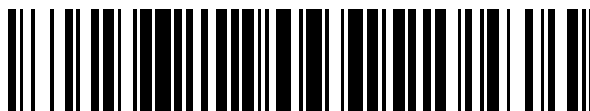


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 380 950**

51 Int. Cl.:  
**A61K 38/48** (2006.01)  
**A61P 37/06** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **06754207 .6**  
96 Fecha de presentación: **08.06.2006**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1901773**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **26.03.2008**

54 Título: **Uso de la proteinasa IdeS ( de S, pyogenes) para tratar enfermedades autoinmunitarias y rechazo de injerto**

30 Prioridad:  
**09.06.2005 GB 0511769**  
**22.03.2006 GB 0605781**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**21.05.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**21.05.2012**

73 Titular/es:  
**Hansa Medical AB**  
**P.O. Box 785**  
**220 07 Lund, SE**

72 Inventor/es:  
**BJÖRCK, Lars;**  
**HOLMDAHL, Rikard y**  
**NANDAKUMAR, Kutty Selva**

74 Agente/Representante:  
**Ungría López, Javier**

ES 2 380 950 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

Uso de la proteinasa IdeS (de *S. pyogenes*) para tratar enfermedades autoinmunitarias y rechazo de injerto

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere al tratamiento o prevención de enfermedades o afecciones medidas por anticuerpos IgG, tales como enfermedades autoinmunitarias, rechazo de trasplantes, tratamiento postoperatorio y hemofilia adquirida.

10

**Antecedentes de la invención**

La IdeS (enzima de degradación de inmunoglobulina G de *S. pyogenes*) es una cisteína proteasa extracelular producida por el patógeno humano *S. pyogenes*. Inicialmente la IdeS se aisló de una cepa de estreptococos del grupo A de serotipo M1, pero el gen *ides* se ha identificado ahora en todas las cepas de estreptococos del grupo A sometidas a ensayo. La IdeS tiene un grado extraordinariamente alto de especificidad de sustrato, siendo su único sustrato identificado la IgG. La IdeS cataliza una única escisión proteolítica en la región bisagra inferior de la IgG humana. Esta degradación proteolítica estimula la inhibición de la opsonofagocitosis e interfiere en la muerte de *Streptococcus* del grupo A. La IdeS también escinde algunas subclases de la IgG en varios animales y convierte de forma eficaz la IgG en fragmentos Fc y Fab. El gen *ides* ha sido clonado y expresado en *E. coli* como una proteína de fusión GST.

15

20

**Sumario de la invención**

25

Los presentes inventores han demostrado que la IdeS es útil en el tratamiento y prevención de enfermedades mediadas por anticuerpos IgG. En particular, los inventores han demostrado que la IdeS se puede usar para tratar la artritis reumatoide (AR). La administración de IdeS a ratones con artritis reumatoide inducida no tuvo ningún efecto tóxico observable y previno completamente el desarrollo de artritis reumatoide. Además, los inventores han demostrado que el efecto de la IdeS es altamente potente y que la IdeS tiene efectos locales.

30

De acuerdo con la presente invención se proporciona el uso de un polipéptido IdeS, o un polinucleótido que codifica un polipéptido IdeS, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o prevención de una enfermedad o afección mediada por anticuerpos IgG como se define en la reivindicación 1.

35

La presente invención también proporciona:

- un polipéptido IdeS, o un polinucleótido que codifica un polipéptido IdeS, para usar en un procedimiento de tratar o prevenir una enfermedad o afección mediada por anticuerpos IgG como se define en la reivindicación 1;
- y
- un procedimiento de tratar, *ex vivo*, sangre extraída de un paciente que sufre una enfermedad o afección mediada por anticuerpos IgG, que comprende poner en contacto la sangre con un polipéptido IdeS.

40

**Breve descripción de las figuras**

45

La Figura 1 muestra la incidencia (a) y la gravedad (b) de la artritis en ratones que reciben IdeS y ratones control. El tiempo 0 es la inyección de anticuerpos anti-CII. Se inyectó a los ratones IdeS (0,950 mg/ratón/i.v.) en PBS 3 horas antes (n= 5) o después (n= 5) de la transferencia de anticuerpo o sin ningún tratamiento (n= 6). El día 5 se inyectó LPS (25 µg/ratón/i.p.) en todos los ratones. Se monitorizó a los ratones para detectar desarrollo de artritis diariamente durante 15 días. Todos los ratones se usaron para los cálculos, n indica el número de ratones usados en los experimentos. Se extrajo suero y se retiraron las patas de los animales.

50

La Figura 2 muestra secciones histopatológicas de patas tomadas de los ratones control (a y c) y ratones tratados con IdeS como se describe para la Figura 1 (b y d). Las patas de ratón se recogieron el día 15 del experimento. Las patas traseras se fijaron en solución al 4 % de paraformaldehído tamponado con fosfato (pH 7,4) a 4 °C durante 24 horas, se descalcificaron durante 4 semanas en una solución de ácido etilendiaminotetraacético que contiene polivinilpirrolidona y Tris 0,1M (pH 6,95), se deshidrataron y se incluyeron en parafina. Secciones de 6 µm se tiñeron con hematoxilina y eosina. Los resultados mostrados son representativos de los obtenidos de los ratones de cada grupo. Los aumentos originales fueron x 20.

55

La Figura 3 muestra la incidencia (a) y la gravedad (b) de la artritis en ratones que reciben varias dosis de IdeS y ratones control. En grupos de ratones B10.RII macho de cuatro meses de edad se inyectó i.v. 9 mg de anticuerpos monoclonales específicos de CII, M2139 y CIIC1, a 0 horas el día 0. Tras 3 horas, el mismo día se inyectó i.v. 0 µg (n= 7), 10 µg (n= 5), 100 µg (n= 5) y 1000 µg (n= 5) de IdeS en PBS. El día 5, todos los ratones recibieron LPS (25 µg/i.p.). n indica el número de ratones en cada grupo. Las barras de error indican la media ± SEM. Se incluyó a todos los ratones para los cálculos.

60

La Figura 4 muestra la incidencia (a) y la gravedad (b) de la artritis en ratones que reciben IdeS sistémica y localmente y ratones control. En grupos de ratones B10.RIII se transfirió i.v. 9 mg de un cóctel de anticuerpo

65

monoclonal IgG2a anti-CII artritogénico. Se trató a los ratones con 100 µg de IdeS sistémicamente (i.v.) (n=4) o localmente (pata izquierda o derecha). A los ratones tratados localmente se administró IdeS 3 horas después de la transferencia del anticuerpo anti-CII (n= 6) o 3 y 24 horas después de la transferencia del anticuerpo anti-CII (n= 6).

5

#### Breve descripción de las secuencias

La SEC ID N° 1 es una secuencia de aminoácidos que codifica la IdeS aislada de *S. pyogenes* AP1.

10 La SEC ID N° 2 es una secuencia de aminoácidos que codifica la IdeS aislada de *S. pyogenes* AP1, que incluye una secuencia señal putativa.

La SEC ID N° 3 es una secuencia de ácido nucleico que codifica la IdeS aislada de *S. pyogenes* AP1, (que incluye una secuencia señal).

15

La SEC ID N° 4 es un cebador Ide1 para PCR.

La SEC ID N° 5 es un cebador Ide2 para PCR.

20 La SEC ID N° 6 es un cebador Ide5x para PCR.

La SEC ID N° 7 es un cebador Ide3x para PCR.

La SEC ID N° 8 es la secuencia de aminoácidos en N terminal de un producto de escisión de IgG humana con IdeS.

25

#### Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona un polipéptido IdeS o un polinucleótido que codifica un polipéptido IdeS para usar en un procedimiento para tratar o prevenir enfermedades o afecciones mediadas por anticuerpos IgG como se define en la reivindicación 1.

30

#### Polipéptidos

El polipéptido IdeS es, preferentemente, IdeS de *S. pyogenes*, o variantes o fragmentos de IdeS de *S. pyogenes* que conserven la actividad de cisteína proteasa. La variante puede ser un polipéptido IdeS de otro organismo, tal como otra bacteria. Preferentemente, la bacteria es un *Streptococcus*. El *Streptococcus* es, preferentemente, un *Streptococcus* del grupo A, un *Streptococcus* del grupo C o un *Streptococcus* del grupo G. En concreto, la variante puede ser un polipéptido IdeS de un *Streptococcus* del grupo C, tal como *S. equii* o *S. zooepidemicus*. Como alternativa, la variante puede proceder de *Pseudomonas putida*.

35

40

El polipéptido IdeS puede comprender:

(a) la secuencia de ácido nucleico de SEC ID N° 1;

(b) una variante del mismo que tenga una identidad de al menos el 50 % con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 1 y que tenga actividad de cisteína proteasa de IgG; o

(c) un fragmento de cualquiera de ellos que tenga actividad de cisteína proteasa de IgG.

45

Preferentemente, el polipéptido comprende, o consiste en, la secuencia de SEC ID N° 1. Adicionalmente, el polipéptido puede incluir una secuencia señal. De acuerdo con esto, el polipéptido IdeS puede comprender:

50

(a) la secuencia de ácido nucleico de SEC ID N° 2;

(b) una variante del mismo que tenga una identidad de al menos el 50 % con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 2 y que tenga actividad de cisteína proteasa de IgG; o

(c) un fragmento de cualquiera de ellos que tenga actividad de cisteína proteasa de IgG.

55

El polipéptido IdeS puede consistir en, la secuencia mostrada en la SEC ID N° 2.

Polipéptidos variantes son aquéllos para los que la secuencia de aminoácidos varía de la observada en la SEC ID N° 1 o la SEC ID N° 2, pero que conservan el mismo carácter esencial o funcionalidad básica que IdeS. Los polipéptidos variantes pueden mostrar actividad cisteína proteasa de IgG. Normalmente, los polipéptidos con una identidad superior a aproximadamente 50%,55% o 65%, preferentemente de al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 90 % y particularmente preferentemente de al menos 95 %, al menos 97 % o al menos 99 %, con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 1 o la SEC ID N° 2 se consideran variantes de la proteína. Dichas variantes pueden incluir variantes alélicas y la delección, modificación o adición de aminoácidos únicos o grupos de aminoácidos dentro de la secuencia proteica, siempre que el péptido mantenga la funcionalidad básica de IdeS. La identidad de las variantes de la SEC ID N° 1 o la SEC ID N° 2 se puede medir en una región a al menos 50, al

60

65

menos 75, al menos 100, al menos 150, al menos 200, al menos 250, al menos 275, al menos 300 o más aminoácidos contiguos de la secuencia mostrada en la SEC ID N° 1 o la SEC ID N° 2 o, más preferentemente, sobre la longitud completa de la SEC ID N° 1 o la SEC ID N° 2.

5 Las variantes de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 1 o la SEC ID N° 2 contienen, preferentemente, residuos Lys-55 y/o Cys-65 y/o His-233 y/o Asp-255 y/o Asp-257 de la SEC ID N° 1 (que corresponden a Lys-84, Cys-94, His-262, Asp-284 y Asp-286 de la SEC ID N° 2, respectivamente). Más preferentemente, la variante de la SEC ID N° 1 o la SEC ID N° 2 contiene cada uno de los residuos Lys-55, Cys-65, His-233, Asp-255 y Asp-257 de la SEC ID N° 1 (que corresponden a Lys-84, Cys-94, His-262, Asp-284 y Asp-286 de la SEC ID N° 2, respectivamente).

10 La identidad de los aminoácidos se puede calcular usando cualquier algoritmo adecuado. Por ejemplo, el paquete UWGCG proporciona el programa BESTFIT, que se puede usar para calcular la homología (por ejemplo usada en sus parámetros por defecto) (Devereux y col. (1984) Nucleic Acids Research 12, 387-395). Los algoritmos PILEUP y BLAST se pueden usar para calcular la homología o secuencias alineadas (tal como identificar secuencias equivalentes o correspondientes (normalmente en sus parámetros predeterminados), por ejemplo como se ha descrito en Altschul S. F. (1993) J Mol Evol 36:290-300; Altschul, S, F y col. (1990) J Mol Biol 215:403-10.

15 El software para realizar análisis BLAST está a disposición del público en el National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Este algoritmo implica identificar primero pares de secuencia de alta puntuación (HSP) identificando palabras cortas de longitud W en la secuencia problema que coinciden o satisfacen alguna puntuación T umbral de valor positivo cuando se alinea con una palabra de la misma longitud en una secuencia de la base de datos. T es el umbral de la puntuación de la palabra vecina (Altschul y col., anteriormente). Estas coincidencias de la palabra vecina inicial actúan como semillas para iniciar las búsquedas para encontrar los HSP que las contienen. Las coincidencias con la palabra se extienden en ambas direcciones a lo largo de cada secuencia todo lo que la puntuación de la alineación acumulada se pueda incrementar. Las extensiones para las coincidencias de la palabra en cada dirección se detienen cuando: la puntuación de la alineación acumulada se salga de la cantidad X a partir de su valor máximo alcanzado; la puntuación acumulada llega a cero o menor, debido a la acumulación de una o más alineaciones de residuos que puntúan negativo; o se alcanza el final de cualquiera de las secuencias. Los parámetros del algoritmo BLAST W, T y X determinan la sensibilidad y la velocidad de la alineación. El programa BLAST usa como valores predeterminados una longitud de palabra (W) de 11, las alineaciones (B) de la matriz de puntuación BLOSUM62 de 50 (véase Henikoff y Henikoff (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: expectativa (E) de 10, M= 5, N= 4, y una comparación de ambas hebras.

20 El algoritmo BLAST realiza un análisis estadístico de la similitud entre dos secuencias (véase, p. ej., , Karlin y Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5787). Natl. Acad. Sci. USA 90: 5873-5787. Una medida de la similitud proporcionada por el algoritmo BLAST es la menor probabilidad de la suma ((P(N)), que proporciona una indicación de la probabilidad de que se produzca al azar una coincidencia entre dos secuencias de nucleótidos o de aminoácidos. Por ejemplo, una secuencia se considera similar a otra secuencia si la menor probabilidad de la suma en una comparación de la primera secuencia con la segunda secuencia es inferior a aproximadamente 1, preferentemente inferior a aproximadamente 0,1 más preferentemente inferior a aproximadamente 0,01 y, más preferentemente, inferior a aproximadamente 0,001.

25 Las secuencias de la variante normalmente difieren en al menos 1, 2, 5, 10, 20, 30, 50 o más mutaciones (que pueden ser sustituciones, deleciones o inserciones de aminoácidos). Por ejemplo, se pueden efectuar de 1 a 50, de 2 a 30, de 3 a 20 o de 5 a 10 sustituciones, deleciones o inserciones de aminoácidos. Generalmente, el polipéptido modificado conserva actividad como cisteína proteasa específica de IgG. Preferentemente, las sustituciones son sustituciones conservadoras, por ejemplo de acuerdo con la tabla siguiente. Los aminoácidos del mismo bloque en la segunda columna y, preferentemente en la misma línea en la tercera columna, pueden sustituirse entre sí:

ALIFÁTICO	No polar	G A P
		I L V
	Polar sin carga	C S T M
		N Q
	Polar con carga	D E
		K R
AROMÁTICO		H F W Y

30 Es posible proporcionar mutantes de IdeS en los que la mutación del dominio catalítico elimine la actividad de cisteína proteasa de la proteína. Dicha mutante puede comprender la sustitución o deleción del residuo de cisteína catalítica en la posición 65 de la SEC ID N° 1 (posición 94 de la SEC ID N° 2). Por ejemplo, la cisteína se puede sustituir con glicina. La invención también se refiere a variantes de fragmentos de tal IdeS mutada, pero que mantengan la función de IdeS mostrando la actividad de cisteína proteasa de IgG.

55

Preferentemente, los polipéptidos comprenden un residuo de cisteína y un residuo de histidina con una espaciación habitual en las cisteína proteasas. Por ejemplo, en la SEC ID N° 1, estos residuos se encuentran con una espaciación de aproximadamente 130 aminoácidos, como habitualmente se encuentra en las cisteína proteasas.

5 El fragmento del polipéptido IdeS usado en la invención normalmente es de al menos 10, por ejemplo de al menos 15, 20, 25, 30, 40, 50 o más aminoácidos de longitud, hasta 100, 150, 200, 250 o 300 aminoácidos de longitud, siempre que conserve la actividad de cisteína proteasa de IgG de IdeS. Preferentemente, el fragmento del polipéptido IdeS usado en la invención abarca los residuos Lys-55 y/o Cys-65 y/o His-233 y/o Asp-255 y/o Asp-257 de la SEC ID N° 1 (que corresponden a Lys-84, Cys94, His-262, Asp-284 y Asp-286 de la SEC ID N° 2, respectivamente). Más preferentemente, el fragmento abarca cada uno de los residuos Lys-55, Cys-65, His-233, Asp-255 y Asp-257 de la SEC ID N° 1 (que corresponden a Lys-84, Cys-94, His-262, Asp-284 y Asp-286 de la SEC ID N° 2, respectivamente).

15 Los polipéptidos usados en la invención pueden estar químicamente modificados, por ejemplo modificados postraduccionalmente. Por ejemplo, pueden estar glicosilados, fosforilados o comprender residuos de aminoácidos modificados. Pueden modificarse mediante la adición de residuos de histidina para ayudar a su purificación o mediante la adición de una secuencia señal para estimular la inserción en la membrana celular. Dichos polipéptidos modificados entran dentro del alcance del término "polipéptido" usado en el presente documento.

20 Normalmente, los polipéptidos para usar de acuerdo con la invención muestran actividad de cisteína proteasa de inmunoglobulina y, en particular, actividad de cisteína proteasa de IgG. Preferentemente, el polipéptido escinde la IgG en la región bisagra y, más particularmente, en la región bisagra de la cadena pesada. Preferentemente, la escisión tiene como resultado la producción de fragmentos Fc y Fab de la IgG. Preferentemente, la actividad es específica de la IgG. La cisteína proteasa puede determinarse por medio de un ensayo adecuado. Por ejemplo, un polipéptido de ensayo se puede incubar con IgG a una temperatura adecuada, tal como a 37 °C. Los materiales de partida y los productos de reacción pueden analizarse mediante SDS-PAGE para determinar si está presente el producto de la escisión de la IgG deseado. Normalmente, este producto de la escisión es un fragmento de 31 kDa. Normalmente no hay degradación adicional de IgG tras esta primera escisión. El producto de la escisión puede someterse a secuenciación N-terminal para verificar que la escisión se ha producido en la región bisagra de la IgG. Preferentemente, la secuencia en N-terminal comprende la secuencia en la SEC ID N° 8.

La actividad cisteína proteasa de los polipéptidos puede caracterizarse adicionalmente mediante estudios de inhibición. Preferentemente, la actividad es inhibida por el péptido derivado Z-LVG-CHN<sub>2</sub> y/o mediante ácido yodoacético, ambos inhibidores de proteasa. No obstante, generalmente la actividad no se ve inhibida por E64.

35 La actividad cisteína proteasa de los polipéptidos es, generalmente, específica de IgG en cuanto a que los polipéptidos pueden no degradar las otras clases de Ig, es decir IgM, IgA, IgD e IgE, cuando se incuban con estas inmunoglobulinas en condiciones que permitan la escisión de IgG. El polipéptido IdeS es capaz de escindir las moléculas de IgG presentes en el sujeto que se va a tratar. Por tanto, cuando el sujeto es un ser humano, el polipéptido IdeS es capaz de escindir la IgG humana. En realizaciones preferidas, el polipéptido tiene la capacidad de escindir la IgG humana, de conejo, de ratón o de cabra.

45 Los polipéptidos para usar en la invención pueden estar en una forma sustancialmente aislada. Se entenderá que el polipéptido se puede mezclar con vehículos o diluyentes que no interfieran en el objetivo previsto del polipéptido y seguir considerándose sustancialmente aislado. Un polipéptido para usar en la invención también puede estar en una forma sustancialmente purificada, en cuyo caso generalmente comprenderá el polipéptido en una preparación en la que más del 50 %, por ejemplo más del 80 %, 90 %, 95 % o 99 % en peso del polipéptido en la preparación es un polipéptido de la invención.

50 Los polipéptidos para usar en la presente invención se pueden aislar de cualquier organismo adecuado que exprese un polipéptido IdeS. Normalmente, el polipéptido IdeS se aísla de cepas adecuadas de *S. pyogenes* que expresan IdeS. Organismos y cepas adecuadas se pueden identificar mediante numerosas técnicas. Por ejemplo, inicialmente se pueden analizar cepas de *S. pyogenes* para determinar la presencia de un gen *ides*. Los cebadores o sondas polinucleotídicas se pueden diseñar en base a, por ejemplo, las SEC ID N° 1, 2 o 3. Ejemplos de cebadores adecuados se indican en las SEC ID N° 4, 5, 6 y 7. La presencia del gen *ides* puede verificarse mediante PCR usando los cebadores o mediante hibridación de las sondas al ADN genómico de la cepa de *S. pyogenes*.

60 Las cepas de *S. pyogenes* que expresan IdeS activa se pueden identificar analizando la actividad de cisteína proteasa de IgG en el sobrenadante del cultivo. Preferentemente, se añade inhibidor E64 al sobrenadante para inhibir cualquier actividad de cisteína proteasa de SpeB. Al menos cinco cepas expresan IdeS activa: Las cepas AP1, AP12, AP55, KTL3 y SF370. Preferentemente, la cepa que expresa se selecciona de AP1, AP12 y AP55.

65 Normalmente, el aislamiento y purificación de IdeS de un cultivo de *S. pyogenes* de expresión o de cultivos de otras células que expresan IdeS se realizan en base a la actividad de cisteína proteasa de IgG. Preferentemente, el procedimiento de purificación implica una etapa de precipitación de sulfato amónico y una etapa de cromatografía de intercambio iónico. De acuerdo con un procedimiento, el medio de cultivo se fracciona añadiendo cantidades

crecientes de sulfato amónico. Las cantidades de sulfato amónico pueden ser de 10 a 80 %. Preferentemente, el medio de cultivo se fracciona co 50 % de sulfato amónico y el sobrenadante resultante se precipita además con 70 % de sulfato amónico. Después, los polipéptidos sedimentados se pueden someter a cromatografía de intercambio iónico, por ejemplo mediante FPLC en una columna Mono Q. Las fracciones eluidas se pueden analizar para determinar la actividad de cisteína proteasa de IgG y se pueden combinar las fracciones de actividad máxima. Las fracciones se pueden analizar mediante SDS-PAGE. Por ejemplo, de la banda proteína de SDS-PAGE se puede obtener una secuencia en N-terminal. Las fracciones se pueden almacenar a -20°C.

Los polipéptidos para usar en la invención también se pueden preparar como fragmentos de dichos polipéptidos aislados. Además, los polipéptidos IdeS pueden también fabricarse sintéticamente o por medios recombinantes. Por ejemplo, un polipéptido IdeS recombinante se puede producir transfeccionando células de mamífero en cultivo con un vector de expresión que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido ligado operablemente a secuencias control adecuadas, cultivar las células, extraer y purificar el polipéptido IdeS producido por las células.

La secuencia aminoacídica de los polipéptidos para usar en la invención pueden modificarse para que incluyan aminoácidos no naturales o para incrementar la estabilidad del compuesto. Cuando los polipéptidos se producen por medios sintéticos, dichos aminoácidos se pueden introducir durante la producción. Además, los polipéptidos se pueden modificar mediante producción sintética o recombinante.

Los polipéptidos para usar en la invención también se pueden producir usando O-aminoácidos. En dichos casos, los aminoácidos se unirán en secuencia inversa en orientación de C a N. Esto es convencional en la técnica para producir dichos polipéptidos.

En la técnica se conoce una serie de modificaciones de cadenas laterales y se pueden aplicar a las cadenas laterales de los polipéptidos IdeS, siempre que los polipéptidos conserven la actividad de cisteína proteasa de IgG.

#### Polinucleótidos

Un polinucleótido que codifica un polipéptido o variante de IdeS se puede usar para tratar o prevenir una enfermedad o afección mediada por antibióticos IgG patogénicas. En concreto, el polinucleótido puede comprender o constar de: (a) la secuencia de codificación de SEC ID N° 3; (b) una secuencia que es degenerada como resultado del código genérico de la secuencia como se define en (a); (c) una secuencia que tiene una identidad de al menos 60 % con una secuencia como se define en (a) o (b) y que codifica un polipéptido que tiene actividad de cisteína proteasa de IgG; o (d) un fragmento de una cualquier de las secuencias como se define en (a), (b) o (c) que codifica un polipéptido que tiene actividad de cisteína proteasa de IgG.

Normalmente, el polinucleótido es ADN. No obstante, el polinucleótido puede ser un polinucleótido de ARN. El polinucleótido puede ser mono o bicatenario y puede incluir en su interior nucleótidos sintéticos o modificados.

Un polinucleótido descrito en el presente documento puede hibridar normalmente con la secuencia de codificación o el complemento de la secuencia de codificación de SEC ID N° 3 a un nivel significativamente por encima del inicial. La hibridación inicial se puede producir por, por ejemplo, los demás ADN presentes en una biblioteca de ADN. El nivel de señal generado por la interacción entre un polinucleótido de la invención y la secuencia de codificación o complemento de la secuencia de codificación de SEC ID N° 3 es, normalmente, al menos 10 veces, preferentemente al menos 100 veces, tan intensa como las interacciones entre otros polinucleótidos y la secuencia de codificación de SEC ID N° 3. La intensidad de la interacción se puede medir mediante, por ejemplo, radiomarcaje de la sonda, por ejemplo con <sup>32</sup>P. Normalmente, la hibridación selectiva se puede conseguir usando condiciones de rigurosidad de media a alta. No obstante, dicha hibridación se puede llevar a cabo en cualquier condición adecuada conocida en la técnica (véase Sambrook y col., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 1989). Por ejemplo, si se requiere rigurosidad alta, las condiciones adecuadas incluyen de 0,1 a 0,2 x SSC a 60 °C hasta 65 °C. Si se requiere rigurosidad menos, las condiciones adecuadas incluyen 2 x SSC a 60 °C.

La secuencia de codificación de SEC ID N° 3 se puede modificar mediante sustituciones nucleotídicas, por ejemplo de 1, 2 o 3 a 10, 25, 50 o 100 sustituciones. El polinucleótido de SEC ID N° 3 puede modificarse, alternativa o adicionalmente, mediante una o más inserciones y/o deleciones y/o mediante una extensión en uno o los dos extremos. También se pueden incluir secuencias adicionales, tales como secuencias señal. El polipéptido modificado generalmente codifica un polipéptido que tiene actividad cisteína proteasa específica de IgG. Se pueden realizar sustituciones degeneradas y/o sustituciones que tengan como resultado una sustitución conservadora de aminoácido cuando la secuencia modificada se traduce, por ejemplo como se ha mostrado en la tabla anterior.

Una secuencia de nucleótidos que puede hibridar selectivamente con la complementaria de la secuencia de codificación de ADN de SEC ID N° 3 tendrá, generalmente, una identidad de secuencia de al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 98 % o al menos 99 % con la secuencia de codificación de la SEC ID N° 3 sobre una región de al menos 20, preferentemente al menos 30, por ejemplo al menos 40, al menos 60, más preferentemente al menos 100 nucleótidos contiguos o, más preferentemente, sobre la

longitud completa de la SEC ID N° 3 o la longitud de la SEC ID N° 3 que codifica un polipéptido que tiene la secuencia mostrada en la SEC ID N° 1. La identidad de la secuencia se puede determinar mediante cualquier procedimiento adecuado, por ejemplo como se ha descrito anteriormente.

5 Cualquier combinación de los grados de identidad de secuencia mencionados anteriormente y los tamaños mínimos se puede usar para definir polinucleótidos de la invención, siendo preferidas las combinaciones más rigurosas (es decir, identidad de secuencia mayor sobre longitudes más largas). Por tanto, por ejemplo, un polinucleótido que tiene una identidad de secuencia de al menos 90 % sobre 20, preferentemente sobre 30 nucleótidos forma un aspecto de la invención, como lo hace un polinucleótido que tiene una identidad de secuencia de al menos 95 %  
10 sobre 40 nucleótidos.

Los fragmentos polinucleotídicos tendrán una longitud de al menos 10, preferentemente al menos 15 o al menos 20, por ejemplo al menos 25, al menos 30 o al menos 40 nucleótidos. Normalmente tendrán una longitud de hasta 40, 50, 60, 70, 100 o 150 nucleótidos. Los fragmentos pueden tener una longitud mayor de 150 nucleótidos, por ejemplo  
15 una longitud de hasta 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 o 1000 nucleótidos o de incluso hasta unos pocos nucleótidos, tales como cinco, diez o quince, aparte de la secuencia de codificación de SEC ID N° 3.

Los polinucleótidos para usar en la invención se pueden producir de forma recombinante, sintética o por cualquier medio disponible para los expertos en la técnica. También se pueden clonar mediante técnicas estándar. Los  
20 polinucleótidos se proporcionan, habitualmente, en forma aislada y/o purificada.

En general, los polinucleótidos cortos se producirán por medios sintéticos que implican una fabricación escalonada de la secuencia de ácido nucleico deseada de uno en un nucleótido. Las técnicas para conseguir esto usando técnicas automáticas están fácilmente disponibles en la técnica.  
25

Los polinucleótidos más largos se producirán, generalmente, usando medios recombinantes, por ejemplo usando técnicas de clonación por PCR (reacción en cadena de la polimerasa). Esto implicará fabricar un par de cebadores (p. ej., de aproximadamente 15-30 nucleótidos) para una región del gen ides que se desea clonar, poniendo los  
30 cebadores en contacto con el ADN obtenido de una célula bacteriana, realizando una reacción en cadena de la polimerasa en condiciones que efectúen la amplificación de la región deseada, aislando el fragmento amplificado (p. ej., mediante purificación de la mezcla de reacción en gel de agarosa) y recuperando el ADN amplificado. Los cebadores se pueden diseñar para contener sitios de reconocimiento de enzimas de restricción adecuados de modo que el ADN amplificado se pueda clonar en un vector de clonación adecuado. Los cebadores adecuados son, por ejemplo, los de las SEC ID N° 4, 5, 6 ó 7.  
35

Dichas técnicas se pueden usar para obtener todo o parte de la secuencia del gen *ides* descrita en el presente documento. Aunque en general, las técnicas mencionadas en el presente documento son bien conocidas en la técnica, se puede hacer referencia a, en concreto, Sambrook y col. (1989).  
40

Los polinucleótidos IdeS como se describe en el presente documento tienen utilidad en la producción de los polipéptidos para usar en la presente invención, que puede tener lugar *in vitro*, *in vivo* o *ex vivo*. Los polinucleótidos se pueden usar como agentes terapéuticos propiamente dichos o pueden participar en la síntesis de proteínas recombinante.  
45

Los polinucleótidos para usar en la invención normalmente se incorporan en un vector recombinante replicable. El vector se puede usar para replicar el ácido nucleico en una célula huésped compatible. Por tanto, los polinucleótidos para usar en la invención se pueden fabricar introduciendo un polinucleótido IdeS en un vector replicable, introduciendo el vector en una célula huésped compatible y cultivando la célula huésped en condiciones que produzcan la replicación del vector.  
50

Preferentemente, el vector es un vector de expresión que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido IdeS. Dichos vectores de expresión se construyen de forma rutinaria en la técnica de la biología molecular y pueden implicar, por ejemplo, le uso de ADN plasmídico y de iniciadores, promotores, potenciadores adecuados, además de otros elementos, tales como, por ejemplo, señales de poliadenilación que pueden ser  
55 necesarias y que están en la orientación correcta con el fin de permitir la expresión de proteínas. Otros vectores adecuados serán evidentes para los expertos en la técnica. A modo de ejemplo adicional, a este respecto los inventores remiten a Sambrook y col. (1989).

Preferentemente, un polinucleótido para usar en la invención, o para usar en la invención en un vector, está unido de forma operable a una secuencia control que puede proporcionar la expresión de la secuencia codificadora por la célula huésped, es decir el vector es un vector de expresión. La expresión "operablemente unido" se refiere a una yuxtaposición en la que los componentes descritos están en una relación que les permite funcionar en el modo previsto. Una secuencia reguladora, tal como un "promotor", "operablemente unida" a una secuencia codificadora está colocada de tal modo que se consigue la expresión de la secuencia codificadora en condiciones compatibles  
60 con las secuencias reguladoras.  
65

Los vectores pueden ser, por ejemplo, vectores plásmidos, virus o fagos provistos de un origen de replicación, opcionalmente un promotor para la expresión de dicho polinucleótido y opcionalmente un regulador del promotor. Normalmente el vector está adaptado para su uso *in vivo*.

5 Los promotores y otras señales de regulación de la expresión pueden seleccionarse de modo que sean compatibles con la célula huésped para la que se ha diseñado su expresión. Se pueden usar promotores de mamífero, tales como promotores de acción  $\beta$ . Especialmente preferidos son los promotores específicos de tejido. También se pueden usar promotores virales, por ejemplo la repetición terminal larga del virus de la leucemia murina Moloney (MMLV LTR), el promotor LTR del virus de sarcoma de rous (RSV), el promotor de SV40, el promotor IE del citomegalovirus humano (CMV), adenovirus, promotores de HSV (tales como los promotores IE de HSV) o  
10 promotores de HPV, particularmente la región reguladora en 5' de HPV (URRR). Los promotores virales se conocen fácilmente en la técnica.

El vector puede además incluir secuencias que flanquean al polinucleótido que da lugar a los polinucleótidos que comprenden secuencias homólogas a las secuencias genómicas eucariotas, preferentemente secuencias genómicas de mamífero. Esto permitirá la introducción de los polinucleótidos de la invención en el genoma de células eucariotas mediante recombinación homóloga. En concreto, un vector plasmídico que comprende el casete de expresión flanqueado por secuencias virales se puede usar para preparar un vector viral adecuado para liberar los polinucleótidos de la invención en una célula de mamífero. Otros ejemplos de vectores virales adecuados  
15 incluyen vectores del virus del herpes simple y retrovirus, incluidos lentivirus, adenovirus, virus adenoasociados y virus de VPH. Las técnicas de transferencia de genes usando estos virus son conocidas para los expertos en la técnica. Los vectores de retrovirus, por ejemplo, se pueden usar para integrar de forma estable el polinucleótido dando lugar al polinucleótido en el genoma del huésped. Por el contrario, los vectores de adenovirus defectivos en la replicación permanecen episomales y, por tanto, permiten la expresión temporal.

25 Enfermedades y afecciones

El polipéptido, o polinucleótido, IdeS, se puede usar para tratar o prevenir enfermedades o afecciones mediadas por anticuerpos IgG patogénicos como se define en la reivindicación 1. Es bien conocido en la técnica que los anticuerpos IgG patogénicos participan en la patogenia de una serie de diferentes enfermedades y afecciones. Los presentes inventores han descubierto que el papel de los anticuerpos IgG patogénicos en dichas enfermedades pueden inhibirse usando un polipéptido o polinucleótido IdeS.

La enfermedad o afección puede ser una enfermedad autoinmunitaria. Dichas enfermedades incluyen enfermedad de Addison, alopecia areata, espondilitis anquilosante, síndrome antifosfolípidos, anemia aplásica, gastritis autoinmunitaria, hipoacusia autoinmunitaria, anemias hemolíticas autoinmunitarias, hepatitis autoinmunitaria, hipoparatiroidismo autoinmunitario, hipofisitis autoinmunitaria, enfermedad del oído interno autoinmunitaria, síndrome linfoproliferativo autoinmunitario, miocarditis autoinmunitaria, ooforitis autoinmunitaria, orquitis autoinmunitaria, poliendocrinopatía autoinmunitaria, enfermedad de Behcet, penfigoide ampolloso, miocardiopatía, polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica, síndrome de Churg-Strauss, enfermedad celíaca, enfermedad de Crohn, síndrome de CREST, enfermedad de Degos, epidemólisis ampollosa adquirida, crioglobulinemia mixta esencial, arteritis de células gigantes, glomerulonefritis, síndrome de Goodpasture, enfermedad de Graves, síndrome de Gillan-Barre, tiroiditis de Hashimoto, púrpura trombocitopénica idiopática, enfermedad intestinal inflamatoria, enfermedad de Kawasaki, síndrome de Meniere, enfermedad del tejido conjuntivo mixta, úlcera de Mooren, esclerosis múltiple, miastenia gravis, pénfigo foliáceo, pénfigo vulgar, anemia perniciosa, poliarteritis nodosa  
40 síndrome autoinmunitario poliglandular de tipo 1 (PAS-1), síndrome autoinmunitario poliglandular de tipo 2 (PAS-2), síndrome autoinmunitario poliglandular de tipo 3 (PAS-3), polimiositis/dermatomiositis, cirrosis biliar primaria, psoriasis, artritis psoriásica, síndrome de Raynaud, síndrome de Reiter, artritis reumatoide, sarcoidosis, esclerodermia, síndrome de Sjörgren, tiroiditis subaguda, oftalmia simpática, lupus eritematoso sistémico, arteritis de Takatasu, diabetes mellitus de tipo 1, vitiligo, enfermedad de Vogt-Koyanagi-Harada o granulomatosis de Wegener. Preferentemente, la enfermedad autoinmunitaria es la artritis reumatoide (AR).

La enfermedad o afección puede ser asma. El asma puede ser agudo o crónico.

55 La IgG activa la vía clásica del sistema del complemento. Por tanto, los polipéptidos y polinucleótidos IdeS pueden usarse para tratar enfermedades y afecciones en las que la activación del complemento es perjudicial para el paciente. Por ejemplo, los polipéptidos y polinucleótidos IdeS se pueden usar para tratar trastornos derivados de trasplantes, por ejemplo rechazo de trasplantes (tales como rechazo de aloinjertos y xenoinjertos) y la enfermedad del injerto contra el huésped. El trastorno derivado del trasplante se puede producir por el trasplante de un tejido o  
60 un órgano en un paciente.

Los polipéptidos y polinucleótidos IdeS también son de uso en tratamiento postoperatorio, por ejemplo en el tratamiento de pacientes que han sido sometidos a operaciones de derivación cardíaca.

65 Además, los polipéptidos y polinucleótidos IdeS se pueden usar para el tratamiento de la hemofilia adquirida, es decir para eliminar la IgG en pacientes hemofílicos que han desarrollado autoanticuerpos contra los factores de



coagulación.

Normalmente, el sujeto es un sujeto mamífero, tal como un ratón, rata o primate (p. ej., un tití o un mono). El sujeto puede ser un ser humano o un animal no humano. Cuando el sujeto es un animal de laboratorio como un ratón, rata o primate, el animal puede tratarse para inducir una enfermedad o afección mediada por los anticuerpos IgG patogénicos. Por ejemplo, se puede usar el modelo de artritis inducida por anticuerpos anti-CII (CAIA) de ratón descrito por Nandakumar y col. (Am. J. Pathol. 163(5):1827-1837,2003), o la versión modificada del dicho modelo descrito en los ejemplos.

## 10 Terapia y profilaxis

La presente invención proporciona el uso de polipéptidos y polinucleótidos IdeS para tratar o prevenir una enfermedad o afección mediada por anticuerpos IgG patogénicos como se define en la reivindicación 1. El tratamiento puede ser terapéutico o profiláctico.

El polipéptido o polinucleótido IdeS se puede administrar a un individuo con el fin de prevenir el inicio de uno o más síntomas de la enfermedad o afección. En esta realización, el sujeto puede ser asintomático. El sujeto puede tener una predisposición genética a la enfermedad. Una cantidad profilácticamente eficaz del polipéptido o polinucleótido se administra a tal individuo. Una cantidad profilácticamente eficaz es una cantidad que previene el inicio de uno o más síntomas de una enfermedad o afección.

Una cantidad terapéuticamente eficaz del polipéptido o polinucleótido IdeS es una cantidad eficaz para aliviar uno o más síntomas de una enfermedad o afección. Preferentemente, el individuo que se va a tratar es un ser humano.

El polipéptido o polinucleótido IdeS se puede administrar al sujeto por cualquier medio adecuado. El polipéptido o polinucleótido se puede administrar por las vías enteral o parenteral, tal como por vía oral, bucal, anal, pulmonar, intravenosa, intraarterial, intramuscular, intraperitoneal, intraarticular, tópica u otras vías de administración adecuadas.

El polipéptido o polinucleótido IdeS se puede administrar al sujeto de un modo tal que se dirija la terapia a un punto concreto. Por ejemplo, un polipéptido IdeS se puede administrar directamente al lugar del órgano transplantado. El polipéptido IdeS se puede inyectar localmente, por ejemplo intraarticularmente, o en una o más articulaciones. La administración local de IdeS en las articulaciones es particularmente preferible para la profilaxis o tratamiento de la artritis reumatoide (AR). El polipéptido IdeS puede estar conjugado con reactivos que se unen al cartílago específicamente. Para los polinucleótidos IdeS, los vectores de expresión que codifican el polipéptido IdeS se pueden usar para dirigir la expresión de IdeS a un tejido concreto, usando, por ejemplo, promotores o ARNi específicos de tejido.

La formulación de cualquiera de los polipéptidos y polinucleótidos mencionados en el presente documento dependerá de factores tales como la naturaleza del polipéptidos o polinucleótido y la afección que se va a tratar. El polipéptido o polinucleótido se puede administrar en diversas formas de dosificación. Se puede administrar por vía oral (p. ej., como comprimidos, trociscos, pastillas, suspensiones acuosas u oleosas, polvos o gránulos dispersables), parenteral, subcutánea, intravenosa, intramuscular, intraesternal, transdérmica o mediante técnicas de infusión. El polipéptido o polinucleótido se puede administrar también como supositorio. Un médico podrá determinar la vía de administración requerida para cada paciente concreto.

Normalmente, el polipéptido o polinucleótido se formulan para usar con un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable y esto se puede llevar a cabo usando procedimientos rutinarios en la técnica farmacéutica. El vehículo o diluyente farmacéuticos pueden ser, por ejemplo, una solución isotónica. Por ejemplo, las formas orales sólidas pueden contener, junto con el compuesto activo, los diluyentes, por ejemplo lactosa, dextrosa, sacarosa, celulosa, almidón de maíz o almidón de patata, lubricantes, por ejemplo sílice, talco, ácido esteárico, estearato de magnesio o de calcio y/o polietilenglicoles, agentes aglutinantes, por ejemplo almidones, gomas arábicas, gelatina, metilcelulosa, carboximetilcelulosa o polivinilpirrolidona; agentes disgregantes, por ejemplo almidón, ácido alginico, alginatos o glicolato almidón sódico; mezclas efervescentes, pigmentos; edulcorantes; agentes humectantes, tales como lecitina, polisorbatos, laurilsulfatos; y, en general, sustancias no tóxicas y farmacológicamente inactivas usadas en formulaciones farmacéuticas. Dichas preparaciones farmacéuticas se pueden fabricar de un modo conocidos, por ejemplo por medio de procedimientos de mezclado, granulación, formación de comprimidos, recubrimiento con azúcar o recubrimiento pelicular.

Dispersiones líquidas para administración oral pueden ser jarabes, emulsiones y suspensiones. Los jarabes pueden contener como vehículos, por ejemplo, sacarosa o sacarosa con glicerina y/o manitol y/o sorbitol.

Las suspensiones y emulsiones pueden contener como vehículo, por ejemplo, una goma natural, agar, alginato sódico, pectina, metilcelulosa, carboximetilcelulosa o alcohol polivinílico. Las suspensiones o soluciones para inyecciones intramusculares pueden contener, junto con el compuesto activo, un vehículo farmacéuticamente aceptable, por ejemplo agua estéril, aceite de oliva, oleato de etilo, glicoles, por ejemplo propilenglicol, y, si se

desea, una cantidad adecuada de clorhidrato de lidocaína.

Soluciones para intravenosa o infusiones pueden contener como vehículo, por ejemplo, agua estéril o, preferentemente, pueden estar en forma de soluciones salinas acuosas isotónicas estériles.

5 Para los supositorios, aglutinantes y vehículos tradicionales pueden incluir, por ejemplo, polialquilenglicoles o triglicéridos; tales supositorios pueden estar formados por mezclas que contienen el ingrediente activo en el intervalo de 0,5 % a 10 %, preferentemente de 1 % a 2 %.

10 Las formulaciones orales incluyen dichos excipientes empleados habitualmente, por ejemplo calidades farmacéuticas de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, celulosa, carbonato de magnesio y similares. Estas composiciones toman la forma de soluciones, suspensiones, comprimidos, píldoras, cápsulas, formulaciones de liberación sostenida o polvos y contienen del 10 % al 95 % del ingrediente activo, preferentemente del 25 % al 70 %. Cuando la composición farmacéutica se liofiliza, el material liofilizado se puede reconstituir antes de la administración, por ejemplo una suspensión. La reconstitución se efectúa, preferentemente, en tampón.

20 Las cápsulas, comprimidos y píldoras para administración oral a un paciente se pueden proporcionar con un recubrimiento entérico que comprende, por ejemplo, Eudragit "S", Eudragit "L", acetato de celulosa, ftalato acetato de celulosa o hidroxipropilmetilcelulosa.

También se pueden usar composiciones farmacéuticas adecuadas para liberación mediante inyección sin aguja, por ejemplo, transdérmicamente.

25 Se administra una cantidad terapéuticamente eficaz de polipéptido o polinucleótido. La dosis se puede determinar de acuerdo con varios parámetros, especialmente de acuerdo con el polipéptido o polinucleótido usado; la edad, el peso y la afección del paciente que se va a tratar; la vía de administración y el régimen requerido. De nuevo, un médico podrá determinar la vía de administración y la dosis requerida para cada paciente concreto. Una dosis diaria típica es de aproximadamente 0,1 a 50 mg por kg, preferentemente de aproximadamente 0,1 mg/kg a 10 mg/kg de peso corporal, de acuerdo con la actividad del inhibidor específico, la edad, el peso y las afecciones del sujeto que se va a tratar, el tipo y la gravedad de la enfermedad y la frecuencia y la vía de administración. Preferentemente, los niveles de dosificación diaria son de 5 mg a 2 g.

35 Las secuencias de nucleótidos IdeS descritas anteriormente y los vectores de expresión que contienen dichas secuencias también se pueden usar como formulaciones farmacéuticas como se ha indicado anteriormente. Preferentemente, el ácido nucleico, tal como ARN o ADN, en concreto ADN, se proporciona en forma de un vector de expresión, que se puede expresar en las células del individuo que se va a tratar. Las vacunas pueden comprender secuencias de nucleótidos desnudos o estar en combinación con lípidos catiónicos, polímeros o sistemas de dirección. Las vacunas pueden administrarse por cualquier técnica disponible. Por ejemplo, el ácido nucleico se puede introducir mediante inyección con aguja, preferentemente intradérmicamente, subcutáneamente o intramuscularmente. Como alternativa, el ácido nucleico se puede liberar directamente a través de la piel usando un dispositivo de liberación de ácido nucleico tal como liberación génica mediada por partículas. El ácido nucleico se puede administrar tópicamente en la piel, o en las superficies mucosas, mediante, por ejemplo, administración intranasal, oral, intravaginal o intrarectal.

45 La captación de las construcciones de ácido nucleico puede potenciarse mediante varias técnicas de transfección conocidas, por ejemplo aquéllas que incluyen el uso de agentes de transfección. Ejemplos de estos agentes incluyen agentes catiónicos, por ejemplo fosfato cálcico y DEA-Dextrano, y lipofectantes, por ejemplo lipofectam y transfectam. La dosis del ácido nucleico que se ha de administrar se puede modificar. Normalmente, el ácido nucleico se administra en el intervalo de 1 pg a 1 mg, preferentemente de 1 pg a 10 µg de ácido nucleico para la liberación génica mediada por partículas y de 10 µg a 1 mg para otras vías.

55 La presente invención también proporciona un procedimiento de tratar, *ex vivo*, sangre extraída de un paciente que sufre una enfermedad o afección mediada por anticuerpos IgG patogénicos, que comprende poner en contacto la sangre con un polipéptido IdeS. La IdeS se puede usar para tratamiento de sangre extracorpórea. La IdeS se puede usar para tratar uno o más componentes de la sangre, tal como plasma o suero. El procedimiento *ex vivo* descrito en el presente documento se puede practicar en sangre que ya se ha extraído del cuerpo de un paciente. La sangre o producto sanguíneo puede devolverse al paciente, opcionalmente, después de su contacto con un polipéptido IdeS.

60 Los ejemplos siguientes ilustran la invención.

#### **Ejemplo 1: Efecto de IdeS sobre la inducción y desarrollo de artritis.**

65 Un modelo animal de diseño único para artritis reumatoide (AR) se produjo usando anticuerpos IgG2a de ratón reactivos con el colágeno de tipo II (CII), una variante del modelo de artritis inducida por anticuerpo anti-CII (CAIA) conocida en Nandakumar (2003), para inducir AR. En grupos de ratones B10.RIII macho se transfirieron con 9 mg

del cóctel de anticuerpo monoclonal IgG2a específica de IgG2a que contiene M287 y CIIC1 de unión a los epítomos J1 y C1<sup>1</sup>, respectivamente. Se inyectó a los ratones IdeS (0,950 mg/ratón/i.v.) en PBS 3 horas antes (n= 5) o después (n= 5) de la transferencia de anticuerpo anti-CII. Los ratones control no recibieron tratamiento (n= 6). El día 5 se inyectó LPS (25 µg/ratón/i.p.) en todos los ratones. Se monitorizó a los ratones para detectar desarrollo de artritis diariamente durante 15 días. La incidencia (a) y la gravedad (b) de la artritis se indica en la Figura 1. Se observó la supervivencia y la salud general de los animales.

Ningún ratón murió durante el experimento ni mostró ninguna reacción adversa tras el tratamiento con IdeS. A excepción del desarrollo de la artritis en el grupo control, los ratones siguieron sanos. Por tanto, los resultados muestran que el tratamiento con IdeS no tenía efectos tóxicos observables y que evitaba completamente el desarrollo de artritis.

Los sueros se analizarán para determinar los niveles de anticuerpos anti-CII. En las patas se analizó la histología. La histología confirmó los datos de puntuación clínica. La Figura 2 muestra la histología de secciones articulares y el tejido infiltrado que rodea las articulaciones. En los ratones control (a y c) había un tejido de paño inflamatorio activo que erosiona el hueso y el cartílago. En los ratones tratados (b y d) las articulaciones eran normales.

### Ejemplo 2: Determinación de la dosis eficaz de IdeS

Para inducir CAIA se usó un cóctel de 9 mg de dos anticuerpos monoclonales: (i) CIIC1 que detecta el epítomo C1<sup>1</sup> y del isotipo IgG2a; y (ii) M2139, que detecta el epítomo J<sup>9</sup> y del isotipo IgG2a. Por tanto, los experimentos difieren de los realizados en el ejemplo 1 en que se usó un anticuerpo específico de J1 diferente. El anticuerpo M2139 tiene una afinidad similar por la unión del epítomo J1 que M287, usado en el ejemplo 1. 3 horas después de la inyección del cóctel de anticuerpos en ratones B10.RIII macho de 4 meses de edad, el tratamiento se administró a tres dosis diferentes (10, 100 y 1000 µg).

Un grupo de controles sin tratar no recibió IdeS (0 µg). Como en el ejemplo 1, se administró LPS el día 5 después de la inyección del cóctel de anticuerpos para potenciar el desarrollo de la artritis.

La incidencia (a) y la gravedad (b) de la artritis se indican en la Figura 3. La tabla siguiente muestra la incidencia de la artritis el día 10.

DÍA 10:	n artritis/n total
Sin tratar	6/7
IdeS (1000 µg):	5/5
IdeS (100 µg):	1/5
IdeS (10 µg):	2/5

El experimento se realizó hasta el día 19 y se observaron esencialmente los mismos resultados el día 19 (véase la Figura 2).

A partir de estos resultados se puede concluir que:

a) El tratamiento con IdeS es probable que sea muy potente, ya que hay efectos claros a la dosis más baja. La dosis eficaz es inferior a 100 µg. Existe un efecto con 10 µg, pero el efecto más óptimo es con 100 µg.

b) La falta de efecto en la dosis más alta puede explicarse, posiblemente, por la contaminación con endotoxina en la preparación de IdeS.

### Ejemplo 3: Tratamiento local de la artritis usando IdeS

En grupos de ratones B1.RIII se transfirió i.v. 9 mg de un cóctel de anticuerpo monoclonal IgH2a anti-CII artritogénico. Se trató a los ratones con 100 µg de IdeS sistémicamente (i.v.) (n=4) o localmente (pata izquierda o derecha). A los ratones tratados localmente se administró IdeS 3 horas después de la transferencia del anticuerpo anti-CII (n= 6) o 3 y 24 horas después de la transferencia del anticuerpo anti-CII (n= 6). La incidencia (a) y la gravedad (b) de la artritis se indican en la Figura 4.

A partir de estos resultados se puede concluir que IdeS tiene efectos locales y es probable que degrade los anticuerpos ya unidos al cartílago.

### LISTADO DE SECUENCIAS

<110> HANSA MEDICAL AB

<120> TRATAMIENTO

ES 2 380 950 T3

<130> N94829B SERISJB

<160> 8

5 <170> PatentIn versión 3,0

<210> 1

<211>310

<212> PRT

10 <213> S. Pyogenes

<400> 1

```

Asp Ser Phe Ser Ala Asn Gln Glu Ile Arg Tyr Ser Glu Val Thr Pro
1           5           10           15

Tyr His Val Thr Ser Val Trp Thr Lys Gly Val Thr Pro Pro Ala Asn
           20           25           30

Phe Thr Gln Gly Glu Asp Val Phe His Ala Pro Tyr Val Ala Asn Gln
           35           40           45

Gly Trp Tyr Asp Ile Thr Lys Thr Phe Asn Gly Lys Asp Asp Leu Leu
50           55           60

Cys Gly Ala Ala Thr Ala Gly Asn Met Leu His Trp Trp Phe Asp Gln
65           70           75           80

Asn Lys Asp Gln Ile Lys Arg Tyr Leu Glu Glu His Pro Glu Lys Gln
           85           90           95

Lys Ile Asn Phe Asn Gly Glu Gln Met Phe Asp Val Lys Glu Ala Ile
           100          105          110

Asp Thr Lys Asn His Gln Leu Asp Ser Lys Leu Phe Glu Tyr Phe Lys
115          120          125

```

ES 2 380 950 T3

Glu Lys Ala Phe Pro Tyr Leu Ser Thr Lys His Leu Gly Val Phe Pro  
 130 135 140

Asp His Val Ile Asp Met Phe Ile Asn Gly Tyr Arg Leu Ser Leu Thr  
 145 150 155 160

Asn His Gly Pro Thr Pro Val Lys Glu Gly Ser Lys Asp Pro Arg Gly  
 165 170 175

Gly Ile Phe Asp Ala Val Phe Thr Arg Gly Asp Gln Ser Lys Leu Leu  
 180 185 190

Thr Ser Arg His Asp Phe Lys Glu Lys Asn Leu Lys Glu Ile Ser Asp  
 195 200 205

Leu Ile Lys Lys Glu Leu Thr Glu Gly Lys Ala Leu Gly Leu Ser His  
 210 215 220

Thr Tyr Ala Asn Val Arg Ile Asn His Val Ile Asn Leu Trp Gly Ala  
 225 230 235 240

Asp Phe Asp Ser Asn Gly Asn Leu Lys Ala Ile Tyr Val Thr Asp Ser  
 245 250 255

Asp Ser Asn Ala Ser Ile Gly Met Lys Lys Tyr Phe Val Gly Val Asn  
 260 265 270

Ser Ala Gly Lys Val Ala Ile Ser Ala Lys Glu Ile Lys Glu Asp Asn  
 275 280 285

Ile Gly Ala Gln Val Leu Gly Leu Phe Thr Leu Ser Thr Gly Gln Asp  
 290 295 300

Ser Trp Asn Gln Thr Asn  
 305 310

- <210> 2
- <211> 339
- 5 <212> PRT
- <213> S. Pyogenes
- <400> 2

ES 2 380 950 T3

Met Arg Lys Arg Cys Tyr Ser Thr Ser Ala Ala Val Leu Ala Ala Val  
1 5 10 15

Thr Leu Phe Val Leu Ser Val Asp Arg Gly Val Ile Ala Asp Ser Phe  
20 25 30

Ser Ala Asn Gln Glu Ile Arg Tyr Ser Glu Val Thr Pro Tyr His Val  
35 40 45

Thr Ser Val Trp Thr Lys Gly Val Thr Pro Pro Ala Asn Phe Thr Gln  
50 55 60

Gly Glu Asp Val Phe His Ala Pro Tyr Val Ala Asn Gln Gly Trp Tyr  
65 70 75 80

Asp Ile Thr Lys Thr Phe Asn Gly Lys Asp Asp Leu Leu Cys Gly Ala  
85 90 95

Ala Thr Ala Gly Asn Met Leu His Trp Trp Phe Asp Gln Asn Lys Asp  
100 105 110

Gln Ile Lys Arg Tyr Leu Glu Glu His Pro Glu Lys Gln Lys Ile Asn  
115 120 125

Phe Asn Gly Glu Gln Met Phe Asp Val Lys Glu Ala Ile Asp Thr Lys  
130 135 140

Asn His Gln Leu Asp Ser Lys Leu Phe Glu Tyr Phe Lys Glu Lys Ala  
145 150 155 160

Phe Pro Tyr Leu Ser Thr Lys His Leu Gly Val Phe Pro Asp His Val  
165 170 175

Ile Asp Met Phe Ile Asn Gly Tyr Arg Leu Ser Leu Thr Asn His Gly  
180 185 190

Pro Thr Pro Val Lys Glu Gly Ser Lys Asp Pro Arg Gly Gly Ile Phe  
195 200 205

Asp Ala Val Phe Thr Arg Gly Asp Gln Ser Lys Leu Leu Thr Ser Arg  
210 215 220

ES 2 380 950 T3

His Asp Phe Lys Glu Lys Asn Leu Lys Glu Ile Ser Asp Leu Ile Lys  
225 230 235 240

Lys Glu Leu Thr Glu Gly Lys Ala Leu Gly Leu Ser His Thr Tyr Ala  
245 250 255

Asn Val Arg Ile Asn His Val Ile Asn Leu Trp Gly Ala Asp Phe Asp  
260 265 270

Ser Asn Gly Asn Leu Lys Ala Ile Tyr Val Thr Asp Ser Asp Ser Asn  
275 280 285

Ala Ser Ile Gly Met Lys Lys Tyr Phe Val Gly Val Asn Ser Ala Gly  
290 295 300

Lys Val Ala Ile Ser Ala Lys Glu Ile Lys Glu Asp Asn Ile Gly Ala  
305 310 315 320

Gln Val Leu Gly Leu Phe Thr Leu Ser Thr Gly Gln Asp Ser Trp Asn  
325 330 335

Gln Thr Asn

- <210> 3
- <211> 1020
- 5 <212> ADN
- <213> S. Pyogenes

<400> 3

10

ES 2 380 950 T3

atgagaaaa gatgctattc aacttcagct gcagttattg cagcagtgac tttatttggt 60  
ctatcggtag atcgtggtgt tatagcagat agtttttctg ctaatcaaga gattagatat 120  
tcggaagtaa caccttatca cgttacttcc gtttggacca aaggagttac tcctccagca 180  
aacttcactc aagggtgaaga tgtttttcac gctccttatg ttgctaacca aggatggtat 240  
gatattacca aaacattcaa tggaaaagac gatcttcttt gcggggctgc cacagcaggg 300  
aatatgcttc actggtgggt cgatcaaaac aaagaccaa ttaaactgta tttggaagag 360  
catccagaaa agcaaaaaat aaacttcaat ggcaacaga tgtttgacgt aaaagaagct 420  
atcgacacta aaaaccacca gctagatagt aaattatttg aatattttaa agaaaaagct 480  
ttccttctc tatctactaa acacctagga gttttcctg atcatgtaat tgatattgctc 540  
attaacggct accgccttag tctaactaac cacggcca cccagtaaa agaaggtagt 600  
aaagatcccc gaggtggtat ttttgacgcc gtatttcaa gaggtgatca aagtaagcta 660  
ttgacaagtc gtcattgatt taaagaaaa aatctcaag aatcagtg tctcattaag 720  
aaagagttaa ccgaaggcaa ggctctagc ctatcacaca cctacgcta cgtagcctc 780  
aaccatgta taaacctgtg gggagctgac tttgattcta acgggaacct taaagctatt 840  
tatgtaacag actctgatag taatgatct attggtatga agaaatactt tgttggtggt 900

aattccgctg gaaaagtagc ttttctgct aaagaataa aagaagataa tattggtgct 960  
caagtactag ggttatttac actttcaaca gggcaagata gttggaatca gaccaattaa 1020

- 5 <210> 4  
<211> 24  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial
- 10 <400> 4  
cgttactcc gtttgatcc aagg 24  
<210> 5  
<211> 26
- 15 <212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
<400> 5  
gaaatagcta ctctcgagc ggaatt 26
- 20 <210> 6  
<211> 30  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial
- 25 <400> 6  
tcggtagatc gtgggatcct agcagatagt 30  
<210> 7
- 30 30 <211> 28  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
<400> 7
- 35 cggaattctt aattggtctg attccaac 28  
<210> 8  
<211> 8



ES 2 380 950 T3

<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 8

5

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro  
1 5

**REIVINDICACIONES**

1. Un polipéptido IdeS o un polinucleótido que codifica un polipéptido IdeS para usar en un procedimiento de tratamiento o prevención de una enfermedad o afección mediada por anticuerpos IgG, en el que la enfermedad o afección es una enfermedad autoinmunitaria, rechazo de trasplante, tratamiento postoperatorio o hemofilia adquirida, y en el la enfermedad autoinmunitaria se selecciona de enfermedad de Addison, alopecia areata, espondilitis anquilosante, síndrome antifosfolípidos, anemia aplásica, gastritis autoinmunitaria, hipoacusia autoinmunitaria, anemias hemolíticas autoinmunitarias, hepatitis autoinmunitaria, hipoparatiroidismo autoinmunitaria, hipofisitis autoinmunitaria, enfermedad del oído interno autoinmunitaria, síndrome linfoproliferativo autoinmunitario, miocarditis autoinmunitaria, ooforitis autoinmunitaria, orquitis autoinmunitaria, poliendocrinoparí autoinmunitaria, enfermedad de Behcet, penfigoide ampolloso, miocardiopatía, polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica, síndrome de Churg-Strauss, enfermedad celíaca, enfermedad de Crohn, síndrome de CREST, enfermedad de Degos, epidemólisis ampollosa adquirida, crioglobulinemia mixta esencial, arteritis de células gigantes, glomerulonefritis, síndrome de Goodpasture, enfermedad de Graves, síndrome de Gillan-Barre, tiroiditis de Hashimoto, púrpura trombocitopénica idiopática, enfermedad intestinal inflamatoria, enfermedad de Kawasaki, síndrome de Meniere, enfermedad del tejido conjuntivo mixta, úlcera de Mooren, esclerosis múltiple, miastenia gravis, pénfigo foliáceo, pénfigo vulgar, anemia perniciosa, poliarteritis nodosa síndrome autoinmunitario poliglandular de tipo 1 (PAS-1), síndrome autoinmunitario poliglandular de tipo 2 (PAS-2), síndrome autoinmunitario poliglandular de tipo 3 (PAS-3), polimiositis/dermatomiositis, cirrosis biliar primaria, psoriasis, artritis psoriásica, síndrome de Raynaud, síndrome de Reiter, artritis reumatoide, sarcoidosis, esclerodermia, síndrome de Sjörgren, tiroiditis subaguda, oftalmía simpática, lupus eritematoso sistémico, arteritis de Takatatsu, diabetes mellitus de tipo 1, vitíligo, enfermedad de Vogt-Koyanagi-Harada o granulomatosis de Wegener.
2. Un polipéptido IdeS, o un polinucleótido que codifica un polipéptido IdeS, para usar en un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho polipéptido IdeS comprende:
- (a) la secuencia de aminoácidos de SEC ID N° 1;
  - (b) una variante del mismo que tenga una identidad de al menos el 50 % con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 1 y que tenga actividad de cisteína proteasa de IgG; o
  - (c) un fragmento de cualquiera de ellos que tenga actividad de cisteína proteasa de IgG.
3. Un polipéptido IdeS, o un polinucleótido que codifica un polipéptido IdeS, para usar en un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 2, en el que dicho polipéptido consiste en la secuencia mostrada en la SEC ID N° 1.
4. Un polipéptido IdeS, o un polinucleótido que codifica un polipéptido IdeS, para usar en un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho polinucleótido comprende:
- (a) la secuencia de codificación de SEC ID N° 3;
  - (b) una secuencia que es degenerada como resultado del código genético con la secuencia como se define en (a);
  - (c) una secuencia que tienen una identidad de al menos 60 % con la secuencia como se define en (a) o (b) y que codifica un polipéptido que tiene actividad cisteína proteasa de IgG; o
  - (d) un fragmento de una cualquiera de las secuencias como se define en (a), (b) o (c) que codifica un polipéptido que tiene actividad cisteína proteasa de IgG.
5. Un polipéptido IdeS, o un polinucleótido que codifica un polipéptido IdeS, para usar en un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 4, en el que dicho polinucleótido consiste en la secuencia de ácido nucleico mostrada en la SEC ID N° 3.
6. Un polipéptido IdeS, o un polinucleótido que codifica un polipéptido IdeS, para usar en un procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el procedimiento comprende:
- poner en contacto, *ex vivo*, la sangre extraída de un paciente con un polipéptido IdeS, en el que la sangre se ha de devolver al paciente.
7. Un polipéptido IdeS, o un polinucleótido que codifica un polipéptido IdeS, para usar en un procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicha enfermedad autoinmunitaria es artritis reumatoide.
8. Un polipéptido IdeS, o un polinucleótido que codifica un polipéptido IdeS, para usar en un procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicha enfermedad autoinmunitaria es lupus eritematoso sistémico.
9. Un polipéptido IdeS, o un polinucleótido que codifica un polipéptido IdeS, para usar en un procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicho rechazo de trasplante es rechazo de aloinjerto o xenoinjerto.

10. Un procedimiento de tratar, *ex vivo*, sangre extraída de un paciente que sufre una enfermedad o afección mediada por anticuerpos IgG, como se define en la reivindicación 1, que comprende poner en contacto la sangre con un polipéptido IdeS.

Figura 1

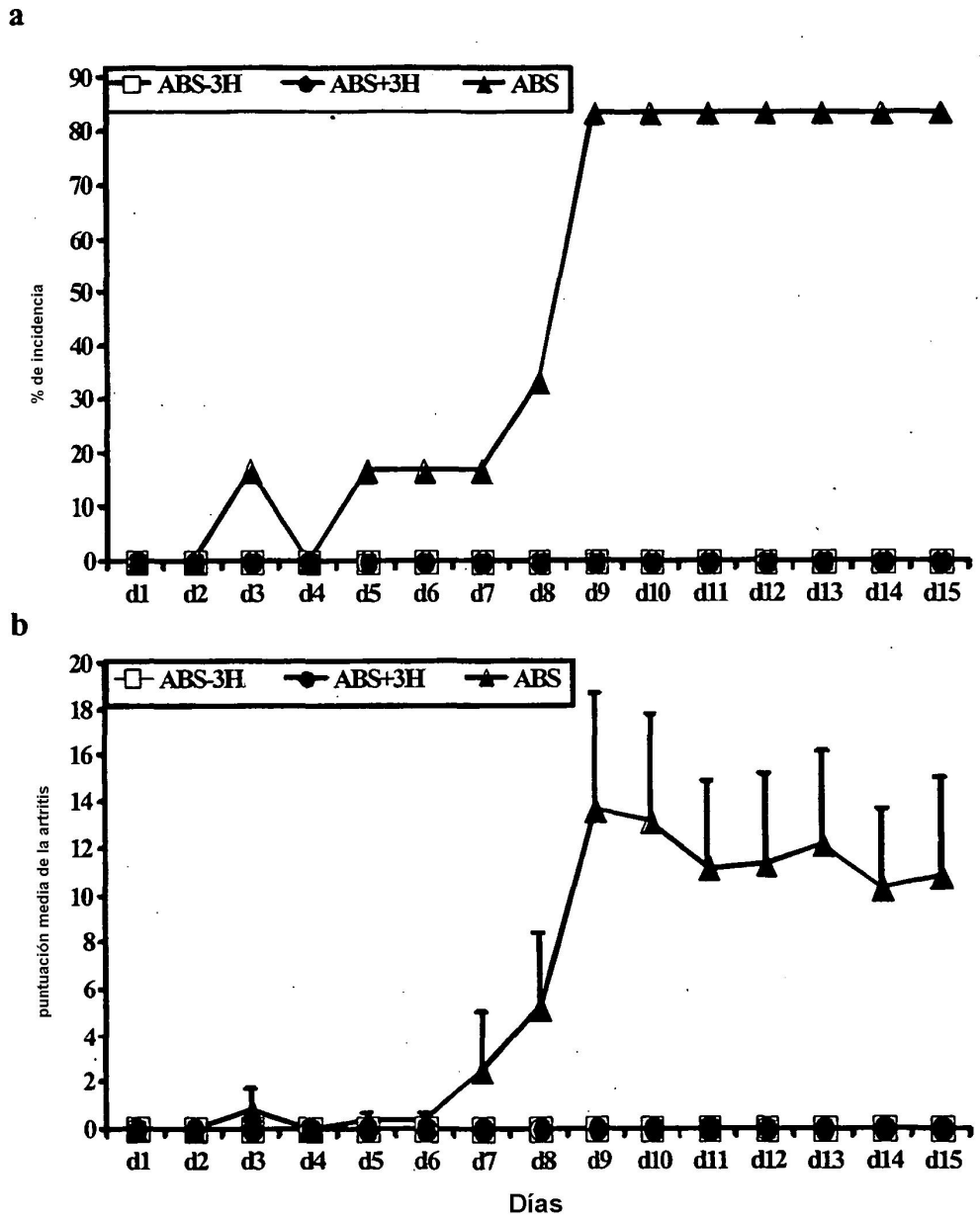


Figura 2

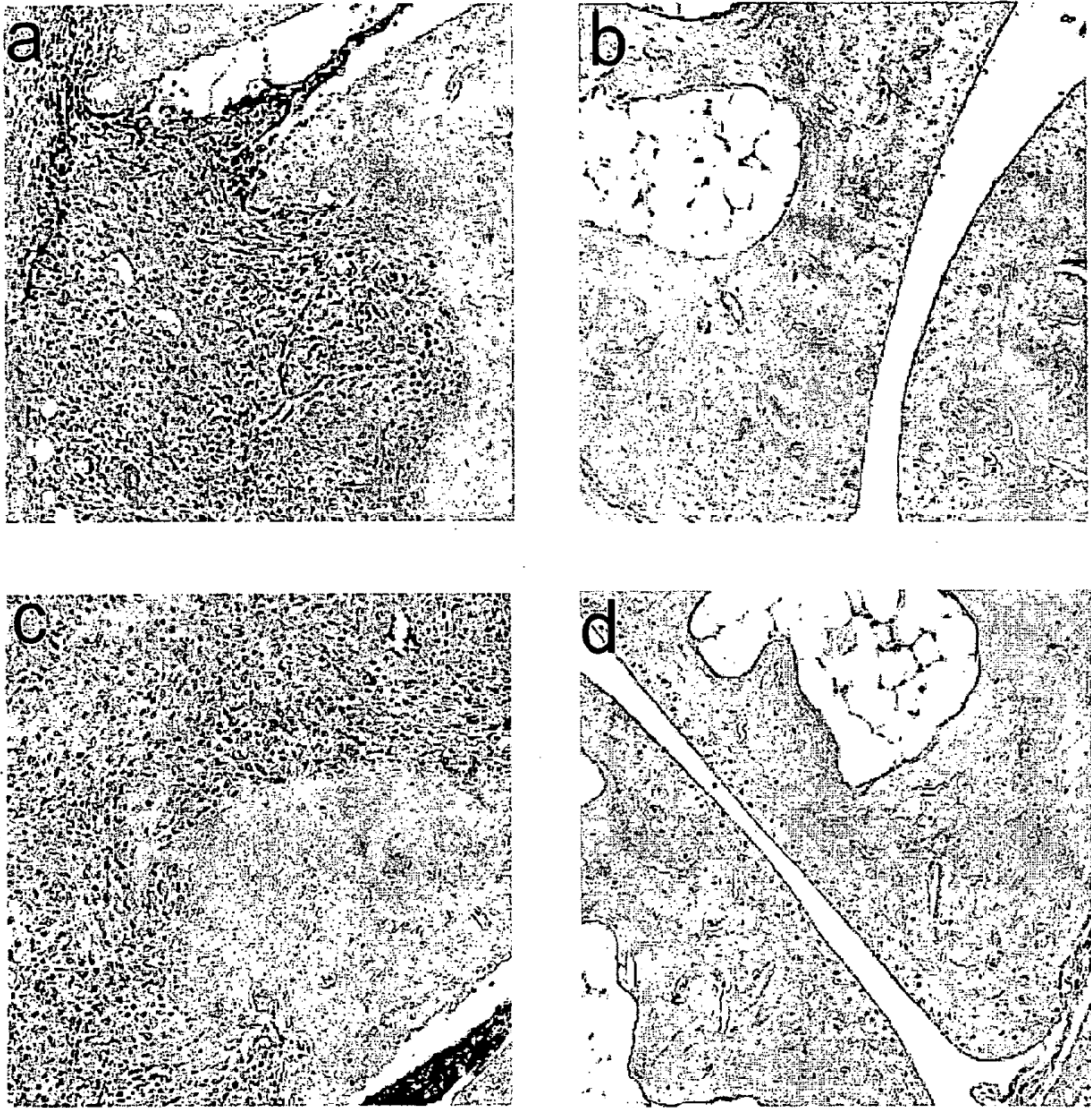


Figura 3

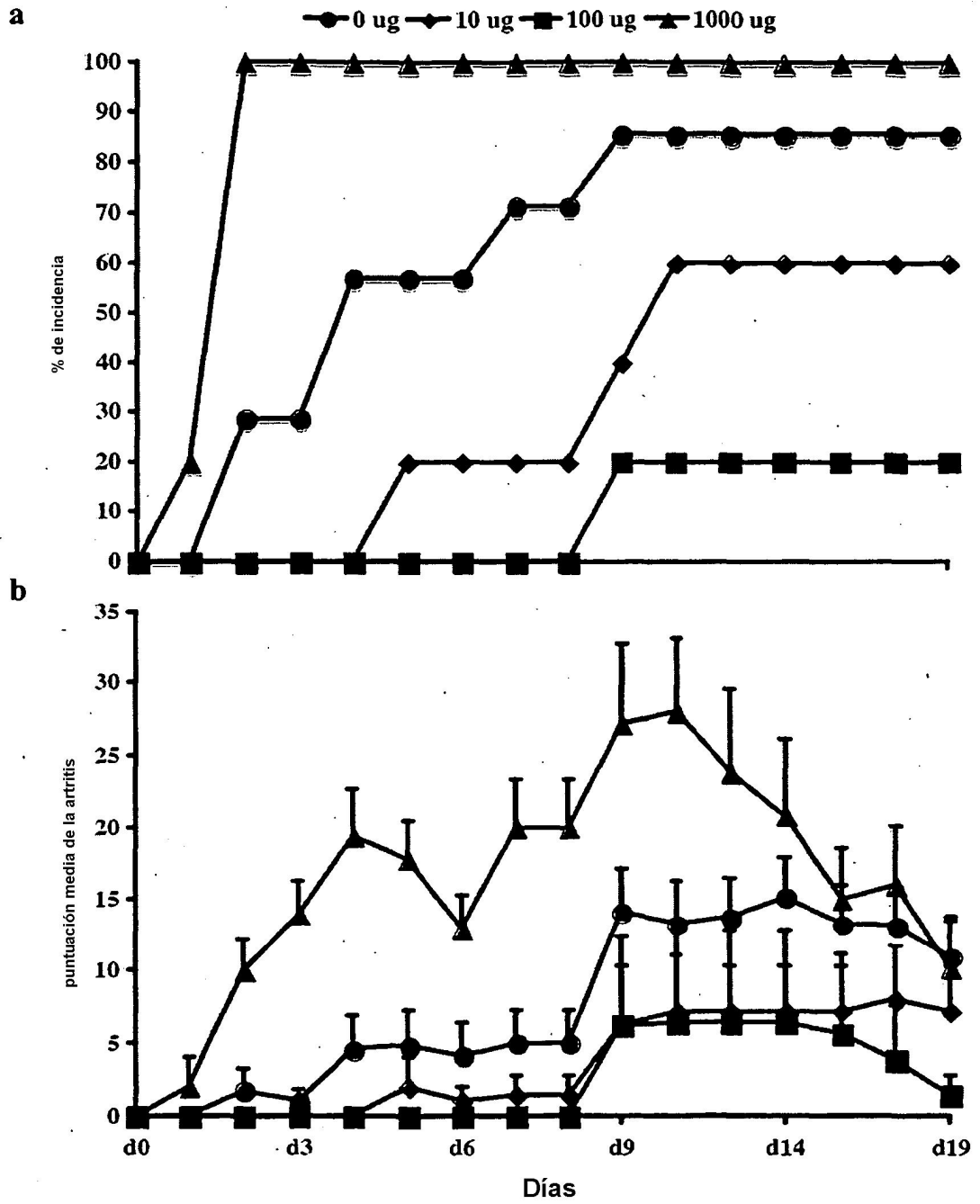


Figura 4

