

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 805 795**

51 Int. Cl.:

A61K 39/21 (2006.01)

A61P 31/04 (2006.01)

A01N 25/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.09.2013 PCT/US2013/061966**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.04.2014 WO14052621**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.09.2013 E 13840384 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.04.2020 EP 2900259**

54 Título: **Régimen de glicosidasa para el tratamiento de enfermedades infecciosas**

30 Prioridad:

28.09.2012 US 201261707252 P

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

15.02.2021

73 Titular/es:

**KLINE, ELLIS (100.0%)
300 Westinghouse Road
Pendleton, South Carolina 29670-8839, US**

72 Inventor/es:

KLINE, ELLIS

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 805 795 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

Régimen de glicosidasa para el tratamiento de enfermedades infecciosas

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a composiciones para uso en el tratamiento de infecciones virales crónicas con una terapia con glicosidasa.

Antecedentes

10 Los pacientes con infecciones crónicas (tales como infecciones virales crónicas tales como VIH, el VHS, virus de la hepatitis, el VPH, etc.) si se tratan de forma efectiva para revertir la trayectoria de la enfermedad o el estado de la enfermedad, aún requieren una gestión de la enfermedad a largo plazo. Sin embargo, la administración continua de terapias quimioterapéuticas, monoclonales o de citocinas puede provocar resistencia a los patógenos, efectos tóxicos para el paciente que incluyen la supresión inmune, pérdida de efectividad con el tiempo y puede ser costoso para muchos pacientes. Por ejemplo, la terapia antirretroviral (ARV), aunque logró retrasar la progresión del SIDA, ha transformado la enfermedad en una enfermedad crónica que requiere tratamiento a largo plazo y una aceptación básica de los efectos secundarios muy significativos y el enorme coste de los fármacos. Atun and Bateringaya, Building a during response to HIV/AIDS: implications for health systems, J. Acquir Immune Defic. Syndr. 57 Suppl. 2:S91-5 (2011). Una gestión más eficaz a largo plazo de la enfermedad de dicha enfermedad infecciosa requiere un agente activo que mantenga la eficacia a lo largo del tiempo, y que sea sustancialmente no tóxico o no supresor inmune para el paciente, e idealmente sea rentable.

20 Además, el tratamiento o la prevención de ciertas enfermedades infecciosas o epidémicas, como la influenza, el SARS y el resfriado común, requieren estímulos a largo plazo para el sistema inmune para prevenir infecciones o enfermedades graves. Esto es especialmente cierto para los inmunodeprimidos,, ya que las terapias disponibles de moléculas pequeñas pueden exacerbar la deficiencia inmunológica y las vacunas pueden ser solo marginalmente efectivas. Tal necesidad es particularmente alta cuando la vacuna es escasa o no está disponible.

25 El documento WO 92/18158 A1 describe composiciones que comprenden neuraminidasa para el tratamiento de trastornos relacionados con el herpes.

Existe la necesidad de una prevención y tratamiento efectivos y/o gestión de enfermedades infecciosas, incluyendo la gestión de infecciones crónicas, y control de enfermedades infecciosas altamente contagiosas.

Compendio de la invención

La invención se define mediante las reivindicaciones adjuntas.

30 En diversos aspectos, la invención proporciona composiciones para uso en el tratamiento de infecciones virales crónicas. Las composiciones y los regímenes de tratamiento descritos en la presente memoria pueden utilizarse con otras terapias antivirales o antimicrobianas, así como en combinación con la vacunación (por ejemplo, vacunación que no contenga adyuvantes) para aumentar la efectividad de la vacuna. y/o extender la duración del efecto protector. El tratamiento comprende la administración in vivo de un régimen de enzima glicosidasa (por ejemplo, un régimen de una o más enzimas glicosidasa) al paciente. En diversas realizaciones, el régimen de glicosidasa no está dirigido por el sistema inmune del paciente. En diversas realizaciones, el régimen de glicosidasa proporciona una o más enzimas de glicosidasa activas para la eliminación de uno o más grupos glucosilo terminales de células de mamífero (por ejemplo, células inmunes), células infectadas u otros objetivos glicosilados que conducen a la activación inmune. La terapia con glicosidasa provoca cascadas de señalización inmune a través de su acción sobre las células inmunes. Los grupos glucosilo terminales dirigidos pueden comprender, por ejemplo, residuos sialosilo, beta-galactosilo, N-acetilgalactosamino, fucosilo, glucosilo, N-acetilglucosamino y manosilo, entre otros. Por lo tanto, el régimen de glicosidasa incluye neuraminidasa y puede incluir, en diversas realizaciones, una o más de galactosidasa, N-acetilgalactosidasa, fucosidasa, glicosidasa, N-acetilglucosaminidasa y manosidasa, entre otras. Sin desear limitarse a la teoría, el régimen aumenta la señalización inmune al eliminar cantidades efectivas de estructuras de glicosilo (por ejemplo, ácido siálico) de la superficie de las células inmunes, células infectadas, y/u otros objetivos glicosilados. De esta manera, el régimen de glicosidasa orquesta o programa una respuesta inmune efectiva, permitiendo el direccionamiento antigénico de las células infectadas, así como provocando niveles adecuados de cascadas de citoquina/quimiocina para terapia. En estas u otras realizaciones, las enzimas glicosidasa incluyen al menos una enzima específica para un residuo glucosilo terminal prominente (por ejemplo, neuraminidasa y/o galactosidasa) y al menos una enzima específica para un penúltimo residuo de glucosilo prominente (por ejemplo, beta-galactosidasa, fucosidasa o manosidasa) en la superficie de las células inmunes. En algunas realizaciones, tales enzimas actúan sinérgicamente con la neuraminidasa. El régimen no desregula (sino que coordina) el sistema inmune del paciente, que es crucial en la lucha contra las enfermedades infecciosas, y es efectivo incluso en presencia de ciertos niveles de quimioterapias citotóxicas, que pueden tener efectos nocivos en las células inmunes. Además, el régimen es

aplicable para terapia crónica, o terapia repetida, ya que el(los) agente(s) no está(n) dirigido(s) por el sistema inmune en diversas realizaciones. El régimen en diversas realizaciones evita la eliminación excesiva de ácidos siálicos u otras estructuras de glicosilo de las células normales para que conserven la función normal.

5 En ciertas realizaciones, el régimen de glicosidasa descrito en la presente memoria reduce o elimina la necesidad de administrar otras terapias antivirales o antimicrobianas tradicionales. En diversas realizaciones, la invención encuentra uso en pacientes inmunodeprimidos o inmunosuprimidos para aumentar la función inmune. El régimen de glicosidasa en diversas realizaciones no está dirigido al sistema inmune y, por lo tanto, la señalización de glicosidasa resultante puede usarse para terapia a largo plazo.

10 describen métodos para tratar pacientes que tienen una infección viral crónica a través de un régimen no agudo de una composición que comprende una formulación de glicosidasa que es tolerada por el sistema inmune ("tolerante inmune") y suficiente para estimular la señalización inmune coordinada. La composición de glicosidasa proporciona así la estimulación inmune, tal como a través de una o más cascadas integrales de modulación inmune, al tiempo que evita el direccionamiento inmune de la(s) glicosidasa(s), que de otro modo eliminaría su efectividad con el tiempo.

15 La composición y el régimen de glicosidasa es un tratamiento rentable para revertir el estado o trayectoria de la enfermedad viral, y/o a la transición a la gestión de la enfermedad a largo plazo. El paciente puede ser un paciente con SIDA sintomático, y la composición de glicosidasa puede proporcionarse con, o como alternativa a, la terapia ARV, para revertir la trayectoria de la enfermedad. Si bien los ARV pueden ser un tratamiento antiviral efectivo, los ARV tienen el efecto adverso de suprimir el sistema inmune, un efecto dañino particularmente para pacientes con VIH o SIDA. Por lo tanto, la modulación inmune consistente a través del régimen descrito en la presente memoria tiene la capacidad de mejorar estos efectos secundarios, mientras que a largo plazo hace la transición a la gestión primaria de la enfermedad. Alternativamente o además, la composición de glicosidasa, después de mejorar la condición, permite la transición a un régimen rentable para la gestión de la enfermedad a largo plazo, lo que puede eliminar la necesidad de una terapia ARV crónica. El régimen generalmente es efectivo para manejar infecciones virales crónicas tales como VIH, VSH, VBE, VAH, VBH, VCH, VPH, adenovirus y otros.

25 Se describen métodos para tratar y/o prevenir una enfermedad infecciosa. El paciente recibe un régimen de la composición descrita en la presente memoria, que proporciona y mantiene una estimulación inmunológica efectiva a lo largo del tiempo, incluyendo como protección solitaria o adicional durante la temporada de influenza u otro brote o epidemia de enfermedades infecciosas en curso. La invención puede encontrar uso con pacientes inmunodeprimidos, incluyendo ancianos, niños, enfermos, hospitalizados y aquellos con un trastorno de inmunodeficiencia (incluyendo inmunodeficiencias genéticas, inmunodeficiencia inducida por fármacos o debido a enfermedades infecciosas tales como el SIDA). La composición y/o el régimen puede actuar como un adyuvante para mejorar la efectividad de la vacuna, proporcionando una vacunación más efectiva y/o mayor duración del efecto protector de una vacuna y, en algunas realizaciones, permite ahorrar dosis de vacuna.

35 Se describe una composición farmacéutica que comprende al menos dos de neuraminidasa, galactosidasa, N-acetilgalactosaminidasa, fucosidasa, glicosidasa, N-acetilglucosaminidasa y manosidasa, y un excipiente farmacéuticamente aceptable. Por ejemplo, la composición puede comprender neuraminidasa y β -galactosidasa. Las glicosidasas pueden estar presentes, en conjunto, entre aproximadamente 10^{-3} mg a 10^{-8} mg. La composición puede formularse para una variedad de rutas de administración, incluyendo la distribución sublingual.

40 describe también un aplicador de dosis de glicosidasa conveniente. El aplicador distribuye una cantidad suficiente de dosis de glicosidasa para un régimen no agudo, tal como por ejemplo, al menos un mes de dosis para revertir la trayectoria de la enfermedad viral o controlar una enfermedad infecciosa, o para prevenir o mitigar enfermedades infecciosas, o mejorar la efectividad de la vacuna. El aplicador mantiene la estabilidad de la composición en el transcurso del régimen, protegiendo la composición de la exposición a una posible contaminación ambiental. La composición de glicosidasa es estable durante el tiempo necesario para administrar las dosis de acuerdo con un régimen descrito en la presente memoria.

Descripción de las figuras

La figura 1 muestra el efecto de la neuraminidasa y el complemento sobre la infectividad de las células Vero por VHS-1. Las unidades indicadas de complemento se incubaron con neuraminidasa y VHS-1. Estas mezclas se añadieron después a la célula Vero y se incubaron durante 5 días. Después de la fijación y tinción celular, se contaron las placas, correspondiendo cada placa a una partícula viral infecciosa inicial. La infectividad se expresa como un porcentaje del control del virus (virus incubado con células y sin complemento o neuraminidasa).

La figura 2 muestra el efecto de la neuraminidasa y el complemento sobre el rendimiento de la infección VHS-1 en células Vero. Las células Vero se incubaron con VHS-1. Estas células infectadas se incubaron después con mezclas que contenían las unidades indicadas de complemento y neuraminidasa. Los controles consistieron en células infectadas sin complemento o neuraminidasa (control de virus). Después de una incubación de 24 horas, los sobrenadantes (que contienen virus liberados) de los cultivos celulares se analizaron para determinar su capacidad para formar placas. El rendimiento se expresa como un porcentaje del control del virus.

La figura 3 resume los efectos de la neuraminidasa en la producción de citocinas in vitro. Las células apropiadas para la producción y medición de las citocinas respectivas se incubaron en presencia (experimental) o ausencia (control) de neuraminidasa. Para IL-2, IFN- α e IFN- γ , se extrajo el ARN celular total y se hibridó con una sonda radiactiva específica de citocina y se determinaron los recuentos por minuto. Para TNF- α , las densidades ópticas se midieron en un ensayo lítico celular. Los valores para cada citocina se expresan como la diferencia porcentual del control de solución salina correspondiente. Según lo indicado por los valores positivos, las cuatro citocinas ensayadas fueron estimuladas en presencia de neuraminidasa en relación con los controles.

Descripción detallada de la invención

La invención se define mediante las reivindicaciones adjuntas.

10 La presente invención proporciona composiciones para uso en la mejora inmune no aguda, que encuentra aplicación en el tratamiento de la infección viral crónica, incluyendo la mejora de la vacuna (por ejemplo, vacuna sin adyuvante).

En un aspecto, la invención comprende composiciones que comprenden una o más enzimas glicosidasa para uso en el tratamiento de un paciente que tiene una infección viral crónica. El régimen in vivo estimula la señalización inmune mediante la eliminación de cantidades efectivas de glicósidos, especialmente ácidos siálicos en algunas realizaciones, de la superficie de las células inmunes u otros objetivos, y evita la eliminación excesiva de glicósidos que incluye el ácido siálico de las células normales. El régimen permite la orientación antigénica persistente de las células infectadas por la cascada inmune provocada. En algunas realizaciones, el régimen comprende enzimas activas para la eliminación de glicósidos que prevalecen en células infectadas por virus, y que en diversas realizaciones son glicósidos terminales o penúltimos. En algunas realizaciones, el régimen comprende neuraminidasa y una segunda glicosidasa específica para la eliminación de un penúltimo residuo de glucosilo prevalente, que puede proporcionar un tratamiento sinérgico evitando, previniendo o ralentizando la resialilación. y/o recubriendo las cadenas de glucosilo. El régimen de administración, incluyendo como terapia complementaria e incluye realizaciones que implican un control conveniente de la dosis del paciente, es como se describe en detalle en la presente memoria. De acuerdo con este aspecto, la efectividad del método no depende críticamente de la identidad del agente infeccioso o de la biología única del paciente, a diferencia de muchas terapias convencionales.

La invención en diversas realizaciones proporciona composiciones de glicosidasa para uso en la administración de regímenes suficientes para la estimulación inmune al tiempo que evita el direccionamiento de la glicosidasa por el sistema inmune, que de otro modo podría reducir o eliminar su eficacia. También se describen aplicadores de dosificación de glicosidasa para administrar los regímenes descritos en la presente memoria.

30 La composición de glicosidasa comprende la neuraminidasa de *Clostridium perfringens* NanI, que es una enzima que hidroliza los enlaces glucosídicos de los residuos de ácido siálico terminales en diversos glicoconjugados. Las neuraminidasas se encuentran en células de mamíferos, así como en diversas fuentes bacterianas, fúngicas y virales. En virtud de su posición terminal en las cadenas de carbohidratos de las membranas celulares, los ácidos siálicos son reguladores clave de la comunicación entre las células y de los fenómenos de reconocimiento inmune. De acuerdo con la invención, la neuraminidasa se formula, opcionalmente con otras glicosidasas como se describe en la presente memoria, y se proporciona como un régimen de dosis que le permite funcionar como un inmunomodulador en cascada de señalización, coordinando la respuesta inmune del huésped para combatir eficazmente las enfermedades infecciosas, incluyendo el VIH y otros agentes virales e infecciosos, mientras que el sistema inmune no los ataca (significativamente) En algunas realizaciones, estas propiedades de la composición se mejoran mediante una formulación adecuada y/o distribución de la glicosidasa.

En diversas realizaciones, y sin querer limitarse a la teoría, la terapia con glicosidasa mejora la función inmune al menos en parte mediante la activación del complemento. Por ejemplo, cuando se usa Herpes simplex (VHS-1) como virus modelo, los estudios in vitro muestran que la incubación de niveles adecuados de neuraminidasa y complemento juntos reduce significativamente tanto la infectividad de las células Vero por VHS-1 como la liberación de virus libre de células preinfectadas en relación con los controles (figuras 1 y 2).

En diversas realizaciones, y sin querer limitarse a la teoría, la terapia con glicosidasa mejora la función inmune, al menos en parte, mediante la estimulación de citocinas, incluyendo, por ejemplo, interleucina-2 (IL-2), interferón alfa (IFN- α), interferón gamma (IFN- γ), factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), interleucina-4 (IL-4) e interleucina-6 (IL-6). Utilizando sistemas celulares in vitro, se estimuló la producción de al menos cuatro citocinas en presencia de niveles adecuados de neuraminidasa en relación con los controles respectivos. Así, en algunas realizaciones, las funciones de estas citocinas se potencian mediante una cascada de señal mantenida o perpetua de neuraminidasa, que conduce al control de la estimulación inmune.

En algunas realizaciones, y sin querer limitarse a la teoría, la terapia con glicosidasa mejora la función inmune al menos en parte al aumentar la eficiencia de las interacciones de las células inmunes. La mayor eficiencia de estas interacciones de las células inmunes en presencia de niveles adecuados de neuraminidasa, así como otras glicosidasas, puede deberse a la eliminación de moléculas de ácido siálico cargadas negativamente, lo que resulta en un mayor contacto de célula a célula. En diversas realizaciones, la composición y el régimen de glicosidasa mejora la función inmune al mejorar la citotoxicidad mediada por células y/o activación de las células inmunes

5 En diversas formas de realización, y sin querer limitarse a la teoría, el régimen de glicosidasa funciona al menos en parte al aumentar la exposición a agentes infecciosos, como virus (por ejemplo, VIH, VHS, VBE, VCH, VPH, adenovirus) y células infectadas por virus a mecanismos inmunes. Además de la posible activación del complemento, la eliminación de residuos terminales de ácido siálico de la gp120 del VIH o las células infectadas por el VIH por la neuraminidasa puede tener otros efectos inmunoestimulantes. La eliminación de residuos terminales de ácido siálico y/u otros glicanos de gp120/gp 160 del VIH expone epítomos ocultos o altera la conformación de la glicoproteína de modo que el virus es más susceptible al ataque de varios componentes del sistema inmune del huésped. La formulación y el régimen de glicosidasa descritos en la presente memoria inclinan el delicado equilibrio entre la defensa inmune y la infectividad viral a favor del huésped.

10 En diversas realizaciones, sin desear estar limitado por la teoría, el régimen de glicosidasa, que puede comprender una o más de neuraminidasa, β -galactosidasa, α -manidasa, fucosidasa (así como otras enzimas de glicosidasa, incluyendo las descritas en la presente memoria) convierte la proteína de unión a vitamina D (también conocida como componente específico del grupo, o Gc), a un factor de activación de macrófagos eficaz in vivo, que conduce a la activación de macrófagos contra la enfermedad infecciosa del paciente. Véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. 5,326,749; Yamamoto et al., J Immunology Vol. 151:2794-2802 (1993). La proteína de unión a la vitamina D, también conocida como DBP, es una glicoproteína conservada evolutivamente y es genéticamente polimórfica. La DBP tiene un peso molecular relativo de aproximadamente 52000, y normalmente constituye aproximadamente el 0,5% de la proteína plasmática. La dosis y el régimen adecuados de glicosidasa, como se describe en la presente memoria, pueden conducir a una activación de macrófagos in vivo efectiva, consistente y crónica contra el patógeno causante particular, incluyendo la focalización específica de su estado antigénico, que es crucial para los patógenos que cambian constantemente los epítomos expuestos. Por lo tanto, la administración in vivo de la composición de glicosidasa, incluyendo la dosificación sublingual conveniente, conduce a la activación efectiva de macrófagos contra los patógenos.

25 En un aspecto, la invención proporciona composiciones para uso en un método para tratar a un paciente que tiene una infección viral crónica. El método comprende administrar un régimen no agudo de una composición de glicosidasa de señalización inmunotolerante e inmune al paciente para tratar, mejorar, y/o gestionar dicha infección. En algunas realizaciones, el virus es uno que se integra con el genoma del huésped (por ejemplo, como provirus) o que puede volverse latente, o escapar de la vigilancia inmune por ser difícil o imposible de eliminar por completo. Los virus ejemplares incluyen retrovirus (por ejemplo, VIH), virus del herpes simple (por ejemplo, VHS-1 o VHS-2), virus de la hepatitis (por ejemplo, VAH, VBH, VCH) y adenovirus. En tales realizaciones, la composición y el régimen de glicosidasa descritos en la presente memoria pueden tomar el lugar de la quimioterapia o inmunoterapia antiviral (por ejemplo, terapia con citocinas o quimiocinas, como el interferón o el tratamiento con anticuerpos monoclonales) para el tratamiento de la enfermedad a largo plazo, o pueden combinarse con tales terapias para mejorar el resultado, es decir, combinados simultáneamente o en secuencia.

35 En algunas realizaciones, el paciente es VIH positivo, y en algunas realizaciones es un paciente con SIDA sintomático. La infección por VIH es un problema mundial, y varios gobiernos han hecho arreglos para que sus ciudadanos tengan acceso a fármacos antirretrovirales. A pesar de estos esfuerzos, a veces los fármacos no están disponibles debido a la mala comunicación y la poca accesibilidad, lo que provoca que los pacientes pierdan las dosis. Además, con bastante frecuencia, los pacientes no pueden tolerar estos fármacos. La presente invención proporciona alternativas a los fármacos antirretrovirales en algunas realizaciones, y en otras realizaciones, proporciona agentes adicionales para reducir la necesidad de uso a largo plazo de antirretrovirales u otra terapia quimioterapéutica o antiviral.

40 Por lo tanto, en algunas realizaciones, el paciente no se somete a terapia antirretroviral durante el tratamiento con glicosidasa, por ejemplo, porque el paciente no puede tolerar la terapia antirretroviral, o dicha terapia ARV no está disponible para el paciente. El VIH puede ser de cualquier subtipo, como VIH-1 o VIH-2. En algunas realizaciones, el VIH es resistente a la quimioterapia antirretroviral, lo que hace que la disponibilidad de una terapia alternativa sea crítica. En algunas realizaciones, la glicosidasa se administra o inicia después de la terapia antirretroviral para controlar el SIDA crónico, proporcionando así una gestión de la enfermedad a largo plazo más eficaz y sensible al coste.

45 El régimen de glicosidasa también se puede administrar con quimioterapia antirretroviral, por ejemplo, para ayudar a revertir la trayectoria de la enfermedad. Una vez que se invierte la trayectoria de la enfermedad, el régimen de glicosidasa puede continuarse opcionalmente durante al menos un mes, al menos dos meses, al menos cuatro meses, al menos seis meses, o al menos un año, o al menos dos años, o al menos cinco años, o más, para proporcionar una gestión rentable de la enfermedad. La frecuencia o la dosis diaria se pueden ajustar para el tratamiento a largo plazo como se describe en la presente memoria.

50 En algunas realizaciones, la señalización de glicosidasa tolerada por el sistema inmune compensa la pérdida de células CD4, al tiempo que permite que el huésped se recupere y reponga su suministro de estas células críticas. En algunas realizaciones, la composición de glicosidasa permite que un sujeto en terapia antirretroviral cese la terapia antirretroviral durante un período de tiempo (por ejemplo, aproximadamente uno a seis meses, o aproximadamente uno a cuatro meses, o aproximadamente uno a dos meses), permitiendo así que el cuerpo para recuperarse de los efectos tóxicos de estos fármacos, al tiempo que proporciona ventajas de coste. El régimen permite además el direccionamiento inmune del virus y las partículas de virus, así como las células infectadas (por ejemplo, lisogénicas) preferentemente sobre las células huésped. En algunas realizaciones, este "ciclo" de tratamiento con AVR y

glicosidasa se repite una o más veces a lo largo de la terapia. En todavía otras realizaciones, la administración de la terapia con glicosidasa con terapia antirretroviral evita parte de la amortiguación del sistema inmune que a menudo se exhibe con la terapia retroviral. La administración con otros regímenes quimioterapéuticos, como se describe en este párrafo, para otras infecciones virales (por ejemplo, VHS-1 o -2, VBE, VAH, VBH, VCH, VPH, adenovirus) puede proporcionar las mismas ventajas o similares.

Los fármacos diseñados para combatir el VIH se han centrado en las diversas etapas del ciclo de vida viral. Algunos han sido diseñados para bloquear la unión del virus a la célula T CD4. Otros se han dirigido a las diversas enzimas involucradas en las etapas de ensamblaje dentro de la célula; La zidovudina (AZT), por ejemplo, es un fármaco bien conocido que funciona para inhibir la actividad de la transcriptasa inversa, una enzima que el VIH usa para copiar su genoma de ARN en el ADN. Algunas de estos fármacos sintéticos han ralentizado la progresión al SIDA, pero ninguno lo ha detenido o eliminado el virus. Un problema importante ha sido la alta velocidad de mutación del VIH, donde los fármacos que inicialmente muestran cierta promesa se vuelven ineficaces a medida que el virus cambia su forma a una que el fármaco ya no reconoce. El régimen de glicosidasa también se dirige a los derivados mutantes del VIH que permiten mejorar el ARV, así como otras posibles quimioterapias, para reducir la propensión del virus mutante a eludir la terapéutica.

Como se usa en la presente memoria, el término terapia antirretroviral se refiere a agentes activos (a menudo cócteles de agentes activos) administrados a pacientes con VIH y SIDA. Estos incluyen, por ejemplo, terapia que comprende inhibidores de entrada (por ejemplo, maraviroc y/o enfuvirtida), antagonistas del receptor CCR5, inhibidores de la transcriptasa inversa (por ejemplo, zidovudina, didanosina, zalcitabina, estavudina, foscarnet, y/o lamivudina), inhibidores de proteasa (por ejemplo, ritonavir, darunavir, atazanavir, saquinavir), inhibidores de integrasa (por ejemplo, raltegravir), inhibidores de maduración (por ejemplo, alfa interferón, bevirimat, y/o vivecon). En algunas realizaciones, la terapia retroviral comprende una combinación de dos análogos de nucleósidos y un no análogo de nucleósido o inhibidor de proteasa. Esta combinación de tres fármacos se conoce comúnmente como un "cóctel triple". Los ejemplos incluyen COMBIVIR (zidovudina + lamivudina), TRIZIVIR (abacavir + zidovudina + lamivudina), KALETRA (lopinavir + ritonavir), EPZICOM (abacavir + lamivudina), TRUVADA (tenofovir + emtricitabina), ATRIPLA (efavirenz + tenofovir + emtricitabina). Otras combinaciones incluyen: tenofovir/emtricitabina/raltegravir, tenofovir/emtricitabina/ritonavir, y darunavir/tenofovir/emtricitabina/ritonavir/atazanavir.

En algunas realizaciones, la terapia antirretroviral comprende dos inhibidores de la transcriptasa inversa nucleósidos y un inhibidor de la transcriptasa inversa no nucleótidos. En algunas realizaciones, la terapia ARV comprende estavudina, lamivudina, y/o nevirapina. En algunas realizaciones, la terapia ARV comprende Efavirenz. Dichas terapias, si se administran, se emplean con moderación o para reducir la trayectoria inicial de la enfermedad, antes de la transición al tratamiento con glicosidasa a largo plazo. Dicha gestión de la enfermedad a largo plazo con la terapia de glicosidasa provoca una cascada inmune contra el virus libre, incluyendo el virus mutante y las células infectadas.

El régimen descrito en la presente memoria en diversas realizaciones es adecuado para tratar pacientes en diversas etapas del SIDA. En algunas realizaciones, el recuento de CD4 del paciente al comienzo del régimen es inferior a aproximadamente 500 células por mm. Por ejemplo, el recuento de CD4 del paciente al comienzo del régimen puede estar entre aproximadamente 200 y aproximadamente 400. El recuento de CD4 del paciente al comienzo del régimen puede ser inferior a aproximadamente 400, inferior a aproximadamente 350, inferior a aproximadamente 300, inferior a aproximadamente 200, inferior a aproximadamente 100 o inferior a aproximadamente 50. En algunas realizaciones, donde el recuento de CD4 es inferior a 400, se administra terapia antirretroviral, sola o con la composición de glicosidasa, y la composición de glicosidasa se usa para cuidados a largo plazo una vez que el recuento de CD4 se normaliza (por ejemplo, por encima de aproximadamente 400 o más aproximadamente 500 o más de aproximadamente 800). En algunas realizaciones, el paciente puede continuar teniendo un recuento de CD4 por debajo de lo normal, pero la composición de glicosidasa ayuda al sistema inmune a funcionar con este deterioro. En otras realizaciones más, el paciente tiene un recuento bajo de CD4 como se describe, y la composición de glicosidasa se administra sin terapia retroviral, permitiendo que el recuento de CD4 se normalice a largo plazo.

En algunas realizaciones, la carga viral del paciente al comienzo del régimen es superior a aproximadamente 10000 por ml. Por ejemplo, la carga viral al comienzo del régimen puede ser de al menos aproximadamente 25000 por ml, al menos aproximadamente 40000 por ml, al menos aproximadamente 50000 por ml, al menos aproximadamente 75000 por ml, al menos aproximadamente 100000 por ml, a al menos aproximadamente 500000 por ml, al menos aproximadamente 1 millón por ml, o al menos aproximadamente 5 millones por ml. En algunas realizaciones, el paciente recibe terapia antirretroviral para llevar la carga viral a menos de aproximadamente 50000 por ml, o menos de 10000 por ml, o indetectable, y después pasar al tratamiento con glicosidasa como el cuidado a largo plazo. En algunas realizaciones, la combinación de terapia antirretroviral y glicosidasa permite una reducción más rápida o más completa de la carga viral.

En algunas realizaciones, el beneficio de la terapia con glicosidasa se puede discernir al menos en parte a través de una evaluación del bienestar del paciente, incluyendo el estado de ánimo y el estado mental, el apetito, el nivel de energía, infecciones/complicaciones secundarias, crecimiento del pelo y otros síntomas de mejora de la salud general. Tales beneficios pueden o no ser discernibles con la cuantificación convencional del tratamiento del SIDA, como el nivel de CD4 o los títulos virales.

Este régimen de glicosidasa descrito en la presente memoria es aplicable a otras infecciones virales crónicas. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el paciente tiene una infección viral crónica seleccionada de una infección por el virus del herpes simple (por ejemplo, VHS-1 o VHS-2), infección por el virus de Epstein-Barr (por ejemplo, mononucleosis), infección por citomegalovirus, infección por virus de varicela zoster, hepatitis A, B o C, infección por adenovirus o infección por el virus del papiloma humano. En algunas realizaciones, el paciente es diagnosticado con síndrome de fatiga crónica. La composición de glicosidasa trata y/o previene los brotes de la enfermedad y reduce la carga viral, y en algunas realizaciones, toma el lugar de las estrategias antivirales convencionales como terapias con citocina y/o quimocina (por ejemplo, interferón o interleucina) o antivirales de molécula pequeña (por ejemplo, aciclovir, valaciclovir, famciclovir). Alternativamente, la composición de glicosidasa se administra para la gestión a largo plazo, una vez que la infección viral está bajo control mediante terapia convencional (por ejemplo, Interferón o inhibidor de virus de molécula pequeña o anticuerpo terapéutico monoclonal). En algunas realizaciones, el régimen reduce o elimina las lesiones virales como el herpes labial, y/o evita su recurrencia.

Por ejemplo, en algunas realizaciones, el paciente tiene una infección por VHS o virus de varicela zoster, y en algunas realizaciones puede tener herpes. De acuerdo con la invención, el paciente no puede recibir fármacos antivirales como aciclovir, valaciclovir y/o famciclovir, o en otras realizaciones, el régimen de glicosidasa se administra después de que los antivirales convencionales no mejoran o eliminan la infección o los síntomas de la misma, o después de que los antivirales convencionales tengan reglas en virtud de la capacidad del paciente para tolerar estos fármacos.

En todavía otras realizaciones, el paciente tiene infección por hepatitis C y recibe terapia con interferón. En tales realizaciones, el régimen de glicosidasa puede proporcionarse para reemplazar la terapia de INF ineficaz, por ejemplo, una vez que la terapia pierde efectividad o no es tolerada por el paciente. En otras realizaciones, el régimen de glicosidasa se proporciona junto con la terapia con interferón para aumentar su eficacia. El régimen de glicosidasa puede facilitar la integración adecuada de la terapia con interferón o anticuerpo para una respuesta inmune efectiva.

En realizaciones particulares, la invención se utiliza con pacientes inmunodeprimidos, incluyendo los ancianos, los jóvenes, los hospitalizados y los pacientes con una condición de inmunodeficiencia (por ejemplo, como resultado del SIDA, trastorno genético o tratamiento farmacológico), para aumentar la función inmune. La composición y/o el régimen puede actuar como un adyuvante para mejorar la efectividad de la vacuna, proporcionando una vacunación más efectiva y/o mayor duración del efecto protector y, en algunas realizaciones, permite ahorrar dosis de vacuna. En algunas realizaciones, la vacuna es una vacuna libre de adyuvante, con la composición de glicosidasa actuando como adyuvante. Por ejemplo, la composición y el régimen de glicosidasa pueden iniciarse aproximadamente al momento de recibir una gripe u otra vacuna (por ejemplo, iniciarse dentro de una semana o tres días o un día de recibir una vacuna), y el régimen de glicosidasa continuó alargando la duración del efecto protector de la vacuna y/o el nivel o duración de los títulos de anticuerpos protectores.

El régimen de glicosidasa proporciona una o más enzimas de glicosidasa activas para la eliminación de uno o más grupos glucosilo terminales y/o penúltimos en células de mamífero (por ejemplo, células inmunes y/o células infectadas viralmente). Dichos grupos glicosilo terminales y penúltimos incluyen, por ejemplo, residuos sialosilo, galactosilo, N-acetilgalactosamino, fucosilo, glucosilo, N-acetilglucosamino y manosilo. Por lo tanto, el régimen de glicosidasa puede incluir, en diversas realizaciones, una o más de neuraminidasa, galactosidasa, (por ejemplo β -galactosidasa), N-acetilgalactosidasa, fucosidasa, glucosidasa, N-acetilglucosaminidasa y manosidasa.

El régimen de glicosidasa comprende el tratamiento con neuraminidasa. La terapia con neuraminidasa puede emplear una neuraminidasa o fracción purificada que tiene actividad de neuraminidasa (sialidasa), o una porción activa o derivado activo de la misma. La neuraminidasa puede purificarse o aislarse de su fuente natural, o puede ser recombinante o sintética (por ejemplo, sintetizada químicamente). La neuraminidasa cataliza la hidrólisis de enlaces glicosídicos α -2,3, α -2,6 y/o α -2,8 de residuos de ácido siálico terminales en oligosacáridos, glicolípidos y ácido colomínico.

La neuraminidasa es una endo o exo sialidasa, por ejemplo, que cataliza la exo hidrólisis de enlaces glicosídicos α -(2 \rightarrow 3), α -(2 \rightarrow 6), y/o α -(2 \rightarrow 8) de residuos terminales de ácido siálico, o cataliza la endo hidrólisis de enlaces (2 \rightarrow 8)- α -sialosilo en ácido oligo- o poli(síalico). La neuraminidasa es una enzima de *Clostridium Perfringens*. Dichas enzimas neuraminidasa pueden purificarse o aislarse de su fuente microbiana, o producirse de forma recombinante o sintética. Véanse Cassidy JT, *The Sialic Acids - VI. Purification and properties of sialidase from Clostridium perfringens*. *J Biol. Chem.* 240:9:3501-3506 (1965); Crennell S., et al., *Crystal structure of Vibrio cholerae neuraminidase reveals dual lectin-like domains in addition to the catalytic domain*. *Structure* 2:535-544 (1994); Uchida et al., *Enzymatic properties of neuraminidases from Arthrobacter ureafaciens*. *JBiochem.* 106:1086-1089 (1979). Cuando está en forma purificada, la neuraminidasa es al menos el 10% del componente proteico de la composición, al menos el 25% del componente proteico de la composición, el 50% del componente proteico de la composición, o al menos el 75% del total componente proteico, o al menos el 90% del componente proteico total, o al menos el 95% del componente proteico total, o al menos el 99% del componente proteico total.

La neuraminidasa comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90%, 95%, o más identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos definida por EIA17977.1.

Las neuraminidasas adecuadas se pueden obtener de fuentes comerciales. Las enzimas de neuraminidasa ejemplares incluyen los números de producto Sigma Aldrich N2876, N3001, N5631, N2133 (*Clostridium perfringens*).

La preparación de derivados o mutantes de estas u otras enzimas neuraminidasa puede guiarse por cualquiera de las estructuras o estudios conocidos, incluyendo los descritos por: Kim S et al., Features and applications of bacterial sialidasas, *Appl Microbiol Biotechnol.* 2011, 91(1):1-15; Crennell SJ, et al., Crystal structure of a bacterial sialidase (from *Salmonella typhimurium* LT2) shows the same fold as an influenza virus neuraminidase, *Proc Natl Acad Sci USA* 1993 90(21):9852-6; Chavas LM, Crystal structure of the human cytosolic sialidase Neu2: Evidence for the dynamic nature of substrate recognition, *J Biol Chem.* 2005 280(1):469-75; Xu G et al, Crystal structure of the NanB sialidase from *Streptococcus pneumoniae*, *J Mol Biol.* 2008 384(2):436-49; Newstead SL, et al., The structure of *Clostridium perfringens* NanI sialidase and its catalytic intermediates, *J Biol Chem.* 2008 283(14):9080-8; Chan J, et al., Bacterial and viral sialidasas: contribution of the conserved active site glutamate to catalysis, *Biochemistry* 2012 51(1):433-41; Chien CH, et al., Site-directed mutations of the catalytic and conserved amino acids of the neuraminidase gene, nanH, of *Clostridium perfringens* ATCC 10543, *Enzyme Microb. Technol.* 19(4):267-276 (1996); Christensen and Egebjerg, Cloning, expression and characterization of a sialidase gene from *Arthrobacter ureafaciens*, *Biotechnol. Appl. Biochem.* 41:225-231 (2005).

La actividad de la neuraminidasa generalmente se puede describir en términos de unidades (U), determinando la cantidad de ácido siálico liberado de un sustrato adecuado, en condiciones definidas (por ejemplo, PH 5,0 y 37 °C). Un sustrato ejemplar es NAN-lactosa o mucina submaxilar bovina. Ver Warren L, *J Biol. Chem* 234 1971 (1959).

En estas y otras realizaciones independientes, el régimen de glicosidasa comprende la administración de galactosidasa, que en algunas realizaciones es β -galactosidasa. La galactosidasa puede coformularse con la neuraminidasa en realizaciones que implican dos o más enzimas glicosidasa. Los residuos alfa- o beta-galactosilo (incluyendo enlaces 1 \rightarrow 3 y enlaces 1 \rightarrow 4) actúan como glicósidos terminales en las células de mamíferos, incluyendo las células inmunes, y/o pueden ser residuos de glicosilo penúltimos, y pueden estar unidos a ácidos siálicos terminales en algunos casos. Hakomori, *Aberrant Glycosylation in Cancer Cell Membranes as Focused on Glycolipids: Overview and Perspectives*, *Cancer Research* 45, 2405-2414 (1985); Dwek and Brooks, *Harnessing Changes in Cellular Glycosylation in New Cancer Treatment Strategies*, *Current Cancer Drug Targets* 4:425-442 (2004). Por lo tanto, la galactosidasa (por ejemplo, β -galactosidasa) se puede usar junto con la neuraminidasa, que en algunas realizaciones, previene o ralentiza la resialización o el recubrimiento de las estructuras de glicosilo, lo que hace que el régimen sea más efectivo y respalde administraciones menos frecuentes y/o dosificación más baja.

Las galactosidasas ejemplares son bien conocidas y están disponibles comercialmente. Por ejemplo, la β -galactosidasa se puede obtener de *Escherichia coli*, *Aspergillus oryzae*, *Kluyveromyces lactis* y *Streptococcus pneumoniae*, así como otras fuentes microbianas (por ejemplo, bacterianas o fúngicas) y biológicas, incluyendo fuentes de mamíferos. Por ejemplo, se puede obtener una β -galactosidasa adecuada de Sigma-Aldrich número de catálogo G5635.

En estas y otras realizaciones independientes, el régimen de glicosidasa comprende la administración de N-acetilgalactosaminidasa. La N-acetilgalactosaminidasa puede coformularse con la neuraminidasa en realizaciones que implican dos o más enzimas glicosidasa. Hakomori, *Aberrant Glycosylation in Cancer Cell Membranes as Focused on Glycolipids: Overview and Perspectives*, *Cancer Research* 45, 2405-2414 (1985); Dwek and Brooks, *Harnessing Changes in Cellular Glycosylation in New Cancer Treatment Strategies*, *Current Cancer Drug Targets* 4:425-442 (2004). La N-acetilgalactosaminidasa puede usarse junto con la neuraminidasa, que en algunas realizaciones, previene o retrasa la resialización o reencapsulamiento de las cadenas de glicosilo.

Las N-acetilgalactosaminidasas ejemplares son bien conocidas y están disponibles comercialmente. Por ejemplo, la β -N-acetilgalactosaminidasa se puede obtener de *Bacillus* sp., así como otras fuentes microbianas (por ejemplo, bacterianas o fúngicas) y biológicas, incluyendo fuentes de mamíferos. Por ejemplo, se puede obtener una β -N-acetilgalactosaminidasa adecuada de Sigma-Aldrich número de catálogo A2464.

En estas y otras realizaciones independientes, el régimen de fucosidasa comprende la administración de fucosidasa, que en algunas realizaciones es α -fucosidasa. La fucosidasa puede coformularse con la neuraminidasa en realizaciones que implican dos o más enzimas glicosidasa. Los residuos de fucosilo (incluyendo enlaces α 1 \rightarrow 2, enlaces α 1 \rightarrow 3 y enlaces α 1 \rightarrow 4) actúan como glicósidos terminales en las células de mamíferos, incluyendo las células inmunes, y/o pueden ser residuos de glicosilo penúltimos, y pueden estar unidos a ácidos siálicos terminales en algunos casos. Hakomori, *Aberrant Glycosylation in Cancer Cell Membranes as Focused on Glycolipids: Overview and Perspectives*, *Cancer Research* 45, 2405-2414 (1985); Dwek and Brooks, *Harnessing Changes in Cellular Glycosylation in New Cancer Treatment Strategies*, *Current Cancer Drug Targets* 4:425-442 (2004). Por lo tanto, la fucosidasa (por ejemplo, α -fucosidasa) se puede usar junto con la neuraminidasa, que en algunas realizaciones, previene o ralentiza la resialización o el recubrimiento de las estructuras de glicosilo, lo que hace que el régimen sea más efectivo y respalde administraciones menos frecuentes y/o dosificación más baja.

Las fucosidasas ejemplares son bien conocidas y están disponibles comercialmente. Por ejemplo, la α -fucosidasa se puede obtener de *Xanthomonas* sp., (por ejemplo, *manihotis*), así como otras fuentes microbianas (por ejemplo,

bacterianas o fúngicas) y biológicas, incluyendo fuentes de mamíferos. Por ejemplo, se puede obtener una α -fucosidasa adecuada de Sigma-Aldrich números de catálogo F3023 y F1924.

En estas y otras realizaciones independientes, el régimen de glicosidasa comprende la administración de glicosidasa, que en algunas realizaciones es α -glucosidasa. La glucosidasa puede coformularse con la neuraminidasa en realizaciones que implican dos o más enzimas glicosidasa. Los residuos de glicosilo (incluyendo enlaces $\alpha 1 \rightarrow 2$, enlaces $\alpha 1 \rightarrow 3$ y enlaces $\alpha 1 \rightarrow 4$) actúan como glicósidos terminales en las células de mamíferos, incluyendo las células inmunes, y/o en algunos casos pueden ser residuos de glicosilo internos. Hakomori, *Aberrant Glycosylation in Cancer Cell Membranes as Focused on Glycolipids: Overview and Perspectives*, *Cancer Research* 45, 2405-2414 (1985); Dwek and Brooks, *Harnessing Changes in Cellular Glycosylation in New Cancer Treatment Strategies*, *Current Cancer Drug Targets* 4:425-442 (2004). Por lo tanto, la glucosidasa (por ejemplo, α -glucosidasa) se puede usar junto con la neuraminidasa, que en algunas realizaciones, previene o ralentiza la resialización o el recubrimiento de las cadenas de glicosilo, lo que hace que el régimen sea más efectivo y respalde administraciones menos frecuentes y/o dosificación más baja.

Las glucosidasas ejemplares son bien conocidas y están disponibles comercialmente. Por ejemplo, la α -glucosidasa se puede obtener de *Sacchomyces cerevisiae*, *Aspergillus niger* o *Bacillus stearothermophilus*, así como otras fuentes microbianas (por ejemplo, bacterianas o fúngicas) y biológicas (incluyendo las fuentes de alimentos tales como el arroz) e incluyendo las fuentes de mamíferos. Por ejemplo, se puede obtener una α -glucosidasa adecuada de Sigma-Aldrich números de catálogo G5003, G0660, 70797, 49291, G9259, y G3651.

En estas y otras realizaciones independientes, el régimen de glicosidasa comprende la administración de N-acetilglucosaminidasa, que en algunas realizaciones es β -N-acetilglucosaminidasa. La N-acetilglucosaminidasa puede coformularse con la neuraminidasa en realizaciones que implican dos o más enzimas glicosidasa (por ejemplo coformularse con neuraminidasa). Los residuos de N-acetilglucosaminidasa (incluyendo enlaces $\beta 1 \rightarrow 4$, enlaces $\beta 1 \rightarrow 6$, y otros) actúan como glicósidos terminales en las células de mamíferos, incluyendo las células inmunes, y/o en algunos casos pueden ser residuos de glicosilo internos o penúltimos. Hakomori, *Aberrant Glycosylation in Cancer Cell Membranes as Focused on Glycolipids: Overview and Perspectives*, *Cancer Research* 45, 2405-2414 (1985); Dwek and Brooks, *Harnessing Changes in Cellular Glycosylation in New Cancer Treatment Strategies*, *Current Cancer Drug Targets* 4:425-442 (2004). Por lo tanto, la N-acetilglucosaminidasa (por ejemplo, β -N-acetilglucosaminidasa) se puede usar junto con la neuraminidasa, que en algunas realizaciones, previene o ralentiza la resialización o el recubrimiento de las cadenas de glicosilo, lo que hace que el régimen sea más efectivo y respalde administraciones menos frecuentes y/o dosificación más baja.

Las N-acetilglucosaminidasas ejemplares son bien conocidas y están disponibles comercialmente. Por ejemplo, la β -N-acetilglucosaminidasa se puede obtener de *Streptococcus pneumoniae* y *Canavalia ensiformis* así como otras fuentes microbianas (por ejemplo, bacterianas o fúngicas) y biológicas (incluyendo fuentes de alimentos), e incluyendo fuentes de mamíferos. Por ejemplo, se puede obtener una β -N-acetilglucosaminidasa adecuada de Sigma-Aldrich números de catálogo A2264 y A6803.

En estas y otras realizaciones independientes, el régimen de glicosidasa comprende la administración de manosidasa, que en algunas realizaciones es α -manosidasa. La manosidasa puede coformularse con la neuraminidasa en realizaciones que implican dos o más enzimas glicosidasa (por ejemplo coformularse con neuraminidasa). Los residuos de manosilo (incluyendo enlaces $\alpha 1 \rightarrow 2$, enlaces $\alpha 1 \rightarrow 3$, enlaces $\alpha 1 \rightarrow 6$, enlaces $\beta 1 \rightarrow 4$, y otros) actúan como glicósidos terminales en las células de mamíferos, incluyendo las células inmunes, y/o en algunos casos pueden ser residuos de glicosilo internos. Hakomori, *Aberrant Glycosylation in Cancer Cell Membranes as Focused on Glycolipids: Overview and Perspectives*, *Cancer Research* 45, 2405-2414 (1985); Dwek and Brooks, *Harnessing Changes in Cellular Glycosylation in New Cancer Treatment Strategies*, *Current Cancer Drug Targets* 4:425-442 (2004). Por lo tanto, la manosidasa (por ejemplo, α -manosidasa) se puede usar junto con la neuraminidasa, que en algunas realizaciones, previene o ralentiza la resialización o el recubrimiento de las cadenas de glicosilo, lo que hace que el régimen sea más efectivo y respalde administraciones menos frecuentes y/o dosificación más baja.

Las manosidasas ejemplares son bien conocidas y están disponibles comercialmente. Por ejemplo, la manosidasa se puede obtener de *Canavalia ensiformis* (α) o *Helix pomatia* (β), así como otras fuentes microbianas (por ejemplo, bacterianas o fúngicas) y biológicas (incluyendo fuentes de alimentos), e incluyendo fuentes de mamíferos. Por ejemplo, se puede obtener una manosidasa adecuada de Sigma-Aldrich números de catálogo M7257 o M9400.

La administración de cantidades efectivas de glicosidasa formulada a un ser humano o animal ayuda a prevenir o eliminar los síntomas de enfermedades infecciosas a través de la modulación de la función inmune y/o acción directa sobre las células infectadas u otros tejidos o células involucradas en la patología. Las enzimas glicosidasa se administran a una dosis y frecuencia para exhibir una reducción en los síntomas o la patología, sin afectar las funciones celulares normales. La dosis y/o la frecuencia de administración en algunas realizaciones es una dosis y/o frecuencia que no causa malestar o malestar articular prolongados (por ejemplo, una sensación general de malestar). Cuando el paciente experimenta malestar en las articulaciones o en general, el paciente puede ajustar la dosis o la frecuencia de administración hasta que el malestar disminuya o se normalice. Por ejemplo, cuando el paciente experimenta malestar, puede omitir uno, dos o tres días de dosificación, y/o restar una o dos dosis diarias del régimen, y/o aumente el tiempo entre dosis, hasta que el malestar disminuya o se normalice. Por lo tanto, el paciente encuentra la dosis más

alta y/o frecuencia de administración que no induce malestar articular prolongado o malestar mínimo. En algunas realizaciones donde la cantidad de dosis es controlable, por ejemplo, usando un aplicador de dosis medida, la dosis puede reducirse pero el programa se mantiene. Por lo tanto, cada paciente puede adaptar la dosis según sea necesario dado el estado de la biología, la enfermedad o la condición del sistema inmune únicos del paciente, al encontrar que la dosis más alta/frecuencia no induce molestias o malestar articular prolongados. En la práctica, la formulación de glicosidasa se puede administrar a menos de aproximadamente 10^{-2} o menos de aproximadamente 10^{-3} mg por unidad de dosificación a un ser humano o animal. En ciertas realizaciones, la(s) glicosidasa(s) se administra(n) entre aproximadamente 10^{-3} mg a 10^{-8} mg. En otras realizaciones más, la dosis de glicosidasa está entre aproximadamente 10^{-3} mg y 10^{-7} mg, 10^{-3} mg y 10^{-6} mg, 10^{-3} mg y 10^{-5} mg, o es aproximadamente 10^{-4} mg. En algunas realizaciones, la dosis diaria total no excede de aproximadamente 10^{-3} mg por sujeto, o en algunas realizaciones, no excede de aproximadamente 5×10^{-3} a 10^{-4} mg. En general, los pacientes que exhiben supresión inmune (tales como los que reciben ARV) pueden requerir dosis más altas dentro del intervalo de 10^{-2} o 10^{-3} mg.

Si bien ciertas glicosidasas, incluyendo las neuraminidasas, pueden tener tendencia a formar homodímeros (por ejemplo, trímeros, tetrámeros), en diversas realizaciones, la(s) glicosidasa(s) se formula(n) (por ejemplo, diluida(s)) para estar presente(s) como un monómero y/o dímero, con substancialmente ningún agregado mayor como se determina por cromatografía de exclusión por tamaño (SEC)

La(s) glicosidasa(s) pueden formularse como una formulación acuosa para administración sublingual. En algunas realizaciones, la formulación acuosa comprende solución salina. En algunas realizaciones, la formulación tiene la fuerza iónica de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 2% de la solución salina, tal como la fuerza iónica de aproximadamente 0,9% de la solución salina. En algunas realizaciones, la(s) glicosidasa(s) se formula(n) en solución salina normal (por ejemplo, aproximadamente 0,9% de solución salina). También se pueden emplear otros vehículos convencionales para la entrega sublingual. La(s) glicosidasa(s) puede(n) formularse adicionalmente con un conservante, que puede ser un conservante aromático o fenólico. Por ejemplo, el conservante en algunas realizaciones es fenol. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la neuraminidasa, opcionalmente con otras glicosidasas, se formula en 0,05 a 0,5% de fenol, o cantidades comparables de conservantes de acción similar, por ejemplo. En algunas realizaciones, la actividad de la neuraminidasa y potencialmente otras glicosidasas se incrementa por la presencia de fenol, tal como al menos 0,2%, 0,3%, o 0,4% de fenol. En algunas realizaciones, la neuraminidasa (por ejemplo, de Sigma Aldrich números de catálogo N2876, N3001, N5631, N2133) se incubaba en una solución que contiene de aproximadamente de 0,2% a aproximadamente a 1% de fenol (por ejemplo, de 0,2 a 0,6% de fenol, o aproximadamente 0,4% de fenol), y después se diluye o se lleva a la formulación final, que puede contener de 0,05% a aproximadamente 0,2% de fenol. En algunas realizaciones, dicha "activación" de la neuraminidasa permite que el agente activo se administre en dosis más bajas para evitar la orientación inmune, mientras se mantiene el nivel adecuado de actividad.

Para ilustración, la neuraminidasa y, opcionalmente, otra(s) enzima(s) glicosidasa, se pueden mezclar con solución salina al 0,9% y esterilizar por filtración, y dejar reposar a temperatura ambiente durante de 10 minutos a cinco horas (por ejemplo, aproximadamente 30 minutos a aproximadamente tres horas). Después de la incubación a temperatura ambiente, se añade solución salina fenólica para dar una concentración final de fenol de aproximadamente 0,1% en solución salina al 0,9%. La solución se almacena a 4 °C.

Alternativamente, la neuraminidasa y opcionalmente otra(s) enzima(s) glicosidasa se mezclan con aproximadamente 0,4% de solución salina fenólica. Esta solución se esteriliza por filtración y se deja reposar a temperatura ambiente durante de 5 minutos a aproximadamente 5 horas (por ejemplo, aproximadamente 30 minutos, aproximadamente una hora o aproximadamente tres horas). Después de la incubación a temperatura ambiente, la concentración final se lleva a aproximadamente 0,1% de fenol, 0,9% de solución salina. La solución se almacena a 4 °C.

La formulación de glicosidasa se administra por vía sublingual. En algunas realizaciones, la neuraminidasa se mantiene debajo de la lengua durante aproximadamente uno a aproximadamente cinco minutos, y preferiblemente durante aproximadamente 3, aproximadamente 4 o aproximadamente 5 minutos. El paciente debe abstenerse de hablar durante este tiempo. El paciente no debe comer ni beber dentro de los 15 minutos de la administración.

De acuerdo con los aspectos de la invención, los regímenes de enzima(s) de glicosidasa se administran en promedio de 2 a 6 veces por día durante al menos dos semanas o al menos un mes, especialmente para los inmunosuprimidos o avanzados casos. Las administraciones diarias deberían estar espaciadas sustancialmente de manera uniforme, pero en diversas realizaciones están espaciadas por aproximadamente 15 minutos a 5 horas. Por ejemplo, las dosis pueden estar separadas por aproximadamente 15 minutos, aproximadamente 30 minutos, aproximadamente 1 hora, aproximadamente 2 horas o aproximadamente 3 horas. Por ejemplo, la formulación de glicosidasa se puede administrar en promedio de 2 a 8 veces por día durante al menos aproximadamente dos meses, al menos aproximadamente cuatro meses o al menos aproximadamente cinco meses, o al menos aproximadamente seis meses. En algunas realizaciones, la formulación de glicosidasa se administra aproximadamente 2, aproximadamente 3 o aproximadamente 4 veces por día durante al menos un mes, dos meses, tres meses, cuatro meses, cinco meses o seis meses. Generalmente, la formulación de glicosidasa se administra a una dosis y frecuencia para ser efectiva en la reducción de la patología de la enfermedad infecciosa o en la estimulación del sistema inmune, sin mostrar indisposición o malestar articular prolongado sustancial. Cuando el paciente experimenta malestar articulares o generales, el paciente ajusta la dosis y/o frecuencia (por ejemplo, omite uno, dos o tres días de dosificación de

neuraminidasa, o reduce la dosis diaria en una o dos administraciones), hasta que el malestar disminuya o se normalice. Por lo tanto, el régimen de administración se suspende durante momentos de incomodidad articular en algunas realizaciones.

5 Por ejemplo, el primer día de tratamiento puede comenzar con aproximadamente ocho dosis, las primeras tres a cinco tomadas en la primera o dos horas, y el resto aproximadamente espaciado uniformemente durante todo el día. El paciente puede ser tratado después con aproximadamente cuatro dosis por día, con monitoreo periódico de la neoplasia maligna. Incluso cuando la neoplasia maligna es indetectable, el paciente puede seguir un régimen de 2 a 7 dosis por día, según se ajuste de vez en cuando en función de la aparición de indisposición o malestar en las articulaciones.

10 terapia puede iniciarse como se describe anteriormente. Sin embargo, en algunas realizaciones, el régimen de glicosidasa es una alternativa a estas terapias convencionales. En algunas realizaciones, el paciente se trata posteriormente de forma crónica con aproximadamente una dosis por día, durante al menos aproximadamente seis meses, o al menos aproximadamente un año, o al menos aproximadamente dos años, o al menos aproximadamente cinco años, o más, o es seleccionado o prescrito para dicho tratamiento crónico. Este tratamiento crónico posterior en algunas realizaciones es con la ausencia de quimioterapia u otra terapia para reducir la probabilidad de recurrencia o progresión de la enfermedad. El tratamiento crónico con glicosidasa, por ejemplo, para prevenir la recurrencia o recaída de la enfermedad, se puede administrar 1 o 2 veces por día.

15 En algunas realizaciones, el paciente recibe instrucciones de controlar la rigidez o malestar articular. Tales condiciones sugieren que el tratamiento con glicosidasa debe ajustarse. El ajuste puede incluir omitir uno o dos días o hasta una semana de dosificación, o alternativamente reducir la dosis en una o dos administraciones por día, hasta que los síntomas desaparezcan. Se podrían usar otros ensayos moleculares para el mismo efecto, aunque la rigidez o malestar en las articulaciones proporciona una facilidad para el cumplimiento del paciente. Por lo tanto, en el transcurso del régimen, la dosis de glicosidasa se puede ajustar fácilmente por paciente y, por lo tanto, mantenerse de forma crónica para una atención óptima.

25 Se describe además una composición farmacéutica que comprende un vehículo de administración para administrar una única dosis de glicosidasa a demanda, y donde el vehículo contiene un régimen de glicosidasa completo de al menos 50 dosis, o al menos 100 dosis, al menos 150 dosis, o al menos 200 dosis. Cada dosis de glicosidasa administrada es una cantidad de hasta aproximadamente 10^{-2} mg de glicosidasa e ingredientes farmacéuticamente inertes como ya se describió. La composición farmacéutica puede comprender al menos dos de neuraminidasa, galactosidasa, N-acetilgalactosaminidasa, fucosidasa, glicosidasa, N-acetilglucosaminidasa y manosidasa, y un excipiente farmacéuticamente aceptable. Por ejemplo, la composición puede comprender neuraminidasa y β -galactosidasa. Las glicosidasas pueden estar presentes, en conjunto, entre aproximadamente 10^{-3} mg a 10^{-8} mg. La composición está formulada para suministro sublingual.

30 En diversas realizaciones, el régimen de tratamiento implica la administración fraccionada de una cantidad que no exceda aproximadamente 10^{-3} mg de glicosidasa, aunque, en ciertos casos, la cantidad total de glicosidasa administrada en cualquier día puede exceder este límite.

35 En ciertas realizaciones, la composición de glicosidasa se administra a través de un aplicador de fármacos, comprendiendo el aplicador al menos 100 dosis de la composición, o al menos 150 dosis, o al menos 200 dosis. El aplicador es para suministro sublingual.

40 En algunas realizaciones, el aplicador suministra una dosis medida, que el paciente puede ajustar según sea necesario.

45 El aplicador dispensa preferiblemente dosis de una manera que mantiene condiciones asépticas de las dosis restantes. A modo de ejemplos no limitantes, el aplicador puede ser cualquiera de los que se describen en las patentes de EE. UU. 4,830,284; 4,565,302; 5,011,046; 5,147,087; 5,893,484; 6,877,672; 6,886,556 y 7,201,296. Por ejemplo, el aplicador puede ser una bomba atomizadora o dosificadora, que puede garantizar que el medio presente en el área entre el cilindro de la bomba y la abertura de descarga no se seque o no sea alterado por las influencias ambientales. Véase la patente de EE. UU. 4,830,284. En algunas realizaciones, el aplicador emplea un filtro de $0,2 \mu\text{m}$ para mantener contenidos asépticos. Además, el aplicador puede dispensar dosis en una descarga de un solo golpe. Dichos aplicadores se describen en la patente de EE. UU. 5,893,484. En algunas realizaciones, el aplicador permite un mecanismo de dosificación activable, que permite el monitoreo de dosis precisas y, por lo tanto, elimina en gran medida la dosificación incorrecta con respecto al número de dosis y/o la duración de la dosificación. Véase la patente de EE. UU. 4,565,302. En algunas realizaciones, el aplicador administra una dosis de 50 a 100 μl , tal como los aplicadores descritos en, por ejemplo, la patente de EE. UU. 6,886,556.

Ejemplos

55 Ejemplo 1: Efecto sobre la infectividad de VHS-1

Utilizando VHS-1 como virus modelo, se iniciaron estudios in vitro para determinar el efecto de la neuraminidasa y el complemento sobre la infectividad viral y la liberación de las células Vero. Para los estudios de infectividad, las

combinaciones de complemento, virus y neuraminidasa se incubaron juntas, después se añadieron a las células Vero y se incubaron adicionalmente. Después de la fijación y tinción celular, se contaron las placas formadoras de virus en las células. Los resultados mostraron que la incubación del virus con neuraminidasa y complemento juntos significativamente (70 - 80%) redujo la infectividad del virus de las células Vero en relación con los controles (figura 1).

Para los estudios de liberación viral, las células Vero se infectaron primero con VHS-1. Estas células fueron incubadas con diversas concentraciones de complemento y neuraminidasa. Los sobrenadantes de los cultivos celulares se ensayaron para determinar la capacidad de formación de placa, indicativa del virus liberado de las células. Los resultados mostraron que, en presencia de neuraminidasa y complemento, la liberación de virus libre disminuyó considerablemente (70 - 80%) relativo a los controles (figura 2). Estos resultados indican que una combinación de neuraminidasa y complemento redujo efectivamente tanto la infectividad de las células Vero por VHS-1 como la liberación de virus libre de las células preinfectadas.

Ejemplo 2: Efecto sobre la liberación de citoquinas

Se investigó el efecto de la neuraminidasa en la producción de ciertas citocinas in vitro. Las citocinas son mensajeros químicos secretados por los linfocitos activados en respuesta a la infección. Cualquier citocina dada, ya sea sola o en combinación con otras citocinas, puede tener múltiples efectos sobre la función inmune. La interleucina-2 (IL-2), el interferón alfa (IFN- α), el interferón gamma (IFN- γ) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) son citocinas importantes involucradas en la defensa del huésped contra los virus. IL-2, TNF- α e IFN- γ son producidos por el subconjunto T cooperadores (TH1) de células T y, por lo tanto, están asociados con el proceso inflamatorio. IL-2 e IFN- γ juntos activan los macrófagos, que son células inmunes importantes que engloban y digieren los patógenos (fagocitosis), y también sirven como células presentadoras de antígenos para los linfocitos T. IL-2 e IFN- γ también mejoran la citotoxicidad de las células asesinas naturales (NK) en la eliminación de células infectadas por virus. El IFN- γ también mejora la expresión de moléculas de clase I y II del complejo de histocompatibilidad principal (MHC) en las células presentadoras de antígeno, induciendo así a las células citolíticas CD4+ y CD8+ involucradas en la eliminación viral. IFN- γ también se combina con TNF- α para estimular las células NK. IFN- α inhibe la replicación viral al bloquear la transcripción de proteínas virales tempranas.

Estas citocinas se estudiaron in vitro utilizando sistemas celulares, condiciones de incubación y otros procedimientos apropiados para la producción y medición de las moléculas respectivas. Las muestras experimentales que contenían neuraminidasa se compararon con controles salinos. La figura 3 resume los resultados obtenidos cuando las células tratadas con neuraminidasa se ensayaron para la producción de IL-2, IFN- α , IFN- γ y TNF- α . La producción de las cuatro citocinas se estimuló usando la dosis terapéutica de neuraminidasa en relación con los controles respectivos. Es razonable esperar que las funciones de estas citocinas discutidas anteriormente podrían mejorarse con la neuraminidasa en un sistema in vivo, y tendrían efectos antivirales en los pacientes.

REIVINDICACIONES

1. Una composición de glicosidasa de señalización inmunológica para uso en el tratamiento de un paciente que tiene una infección viral crónica, en donde un régimen no agudo de dicha composición de glicosidasa de señalización inmunológica que comprende neuraminidasa NanI Clostridium perfringens, comprendiendo una secuencia de aminoácidos que es al menos 90% idéntica al banco de genes número de acceso EIA17977.1, debe administrarse por vía sublingual al paciente para tratar, mejorar, y/o manejar dicha infección.
2. La composición para el uso de la reivindicación 1, en donde la composición comprende además β -galactosidasa.
3. La composición para el uso de la reivindicación 1 o 2, en donde el paciente es VIH positivo, u opcionalmente en donde el paciente tiene SIDA.
4. La composición para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el paciente no está recibiendo quimioterapia antiviral, y/o el VIH es resistente a la terapia antiviral.
5. La composición para el uso de la reivindicación 3, en donde el régimen debe iniciarse después de la terapia antiviral para controlar el SIDA crónico.
6. La composición para el uso de la reivindicación 3, en donde la composición se debe administrar con terapia antiviral para revertir la trayectoria de la enfermedad.
7. La composición para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde el recuento de CD4 del paciente al comienzo de dicho régimen es inferior a 500.
8. La composición para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 7, en donde la carga viral al comienzo de dicho régimen es superior a 10000 por ml.
9. La composición para el uso de la reivindicación 1 o 2, en donde el paciente tiene una infección viral crónica seleccionada de una infección por el virus del herpes simple, infección por el virus varicela zoster, hepatitis A, B o C, infección por adenovirus o infección por el virus del papiloma humano, u opcionalmente en donde el paciente tiene herpes.
10. La composición para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde el régimen de glicosidasa comprende la administración de una o más de N-acetilgalactosidasa, fucosidasa, glucosidasa, N-acetilglucosaminidasa y manosidasa.
11. La composición para uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde la glicosidasa se debe administrar en promedio de 2 a 6 veces por día durante al menos un mes, u opcionalmente en donde la glicosidasa se debe administrar en promedio de 2 a 6 veces por día durante al menos dos meses, al menos cuatro meses o al menos seis meses.
12. La composición para uso de la reivindicación 11, en donde el paciente debe ser tratado posteriormente de forma crónica con aproximadamente una dosis por día, durante al menos seis meses, o al menos un año, o al menos dos años, o al menos cinco años, o más.

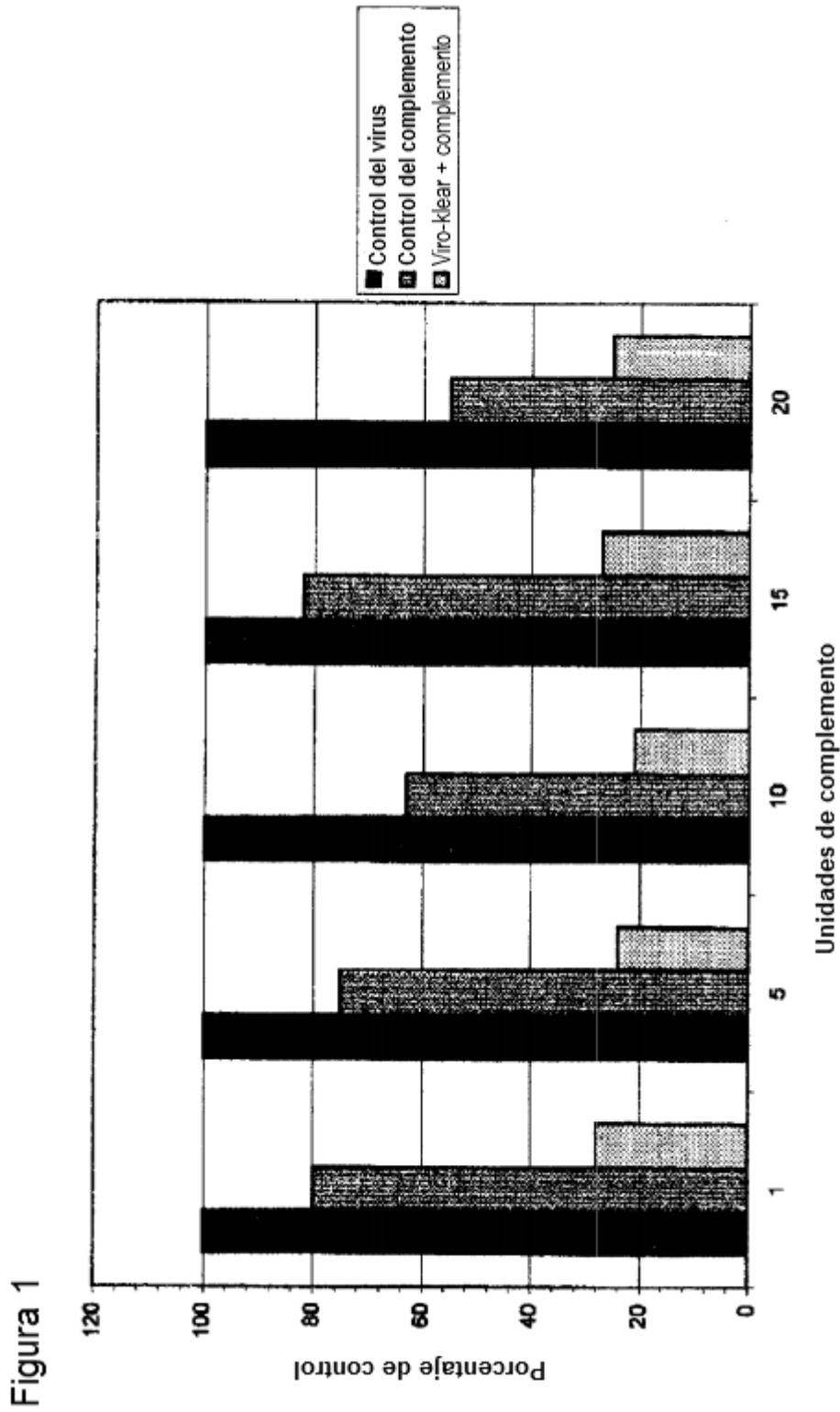


Figura 2

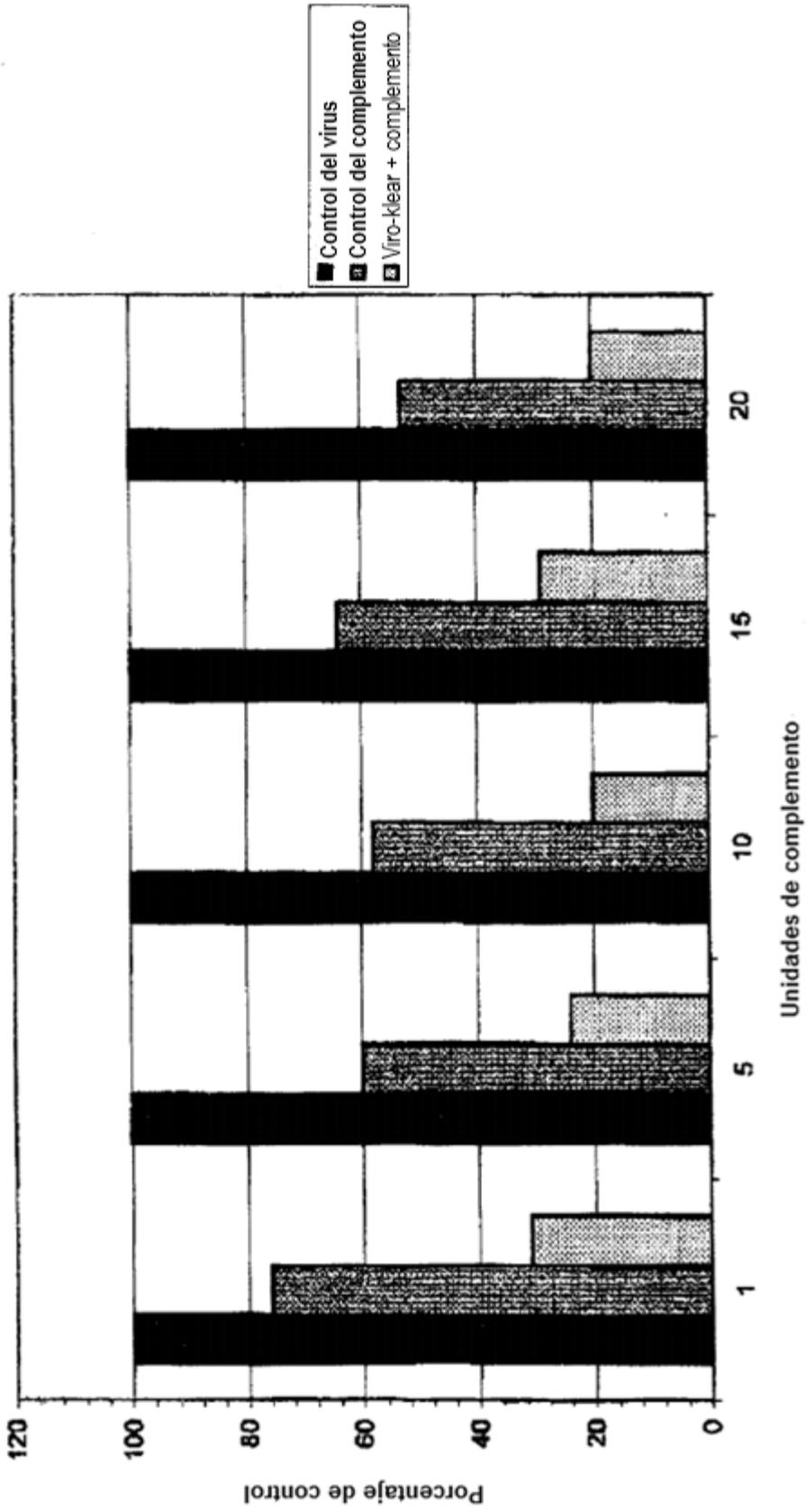


Figura 3

