína (i) comprende además al menos un conector peptídico.
4. El método de la reivindicación 2 o reivindicación 3 en donde la secuencia de proteína (i) comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 37 o SEQ ID NO: 39.
- 10 5. El método de la reivindicación 2 en donde la secuencia de proteína (ii), (iii), (iv) o (v) comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 25 y SEQ ID NO: 27.
6. El método de la reivindicación 5 en donde la secuencia de la proteína de fusión consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21.
- 15 7. El método de cualquier reivindicación precedente que comprende además formular la composición farmacéutica como una pulverización, un inhalante, una solución para inyección, una solución para colirios, una crema, pomada, gel o ungüento, una píldora, comprimido, gragea, suspensión o solución para administración oral.

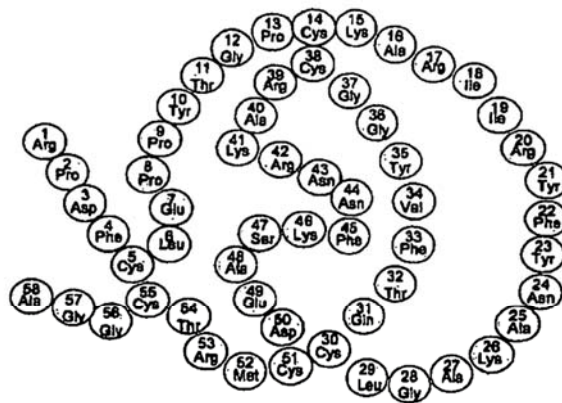


FIG. 1



PF4 (SEQ ID NO:2) :           <sup>47</sup>NGRRICLDLQAPLYKKIHKLLES<sup>70</sup>  
IL-8 (SEQ ID NO:3) :       <sup>46</sup>GRELCLDPKENWVQRVVEKFLKRAENS<sup>72</sup>  
ATIII (SEQ ID NO:4) : <sup>118</sup>QIHFFFAKLNCRLYRKANKSSKLVSANRFLGDKS<sup>151</sup>  
ApoE (SEQ ID NO:5) : <sup>132</sup>ELRVRLASHLRKLRKRLLRDADDLQKRLAVYQAG<sup>165</sup>  
AAMP (SEQ ID NO:6) :                   <sup>17</sup>RRLRRMESESES<sup>25</sup>  
Anfirregulina (SEQ ID NO:7) :   <sup>125</sup>KRKKKGGKNGKNRRNRKKKNP<sup>145</sup>

**FIG. 2**

NEU2 (SEQ ID NO:8): 1 MASLPVLQKE SVFQSGAHA- -YRIPALLYL PGQOSLLAFA EQRASKKDEH  
 YR+P+LL + P +LLAF EQR S D H

NEU4 (SEQ ID NO:9): 1 MGVPRTPSRT VLFERERTGL TYRVPSLLPV PPGPTLLAFV EQRLSPDDSH

NEU2: 49 AELIVLRRGD YDAPTHQVQW QAQEVVAQAR LDGHRSMNPC PLYDAQGTGL FLFFIAIPGQ  
 A +VLRRG +W A ++ A HRSMNPC P++DA TGT+ FLFFIA+ G

NEU4: 51 AHRLVLRRTG LAGGSV--RW GALHVLGTAA LAEHRSMNPC PVHDAGTGTV FLFFIAVLGH

NEU2: 110 VTEQQQLQTR ANVTRLCQVT STDHGRTWSS PROLTDAAG PAYREWSTFA VGPBGHCLQLN  
 E Q+ T N RLC V S D G +W S RDLT+ AIG A ++W+TFA VGPBGH +QL

NEU4: 109 TPEAVQIATG RNAARLCCVA SRDAGLSWGS ARDLTEEAIG GAVQDWATFA VGPBGHVQLP

NEU2: 170 DRARSLVPPA YAYRKLHP-- ---IQRPIPS AFCFLSHDHG RTWARGHFVA QD-TLECQVA  
 R L+VPA Y YR I R P +F F S DHG RTW G V + ECQ+A

NEU4: 169 S-GR-LLVPA YTYRVDRLEC FGKICRTSPH SFAFYSDDHG RTWRCGGLVP NLRSGECQLA

NEU2: 224 EVETGEQRVV TL-NARSHLR ARVQAQSTND GLDFQESQLV KKLVEPPPQG CQGSVISFPS  
 V+ G+ NARS L +RVQA ST++ G F ++ V L E G CQGS++ FP

NEU4: 227 AVDGGQAGSF LYCNARSPLG SRVQALSTDE GTSFLPAERV ASLPETAW-G CQGSIVGFPA

NEU2: 283 P-----

NEU4: 286 PAPNRPRDDS WSVGPRSPLO PPLLGPVHE PPEEAAVDPR GGQVPGGPFS RLQPRGDGP

NEU2: 284 ----- ---RSGPGSP QWLLYTHPTH SWQRADLGAY LNPRPPAPEA  
 WLLY+HP R +G L+ P P +

NEU4: 346 RQPGPRPGVSG DVGSWTLALP MPFAAPPQSP TWLLYSHFVG RRARLHM GIR LSQSPLDPRS

NEU2: 321 WSEPVLAKG SCAYSDIQSM GTGPDGSP LF GCLYEANDY- --EEIVFLMF TLKQAFPAEY  
 W+EP ++ + YSDL S+ G P+G +F +CLYE +L++

NEU4: 406 WTEPWVIYEG PSGYSDLASI GPAPEGGLVF ACLYESGART SYDEISFCTF SLREVLNVP

NEO2: 378 LPQ

NEU4: 466 ASPKPPNLGD KPRGCCWPS

FIG. 3

Especificidad de sustrato de sialidasas de bacterias y hongos

Sustratos	Actividad sialidasa*						
	Vibrio Cholerae perfringens (71Kd)	Clostridium perfringens (43Kd)	Aerobacter ureofaciens	Salmonella typhimurium	Actinomyces viscosus		
<b>Oligo y polisacáridos</b>							
11 <sup>7</sup> Neu5AcLac	100	100	100	100	100	100	100
11 <sup>6</sup> Neu5AcLac	53	44	157	0.4	462		
Ácido colominico (α2-8)	30	33	63	0.1	300		
Glicoproteínas							
Fetuna (α2-3>α2-6)	340	272	59	17	—		
Glicoproteína de ácido α1 (α2-6>α2-3)	1000	555	—	—	761		
Glandula submandibular	400	139	—	—	123		
mucina (α2-6)	—	—	—	—	—		
Glandula submaxilar	—	—	56	—	—		
mucina (α2-6)	—	—	—	—	—		
Gangliosidos							
Mezclas de gangliosidos (360)	(350)	1.6	78	34	285		
Simtético							
4MU-Neu5Ac	1580	605	—	1050	—		

\* Cada valor representa una actividad sialidasa relativa cuando la actividad dirigida a 11<sup>7</sup>Neu5AcLac se toma como 100.

FIG. 4

**ccatggggcatcaccatcaccatcatctagaggagatcatccacaagctacaccagcacct**  
 M G H H H H H H L E G D H P Q A T P A P  
 gcaccagatgctagcactgagctgccagcaagcatgtctcaggctcagcatcttgagca  
 A P D A S T E L P A S M S Q A Q H L A A  
 aatacggctactgataattatcgattccagcgattacaaccgctccgaatgggtgatta  
 N T A T D N Y R I P A I T T A P N G D L  
 ctgattagctatgatgaacggccgaaggacaatggaaatgggtggtccgatgccctaac  
 L I S Y D E R P K D N G N G G S D A P N  
 ccgaatcatattgttcagcgtcgtccacagatggcggtaaaacttggagcgcgccaacc  
 P N H I V Q R R S T D G G K T W S A P T  
 tatattcatcagggtacggagactggcaagaagtgggatattccgacccctctatgtg  
 Y I H Q G T E T G K K V G Y S D P S Y V  
 gtggatcatcaaaccggtacaatcttcaattttcatgtgaaatcatacagatcagggtg  
 V D H Q T G T I F N F H V K S Y D Q G W  
 ggaggtagccgtgggggaacagaccggaaaaccgcggtattattcaggcagaggtgct  
 G G S R G G T D P E N R G I I Q A E V S  
 acgagcacggataatggatggacgtggacacatcgaccatcaccgcgatattacgaaa  
 T S T D N G W T W T H R T I T A D I T K  
 gataaacctggaccgcgcttttgcggcgtccggccaaggcattcagatccagcatggg  
 D K P W T A R F A A S G Q G I Q I Q H G  
 ccgatgccggccgtctggtgcaacagtataccattcgtacggccggtggagcgggtgac  
 P H A G R L V Q Q Y T I R T A G G A V Q  
 gctgtatcggtttattccgatgatcatgggaaaacgtggcaggctggcaccgattggg  
 A V S V Y S D D H G K T W Q A G T P I G  
 acgggtatggatgaaaacaagttgttagagctgtctgacggctctctgatgctgaacagt  
 T G M D E N K V V E L S D G S L M L N S  
 cgtgcgtcggacgggagcggctttcgtaaggttgcgcatagcactgatgggtggcagacc  
 R A S D G S G F R K V A H S T D G G Q T  
 tggtcggaaccgggttcggacaaaaatttgcggattcggttgataatgccagataatt  
 W S E P V S D K N L P D S V D N A Q I I  
 cgtgcgtttcctaattgctgccccgatgacccgcgcgaaagtacttctctgagtc  
 R A F P N A A P D D P R A K V L L L S H  
 tccccaaatccacgtcgtgggtcccggtatcgtggtacgataagcatgtcatgtgatgac  
 S P N P R P W S R D R G T I S M S C D D  
 ggggcctcatggaccacttccaaagttttcacgaaccggttggggctacacgactatt  
 G A S W T T S K V F H E P F V G Y T T I  
 gcagttcagagtgatggaagcatcggctctgctgctcggaggacgcgcacaatggcgtgat  
 A V Q S D G S I G L L S E D A H N G A D  
 tatgggtgcatctggtatcgtaattttacgatgaactggctgggagaacaatgtggacia  
 Y G G I W Y R N F T M N W L G E Q C G Q  
**aaaccgccaataagctt**  
 K P A E

FIG. 5

**cca**tggttaagcgcaaaaaaaaaaggcggcaaaaacggtaaaaatcgtcgtaaccgtaagaaa  
 M V K R K K K G G K N G K N R R N R K K  
 aaaaatcctggagatcatccacaagctacaccagcacctgcaccagatgctagcactgag  
 K N P G D H P Q A T P A P A P D A S T E  
 ctgccagcaagcatgtctcaggctcagcatcttgacgcaaatacggctactgataattat  
 L P A S M S Q A Q H L A A N T A T D N Y  
 cgcattccagcgattacaaccgctccgaatgggtgatttactgattagctatgatgaacgg  
 R I P A I T T A P N G D L L I S Y D E R  
 ccgaaggacaatggaaatgggtggtcccgatgccctaaccgcaatcatattgttcagcgt  
 P K D N G N G G S D A P N P N H. I V Q R  
 cgctccacagatggcggtaaaaacttggagcgcgccaacctatattcatcagggtacggag  
 R S T D G G K T W S A P T Y I H Q G T E  
 actggcaagaaagtgggatattccgacccctcttatgtgggtggatcatcaaaccggtaca  
 T G K K V G Y S D P S Y V V D H Q T G T  
 atcttcaattttcatgtgaaatcatacagatcagggctggggaggtagccgtgggggaaca  
 I F N F H V K S Y D Q G W G G S R G G T  
 gaccggaaaaaccgcggtattattcaggcagagggtctctacgagcacggataatggatgg  
 D P E N R G I I Q A E V S T S T D N G W  
 acgtggacacatcgaccatcaccgcggtattacgaaagataaaccggtggaccgcgcggt  
 T T H R T I T A D I T K D K P W T A R  
 ttgwgcgctccggccaaggcattcagatccagcatgggcccgcgcatgcccggctctgggtg  
 F A A S G Q G I Q I Q H G P H A G R L V  
 caacagtataccattcgtacggccgggtggagcgggtgcaggctgtatcggtttattccgat  
 Q Q Y T I R T A G G A V Q A V S V Y S D  
 gatcatgggaaaaacgtggcaggctggcaccgccgattgggacgggtatggatgaaaaaaa  
 D H G K T W Q A G T P I G T G M D E N K  
 gttgtagagctgtctgacggctctctgatgctgaacagtcgctgcgctcggacgggagcggc  
 V V E L S D G S L M L N S R A S D G S G  
 tttcgtaaagttgcgcatagcactgatgggtgggcagacctggteccgaaccggtttcggac  
 F R K V A H S T D G G Q T W S E P V S D  
 aaaaatttggcggattcgggtgataatgccagataattcgtgcgcttctctaagtctgcc  
 K N L P D S V D N A Q I I R A F P N A A  
 cccgatgaccgcgcgcaaaagtacttctctgagtcattccccaaatccacgtccggtg  
 P D D P R A K V L L L S H S P N P R P W  
 tccccggatcgtggtacgataagcatgtcatgtgatgacggggcctcatggaccacttcc  
 S R D R G T I S M S C D D G A S W T T S  
 aaagttttcacgaaccggttggggctacacgactattgcagttcagagtgatggaagc  
 K V F H E P F V G Y T T I A V Q S D G S  
 atcggctctgctcggaggacgcgcacaatggcgtgattatgggtggcatctgggtatcgt  
 I G L L S E D A H N G A D Y G G I W Y R  
 aattttacgatgaactggctgggagaaatgtggcaaaaaccgcggaataagott  
 N F T M N W L G E Q C G Q K P A E - A

FIG. 6

**ccatgggtaagcgcaaaaaaaaggcggcaaaaacggtaaaaatcgtcgtaaccgtaagaaa**  
 M V K R K K K G G K N G K N R R N R K K  
 aaaaatcctgggtgggtgggttctggagatcatccacaagctacaccagcacctgcacca  
 K N P G G G G S G D H P Q A T P A P A P  
 gatgctagcactgagctgccagcaagcatgtctcaggctcagcatcttgcaagcaaatcag  
 D A S T E L P A S M S Q A Q H L A A N T  
 gctactgataattatcgcatccagcgattacaaccgctccgaatgggtgatttactgatt  
 A T D N Y R I P A I T T A P N G D L L I  
 agctatgatgaacggccgaaggacaatggaaatgggtgggtccgatgccctaaccggaat  
 S Y D E R P K D N G N G G S D A P N P N  
 catattgttcagcgtcgctccacagatggcggtaaaaactggagcgcgccaacctatatt  
 H I V Q R R S T D G G K T W S A P T Y I  
 catcagggtacgggactggcaagaagtgggatattccgacccctcttatgtgggtgat  
 H Q G T E T G K K V G Y S D P S Y V V D  
 catcaaacgggtacaatcctcaatcttcattgtgaaatcatacagatcagggctggggaggt  
 H Q T G T I F N F H V K S Y D Q G W G G  
 agccgtgggggaacagaccggaaaacggcgggattattcaggcagaggtgtctacgagc  
 S R G G T D P E N R G I I Q A E V S T S  
 acggataatggatggacgtggacacatcgccacatcaccgcggtatattacgaaagataaa  
 T D N G W T W T H R T I T A D I T K D K  
 ccgtggaccgcggttttggcggctccggccaaggcattcagatccagcatgggcccgat  
 P W T A R F A A S G Q G I Q I Q H G P H  
 gccggccgtctggtgcaacagtataaccattcgtacggccggtggagcgggtgcaggctgta  
 A G R L V Q Q Y T I R T A G G A V Q A V  
 tcggtttattccgatgatcatgggaaaacgtggcaggctggcaccggattgggacgggt  
 S V Y S D D H G K T W Q A G T P I G T G  
 atggatgaaaacaaagtgttagagctgtctgacggctctctgatgctgaacagtcgtgcg  
 M D E N K V V E L S D G S L M L N S R A  
 tcggacggggagcggctttcgttaaggttgcgcatagcactgatgggtgggcagacctggtcc  
 S D G S G F R K V A H S T D G G Q T W S  
 gaaccgggttcggacaaaaatttgcggattcgggttgataatgccagataattcgtgcg  
 E P V S D K N L P D S V D N A Q I I R A  
 tttcctaagtgtgccccgatgacccgcgcgaaagtacttctctgagtcattcccca  
 F P N A A P D D P R A K V L L L S H S P  
 aatccacgtccgtggtcccggtatcggtgtacgataagcatgtcatgtgatgacggggcc  
 N P R P W S R D R G T I S M S C D D G A  
 tcatggaccacttccaaagttttcacgaaccggttgggtgctacacgactattgcagtt  
 S W T T S K V F H E P F V G Y T T I A V  
 cagagtgatggaagcatcggctctgctgtcggaggacgcgcacaatggcggctgattatgggt  
 Q S D G S I G L L S E D A H N G A D Y G  
 ggcattcggatcgttaattttacgatgaactggctgggagaacaatgtggacaaaaacc  
 G I W Y R N F T M N W L G E Q C G Q K P  
**gcggaataagctt**  
 A E - A

FIG. 7

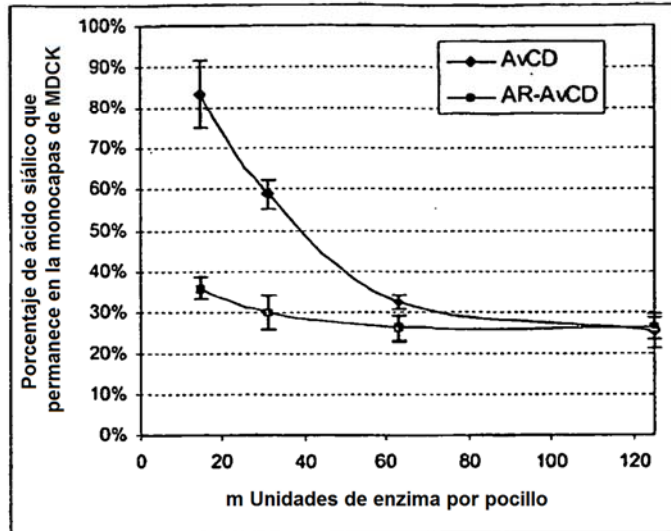


FIG. 8

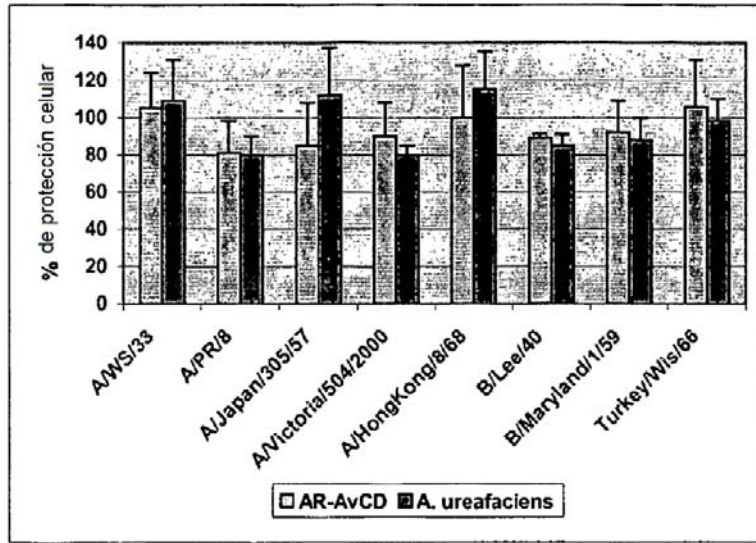


FIG. 9



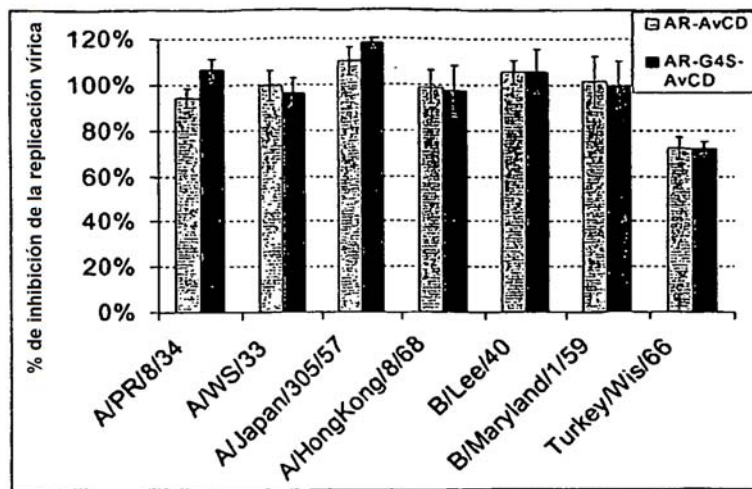


FIG. 10

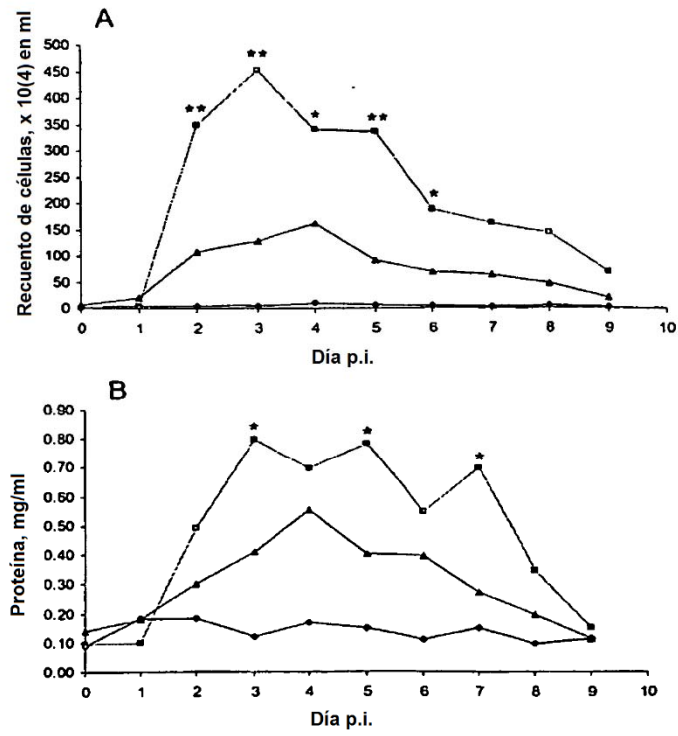


FIG. 11

Virus	AR-AvCD				AR-G <sub>4</sub> S-AvCD			
	Inhibición replicación vírica CE50	Índice selectivo	Protección celular CE50	Índice selectivo	Inhibición replicación vírica CE50	Índice selectivo	Protección celular CE50	Índice selectivo
A/PR/8/34 (H1N1)	12.3 ± 7.4	>8163	50.3 ± 13.1	>1990	13.5 ± 1.4	>7407	43.8 ± 22.3	>2286
AWS/33 (H1N1)	6.5 ± 3.9	>15444	17.7 ± 13.9	>5666	12.2 ± 11.0	>8197	19.1 ± 17.6	>5249
A/NWS/33 (H1N1)	2.5	>20000	10.8 ± 12.4	>9302	2.5	>40000	15.9 ± 19.3	>6249
A/Japan/305/57 (H2N2)	5.1 ± 3.4	>19512	11.3 ± 0.4	>8889	3.8 ± 1.8	>26667	14.9 ± 0.2	>6273
A/Victoria/504/2000 (H3N2)	2.5 ± 0.0	>40000	18.3 ± 1.0	>5457	2.6 ± 0.2	>38095	55.3 ± 0.4	>1810
A/HongKong/8/68 (H3N2)	2.5 ± 0.0	>40000	31.5 ± 38.2	>3175	2.5 ± 0.0	>40000	30.6 ± 30.2	>3265
B/Lee/40	4.1 ± 1.3	>24540	11.4 ± 3.7	>8791	3.5 ± 1.3	>28986	8.4 ± 2.7	>11940
B/Maryland/1/59	4.3 ± 2.5	>23392	2.5 ± 0.0	>40000	5.5 ± 4.2	>18265	5.6 ± 3.0	>17778
Turkey/Wis/66 (H9N2)	3.9 ± 0.5	>25478	16.6 ± 16.2	>6033	7.1 ± 0.9	>14035	20.4 ± 18.6	>4914
Equine/Prague/2/62 (H7N7)	n/a	n/a	15.8 ± 5.3	>6349	n/a	n/a	25.5 ± 5.7	>3922

FIG. 12

Nº	Hurón nº de marcador	Título de virus $\log_{10}$ TCID <sub>50</sub> /ml el día p.i. <sup>a</sup>					Títulos HI después estimulación
		1	2	3	4	5	
<b>Grupo tratado con vehículo</b>							
1	228	5.7	4.2	4.2	1.7	-	640
2	784	3.9	4.9	1.9	1.9	-	640
3	793	4.4	4.2	2.4	3.9	-	640
4	794	4.9	5.9	1.4	-	-	160
5	789	4.4	4.2	3.4	3.4	-	640
6	799	3.7	4.4	3.4	-	-	320
7	811	4.4	4.4	-	-	-	1280
8	841	4.2	4.7	2.7	1.9	-	320
	<i>media<sup>b</sup></i>	4.4	4.7	2.7	3.7	-	
	<i>SD</i>	0.4	0.7	1.0	0.4	-	
	<i>Diseminación/total</i>	8/8	8/8	7/8	5/8	0/8	
<b>Grupo tratado con fludasa</b>							
1	780	-	-	-	NA	NA	NA
2	791	2.2	5.2	4.9	4.2	1.7	640
3	804	-	4.7	3.7	1.7	-	1280
4	803	-	-	-	-	-	≤10
5	805	-	-	-	-	-	≤10
6	806	-	-	-	-	-	≤10
7	810	2.2	4.7	3.2	2.9	-	160
8	812	-	-	4.4	-	-	640
9	813	-	3.2	4.4	4.7	-	160
10	819	2.7	5.2	-	-	-	320
11	828	-	4.9	1.9	1.7	-	320
12	843	-	4.4	4.9	4.9	3.4	320
	<i>media<sup>b</sup></i>	2.4	4.6	3.9	3.4	2.6	
	<i>SD</i>	0.3	0.7	1.1	1.5	1.2	
	<i>Diseminación/total</i>	3/12	7/12	7/12	6/11	2/11	

<sup>a</sup> - todos los lavados nasales recogidos después del día 5 posterior a la estimulación eran negativos para la presencia de virus.

<sup>b</sup> - el valor medio se calculó para los hurones que diseminaban virus.

Los lavados nasales recuperados de los hurones tratados sin infectar eran negativos para el virus (no se muestra).

NA - no aplicable, el hurón murió el día 4 después de la infección debido a un accidente.

**FIG. 13**