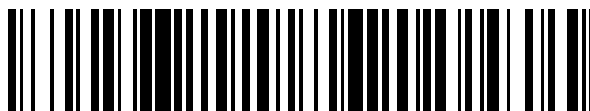


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 426 352**

51 Int. Cl.:

A61P 37/00 (2006.01)

A61K 38/47 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.12.2007** **E 07856650 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.08.2013** **EP 2099477**

54 Título: **Uso de la endoglucosidasa EndoS para el tratamiento de enfermedades mediadas por la inmunoglobulina G**

30 Prioridad:

13.12.2006 GB 0624874

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
22.10.2013

73 Titular/es:

**HANSA MEDICAL AB (100.0%)
P.O. BOX 785
220 07 LUND, SE**

72 Inventor/es:

**BJORCK, LARS;
COLLIN, MATTIAS;
OLSEN, ARNE;
HOLMDAHL, RIKARD;
NANDAKUMAR, KUTTY SELVA y
SHANNON, OONAGH**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 426 352 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 endoglucosidasa EndoS para el tratamiento de enfermedades mediadas por la inmunoglobulina G

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a un método para el tratamiento o prevención de una enfermedad o afección mediada por anticuerpos de IgG, donde dicha enfermedad o afección es una enfermedad autoinmunitaria, rechazo de trasplante o hemofilia adquirida.

10

Antecedentes de la invención

La IgG es un heterotetrámero compuesto por dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras unidas entre sí mediante enlaces disulfuro formando tres dominios de proteína separados por una región bisagra flexible y sensible a proteasas. Las dos partes Fab idénticas se unen a antígenos y la única parte Fc es responsable de las funciones efectoras, incluyendo la unión y la activación del factor del complemento C1q y de receptores de Fc en leucocitos.

15

Además de la estructura polipeptídica, la parte Fc contiene un glucano conservado en cada cadena pesada unido a Asn-297. Este oligosacárido es de tipo biantenarico complejo con una fucosa núcleo unida a la N-acetilglucosamina (GlcNAc) más interna. Estos glucanos se localizan en la interfaz entre los dominios C_H2 (segundo dominio constante de las cadenas pesadas).

20

La EndoS es una endoglucosidasa segregada por el patógeno humano *Streptococcus pyogenes*. La EndoS hidroliza específicamente el glucano unido a la asparagina en la IgG entre los dos restos núcleo de GlcNAc. A diferencia de muchas endoglucosidasas relacionadas que requieren o que están mejoradas por desnaturalización del sustrato glucoproteínico, la EndoS solo hidroliza a la IgG natural. Hasta ahora no se ha encontrado ningún otro sustrato para la EndoS.

25

Sumario de la invención

30

Los autores de la presente invención han demostrado que la EndoS es útil en el tratamiento y prevención de enfermedades mediadas por anticuerpos de IgG. En particular, los inventores han demostrado que la EndoS hidroliza eficazmente la IgG en sangre humana e *in vivo* en conejos, que la desglucosilación de la IgG por la EndoS anula su capacidad inductora de artritis en ratones, y que la EndoS tiene un efecto protector en un modelo de ratón de púrpura trombocitopénica idiopática (PTI) letal dirigida por IgG. El tratamiento previo de anticuerpos patógenos con EndoS inhibe el desarrollo de esta enfermedad, y la enzima también salva a ratones de enfermedades ya establecidas cuando se ha desarrollado trombocitopenia grave y sangrado subcutáneo.

35

Por tanto, de acuerdo con la presente invención, se proporciona el uso de un polipéptido EndoS, o un polinucleótido que codifica un polipéptido EndoS, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o prevención de una enfermedad o afección mediada por anticuerpos de IgG, donde dicha enfermedad o afección es una enfermedad autoinmunitaria, rechazo de trasplante o hemofilia adquirida.

40

La presente invención también proporciona:

45

- un péptido EndoS, o un polinucleótido que codifica un polipéptido EndoS, para su uso en un método para el tratamiento o prevención de una enfermedad o afección mediada por anticuerpos de IgG; donde dicha enfermedad o afección es una enfermedad autoinmunitaria, rechazo de trasplante o hemofilia adquirida; y
- un método de tratamiento, *ex vivo*, de sangre extraída de un paciente que padece una enfermedad o afección mediada por anticuerpos de IgG, donde dicha enfermedad o afección es una enfermedad autoinmunitaria, rechazo de trasplante o hemofilia adquirida, y donde dicho método comprende poner en contacto la sangre con un polipéptido EndoS.

50

Breve descripción de las figuras

55

La Figura 1A es un modelo estructural de la IgG1 humana. Los corchetes indican la parte Fab de unión a antígeno y la parte Fc efectora Fc de la IgG. La flecha indica los dos glucanos conservados unidos a Asn-297 de las cadenas pesadas. La Figura 1B es una representación esquemática del glucano de la cadena pesada de la IgG completamente sustituido. S2 indica la glucoforma completamente sialilada, G0 y el corchete indican la extensión de la glucoforma G0. LCA indica el sitio de unión para la aglutinina de *Lens culinaris* usada en experimentos con lectina y EndoS indica el sitio de escisión para la enzima.

60

La Figura 2 es un alineamiento de secuencia de aminoácidos ClustalW de homólogos de EndoS de diferentes serotipos de *S. pyogenes*, *S. equi* y *S. zooepidemicus*. Los nombres de las cepas, especies y serotipos M se muestran a la izquierda. Las identidades y similitudes de aminoácidos se muestran en gris y la secuencia consenso se muestra debajo del alineamiento. El motivo de quitinasa conservado se indica en un recuadro y el ácido glutámico esencial para la actividad se marca con un asterisco por debajo del alineamiento.

65

La Figura 3 es un alineamiento de secuencia de aminoácidos ClustalW del dominio α de la EndoS con EndoF2 de *Elizabethkingia meningoseptica* y CP40 de *Corynebacterium pseudotuberculosis*. Los nombres de las proteínas se muestran a la izquierda. Las identidades y similitudes de aminoácidos se muestran en gris y la secuencia consenso se muestra debajo del alineamiento. El motivo de quitinasa conservado se indica en un recuadro y el ácido glutámico esencial para la actividad se marca con un asterisco por debajo del alineamiento.

La Figura 4 muestra la representación esquemática de la organización de dominios de la EndoS de los 995 aminoácidos de la EndoS de longitud completa (SEC ID N°: 2). Se indica el péptido de señal, en el dominio α se indica el motivo del sitio activo de la familia quitinasa 18 y el sitio de escisión de SpeB que genera los dos dominios se indica con una flecha.

La Figura 5 muestra un análisis de actividad de la EndoS en sangre humana. La Figura 5A muestra un análisis SDS-PAGE de IgG purificada de sangre humana incubada con concentraciones en aumento de EndoS recombinante (rEndoS). La Figura 5B muestra un análisis de transferencia de lectina LCA de IgG purificada de sangre humana completa incubada con concentraciones en aumento de rEndoS.

La Figura 5C muestra un análisis densitométrico de la transferencia de lectina sobre IgG purificada de sangre humana incubada con concentraciones en aumento de rEndoS.

La Figura 6 muestra un análisis de la actividad *in vivo* de la EndoS en conejos. La Figura 6A muestra un análisis de SDS-PAGE (tinción) y de transferencia de lectina (transferencia de LCA) de IgG purificada de muestras de suero extraídas del conejo en el momento indicado después de la primera inyección intravenosa de 500 μ g de rEndoS. La Figura 6B muestra un análisis de SDS-PAGE (tinción) y de transferencia de lectina (transferencia de LCA) de IgG purificada de muestras de suero extraídas del conejo en el momento indicado después de una segunda administración de rEndoS. La Figura 6G muestra un análisis de SDS-PAGE (tinción) y de transferencia de lectina (transferencia de LCA) de IgG purificada de muestras de suero extraídas del conejo en el momento indicado después de una tercera administración de rEndoS.

La Figura 7 muestra la respuesta de anticuerpos del conejo contra rEndoS. Las muestras de suero se extrajeron del conejo en el momento indicado después de la primera, segunda y tercera inyección de rEndoS. Los sueros se usaron como antisueros primarios en una transferencia de Western sobre diferentes tiras de membranas con rEndoS purificada separada por SDS-PAGE.

La Figura 7A también muestra la respuesta de anticuerpos del conejo contra rEndoS. Las muestras de suero son las mismas que las de la Figura 7. Inserto: transferencia de Western como en la Figura 7 usando, como antisuero primario, las muestras de suero después de la primera inyección. Figura principal: se usaron muestras de suero después de la primera, segunda y tercera inyección como antisuero primario en un experimento ELISA con la EndoS inmovilizada. Se presenta el aumento de concentración (ng/ml) de IgG anti-EndoS comparado con la concentración antes de la primera inyección. Se muestra un experimento representativo.

La Figura 8 muestra un análisis de SDS-PAGE (tinción) y de transferencia de lectina (transferencia) de anticuerpos IgG monoclonales (CIIC1 y M2139) incubados con y sin EndoS y separados por SDS-PAGE al 10%. Los geles se analizaron mediante tinción con Azul de Coomassie (tinción) o mediante transferencia a una membrana que se exploró con lectina GNL (transferencia). El anticuerpo monoclonal CIIC (IgG2a) se incubó con EndoS (carril 1) y sin EndoS (carril 2); el anticuerpo monoclonal M2139 (IgG2b) se incubó con EndoS (carril 3) y sin EndoS (carril 4).

La Figura 9 muestra secciones articulares (10 μ m) de ratas tratadas con anticuerpos de unión a CII normales y tratados con EndoS: (a) M2139, (b) M2139D, (c) CIIC1, (d) CIIC1D y (e) control; y teñidas. El aumento es $\times 10$. Los anticuerpos desglucosilados usando EndoS de indican como "D". A ratas neonatales de 1-2 días de vida se les inyectó 1 mg de anticuerpo de unión-CII (tanto normal como tratado con EndoS) i. p. Veinticuatro horas después de la transferencia del anticuerpo, las patas se diseccionaron y se congelaron al instante en compuesto OCT usando isopentano y hielo seco. Se realizó análisis inmunohistoquímico usando anticuerpo anti-kappa de ratón (187.1) biotinilado y anticuerpo secundario conjugado con HRP como sistema detector usando el protocolo convencional.

La Figura 10 muestra la frecuencia (a) y la gravedad (b) de artritis en ratones que reciben anticuerpos monoclonales anti-CII no tratados o tratados con EndoS. El día 0, grupos de ratones F1 (BALB/c X B10.Q) macho recibieron una inyección de 9 mg de anticuerpos monoclonales anti-CII (M2139 y CIIC1) no tratados (n=7) o tratados con EndoS (n=5). Todos los ratones recibieron una inyección de 50 μ g de LPS de *E. coli* i.p. el día 5. Todos los ratones se incluyeron en los cálculos. Las barras de error indican la media $\pm$ ETM.

La Figura 11 muestra la frecuencia (a) y la gravedad (b) de artritis en ratones que reciben anticuerpos monoclonales anti-CII no tratados o tratados con EndoS. El día 0, ratones B10.RIII macho recibieron una inyección de 9 mg de anticuerpos monoclonales anti-CII (M2139 y CIIC1) no tratados (n=11) o tratados con EndoS (n=12). Todos los ratones recibieron una inyección de 50 μ g de LPS de *E. coli* i.p. el día 5. Todos los ratones se incluyeron en los cálculos. Las barras de error indican la media $\pm$ ETM.

La Figura 12 muestra la deposición del componente del complemento C1q sobre: (a) placas unidas a anticuerpo revestidas con CII usando diferentes concentraciones de suero F1 normal (BALB/c x B10.Q); y (b) placas directamente revestidas con anticuerpos al 0,25% de suero F1 normal (BALB/c x B10.Q). Las barras de error indican $\pm$ DT.

La Figura 13 muestra la deposición del componente de complemento C3b sobre: (a) placas unidas a anticuerpo revestidas con CII usando diferentes concentraciones de suero F1 normal (BALB/c x B10.Q); y (b) placas directamente revestidas con anticuerpos al 0,125% de suero F1 (BALB/c x B10.Q) normal. Las barras de error indican $\pm$ DT.

La Figura 14 muestra el efecto de la desglucosilación de anticuerpos monoclonales sobre la expresión oxidativa de neutrófilos (PMNL). Anticuerpos monoclonales normales (M2139 o CIIC1) o desglucosilados (M2139-D o CIIC1-D) se aplicaron sobre micropartículas de poliestireno carboxilado (1 μ m). La capacidad de explosión oxidativa de los PMNL de muestras de sangre completa heparinizada se determinó usando FACS después de incubarlas con perlas revestidas con anticuerpo. Los resultados son valores medios de 5 ratones en cada grupo. Se usaron ratones B10.Q que tenían tres genotipos diferentes (Fc γ R+/+, Fc γ R-/- y Fc γ R+/-). Los grupos de “medio” y “perlas” constituyeron dos controles negativos diferentes. El grupo PMA fue el control positivo. Los PMNL se identificaron usando conjugado RB6-APC.

La Figura 15 muestra el nivel de anticuerpos anti-CII medido por ELISA en el suero de ratones B10.RIII (día 1 y día 5) transferidos i.v. con 9 mg de cóctel de anticuerpo monoclonal (M2139 y CIIC1 o M2139D y CIIC1D). Usando un contador multimarca (VICTOR 1420, Wallac) se midieron las unidades de fluorescencia media de europio.

La Figura 16 muestra que el tratamiento previo de anticuerpos de IgG patógenos inhibe la trombocitopenia mediada por anticuerpos en ratones. Panel A: ratones hembra BALB/c (n=3) recibieron inyecciones intraperitoneales de IgG de conejo anti-plaquetas de ratón (α PLT-IgG). Las muestras de sangre se extrajeron a intervalos regulares y los recuentos plaquetarios se determinaron usando citometría de flujo. Panel B: gráficos de supervivencia de ratones BALB/c inyectados con α PLT-IgG que se habían tratado previamente con GST-EndoS (n=4) o GST (n=4). Panel C: recuentos plaquetarios a lo largo del tiempo determinados por citometría de flujo en muestras de sangre de ratones que habían recibido α PLT-IgG previamente tratado con GST-EndoS.

La Figura 17 muestra que la EndoS salva a ratones de trombocitopenia letal mediada por IgG. Panel A: gráficos de supervivencia de ratones BALB/c inyectados con α PLT-IgG seguido de tratamiento con GST-EndoS (n=8) o GST (n=8) 3 horas después de la administración de α PLT-IgG. Panel B: análisis SDS-PAGE (TINCIÓN) y análisis de transferencia de lectina LCA (TRANSFERENCIA con LCA) de IgG purificada de ratones tratados con GST-EndoS o GST, 24, 48 o 72 (solo GST-EndoS) horas después de la inyección de α PLT-IgG. Panel C: las muestras de sangre se extrajeron a intervalos regulares y los recuentos plaquetarios se determinaron usando citometría de flujo en ratones que recibieron tratamiento con GST-EndoS. Panel D: gráficos de supervivencia de ratones BALB/c inyectados con α PLT-IgG seguido de tratamiento con GST-EndoS (n=7) o GST (n=7) en la aparición de síntomas claros de sangrado intra-abdominal (5-7 h después de la administración de α PLT-IgG).

Breve descripción de las secuencias

La SEC ID N°: 1 es una secuencia de aminoácidos de la EndoS aislada de *S. pyogenes* AP1.

La SEC ID N°: 2 es una secuencia de aminoácidos de la EndoS aislada de *S. pyogenes* AP1, incluyendo una secuencia de señal.

La SEC ID N°: 3 es una secuencia de ácido nucleico que codifica la EndoS aislada de *S. pyogenes* AP1, incluyendo una secuencia de señal.

Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona un polipéptido EndoS o un polinucleótido que codifica un polipéptido EndoS para su uso en un método para el tratamiento o la prevención de enfermedades o afecciones mediadas por anticuerpos de IgG, donde dicha enfermedad o afección es una enfermedad autoinmunitaria, rechazo de trasplante o hemofilia adquirida. El método comprende típicamente administrar a un sujeto un polipéptido EndoS o un polinucleótido que codifica un polipéptido EndoS.

Los autores de la presente invención han descubierto que la EndoS hidroliza a la IgG en sangre humana e *in vivo* en ratones, que la desglucosilación de la IgG por la EndoS anula su capacidad inductora de artritis en ratones y que la EndoS tienen un efecto protector en un modelo de ratón de púrpura trombocitopénica idiopática (PTI) letal dirigida por IgG. El tratamiento previo de anticuerpos patógenos con EndoS inhibe el desarrollo de esta enfermedad, y la enzima también salva a ratones de enfermedades ya establecidas cuando se ha desarrollado la trombocitopenia grave y el sangrado subcutáneo. Por consiguiente, la EndoS puede usarse para tratar o prevenir enfermedades o afecciones mediadas por anticuerpos de IgG.

Polipéptidos

El polipéptido EndoS es preferentemente EndoS de *S. pyogenes*, o una variante o un fragmento de EndoS de *S. pyogenes* que conserva actividad IgG endoglucosidasa. La variante puede ser un polipéptido EndoS de otro organismo, tal como otra bacteria. La bacteria es preferentemente *Streptococcus*, tal como *Streptococcus equi*, *Streptococcus zooepidemicus* o preferentemente, *Streptococcus pyogenes*. Como alternativa, la variante puede ser de *Corynebacterium pseudotuberculosis*, por ejemplo la proteína CP40; de *Enterococcus faecalis*, por ejemplo la proteína EndoE; o de *Elizabethkingia meningoseptica* (anteriormente *Flavobacterium meningosepticum*), por ejemplo la proteína EndoF₂. En la figura 2 se muestran las secuencias de las variantes EndoS de diversos serotipos de *S. pyogenes* y de *S. equi* y *S. zooepidemicus*. La Figura 3 muestra un alineamiento del dominio α de EndoS con

EndoF₂ de *Elizabethkingia meningoseptica* y CP40 de *Corynebacterium pseudotuberculosis*.

El polipéptido EndoS puede comprender:

- 5 (a) la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 1;
(b) una variante de la misma que tiene una identidad de al menos el 50% con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 1 y que tiene actividad IgG endoglucosidasa; o
(c) un fragmento de cualquiera de las mismas que tiene actividad IgG endoglucosidasa.

- 10 Preferentemente, el polipéptido comprende, o consta de, la secuencia de la SEC ID N°: 1. La SEC ID N°: 1 es la secuencia de la forma madura de la EndoS, sin la secuencia señal, y corresponde a los aminoácidos 37 a 995 de la SEC ID N°: 2.

- 15 El polipéptido puede incluir adicionalmente una secuencia señal. Por consiguiente, el polipéptido EndoS puede comprender:

- (a) la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 2;
(b) una variante de la misma que tiene una identidad de secuencia de al menos el 50% con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 2 y que tiene actividad IgG endoglucosidasa; o
20 (c) un fragmento de cualquiera de las mismas que tiene actividad IgG endoglucosidasa.

El polipéptido EndoS puede constar de la secuencia mostrada en la SEC ID N°: 2.

- 25 Los polipéptidos variantes son aquellos en los que la secuencia de aminoácidos varía de la de la SEC ID N°: 1 o SEC ID N°: 2, pero que conservan el mismo carácter esencial o funcionalidad básica que la EndoS. Los polipéptidos variantes pueden por lo tanto mostrar actividad IgG endoglucosidasa. Típicamente, los polipéptidos con una identidad de más de aproximadamente el 50%, 55% o el 65%, preferentemente al menos 70%, al menos 80%, al menos 90% y particularmente de manera preferida al menos 95%, al menos 97% o al menos 99%, con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 1 o SEC ID N°: 2 se consideran variantes de la proteína. Dichas variantes pueden
30 incluir variantes alélicas y la delección, modificación o adición de aminoácidos sencillos o grupos de aminoácidos dentro de la secuencia de proteína, siempre que el péptido conserve la funcionalidad básica de la EndoS. La identidad de variantes de la SEC ID N°: 1 o SEC ID N°: 2 puede medirse sobre una región de al menos 100, al menos 250, al menos 500, al menos 750, al menos 800, al menos 850, al menos 900, al menos 950, al menos 955 o más aminoácidos contiguos de la secuencia mostrada en la SEC ID N°: 1 o SEC ID N°: 2, o más preferentemente
35 sobre la longitud completa de la SEC ID N°: 1 o SEC ID N°: 2.

- La entidad de aminoácidos puede calcularse usando un algoritmo adecuado. Por ejemplo, el Paquete UWGCG proporciona el programa BESTFIT que puede usarse para calcular la homología (por ejemplo, usado en sus parámetros por defecto (Devereux et al (1984) Nucleic Acids Research 12, 387-395). Los algoritmos PILEUP y
40 BLAST pueden usarse para calcular la homología o alinear secuencias, tal como identificando secuencias equivalentes o correspondientes (típicamente en sus parámetros por defecto), por ejemplo, como se describe en Altschul S. F. (1993) J Mol Evol 36: 290-300; Altschul, S, F et al (1990) J Mol Biol 215: 403-10.

- El programa informático para realizar análisis BLAST está disponible al público a través del National Center for
45 Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Este algoritmo implica identificar en primer lugar pares de secuencia de alta puntuación (HSP) identificando palabras cortas de longitud W en la secuencia problema que corresponden o satisfacen determinada puntuación T umbral de valor positivo cuando se alinean con una palabra de la misma longitud en una secuencia de una base de datos. T se refiere al umbral de puntuación de palabras vecinas (Altschul et al, indicado anteriormente). Estos aciertos iniciales en palabras vecinas actúan como semillas para
50 iniciar las búsquedas para encontrar los HSP que los contienen. Los aciertos de palabras se extienden en ambas direcciones a lo largo de cada secuencia tanto como pueda incrementarse la puntuación de alineamiento acumulativa. Las extensiones de los aciertos de palabras en cada dirección se detienen cuando: la puntuación de alineamiento acumulativa disminuye en la cantidad X desde su máximo valor conseguido; la puntuación acumulativa llega a cero o a un valor inferior, debido a la acumulación de uno o más alineamientos de restos de puntuación
55 negativa, o se alcanza el final de cualquier secuencia. Los parámetros W, T y X del algoritmo BLAST determinan la sensibilidad y velocidad del alineamiento. El programa BLAST usa por defecto una longitud de palabra (W) de 11, la matriz de puntuación BLOSUM62 (véase Henikoff y Henikoff (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 10915-10919) alineamientos (B) de 50, expectativa (E) de 10, M=5, N=4 y una comparación de las dos cadenas.

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

aproximadamente 0,001.

Las secuencias variante típicamente difieren al menos en 1, 2, 3, 5, 10, 20, 30, 50, 100 o más mutaciones (que pueden ser sustituciones, deleciones o inserciones de aminoácidos). Por ejemplo, pueden realizarse de 1 a 100, de 2 a 50, de 3 a 30 o de 5 a 20 sustituciones, deleciones o inserciones de aminoácidos. El polipéptido modificado generalmente conserva actividad como una endoglucosidasa específica de IgG. Las sustituciones son preferentemente sustituciones conservativas, por ejemplo, de acuerdo con la siguiente Tabla. Los aminoácidos en el 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 - no cargado	C S T M
		N Q
	Polar - cargado	D E
		K R
AROMÁTICO		H F W Y

Las variantes de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 1 contienen preferentemente los restos 191 a 199 de la SEC ID N°: 1, es decir, Leu-191, Asp-192, Gly-193, Leu-194, Asp-195, Val-196, Asp-197, Val-198 y Glu-199 de la SEC ID N°: 1 (que corresponden a los restos 227 a 235 de la SEC ID N°: 2, es decir Leu-227, Asp-228, Gly-229, Leu-230, Asp-231, Val-232, Asp-233, Val-234 y Glu-235 de la SEC ID N°: 2). Estos aminoácidos constituyen un sitio activo perfecto de la familia quitinasa 18, acabado con ácido glutámico. El ácido glutámico en el sitio activo de las quitinasas es esencial para la actividad enzimática. Por lo tanto, más preferentemente, la variante de la SEC ID N°: 1 contiene Glu-199 de la SEC ID N°: 1 y la variante de la SEC ID N°: 2 contiene Glu-235 de la SEC ID N°: 2. La variante de la SEC ID N°: 1 puede contener los restos 191 a 199 de la SEC ID N°: 1 que tiene una o más sustituciones conservativas, siempre que la variante contenga Glu-199 de la SEC ID N°: 1. Como alternativa, la variante de la SEC ID N°: 2 puede contener los restos 227 a 235 de la SEC ID N°: 2 que tiene una o más sustituciones conservativas, siempre que la variante contenga Glu-235 de la SEC ID N°: 2.

El fragmento del polipéptido EndoS usado en la invención tiene típicamente una longitud de al menos 10, por ejemplo, al menos 20, 30, 40, 50 o más aminoácidos, hasta 100, 200, 250, 300, 500, 750, 800, 850, 900, 950 o 955 aminoácidos, siempre que conserve la actividad IgG endoglucosidasa de la EndoS. Preferentemente, el fragmento del polipéptido EndoS usado en la invención incluye los restos 191 a 199 de la SEC ID N°: 1, es decir, Leu-191, Asp-192, Gly-193, Leu-194, Asp-195, Val-196, Asp-197, Val-198 y Glu-199 de la SEC ID N°: 1 (restos 227 a 235 de la SEC ID N°: 2, es decir Leu-227, Asp-228, Gly-229, Leu-230, Asp-231, Val-232, Asp-233, Val-234 y Glu-235 de la SEC ID N°: 2). Un fragmento preferido de la SEC ID N°: 2 consiste en los aminoácidos 37 a 995 de la SEC ID N°: 2, es decir, la SEC ID N°: 1, que corresponde a la forma de la EndoS segregada de *S. pyogenes* después de retirar el péptido señal. Otro fragmento preferido de la invención consiste en los aminoácidos 1 a 409 de la SEC ID N°: 1 (aminoácidos 37 a 445 de la SEC ID N°: 2), que corresponde al dominio α enzimáticamente activo de la EndoS generado por escisión por la cisteína proteinasa estreptocócica SpeB.

Los polipéptidos usados en la invención pueden modificarse químicamente, por ejemplo, modificarse postraduccionalmente. Por ejemplo, pueden glucosidarse, fosforilarse o comprender restos de aminoácidos modificados. Estos pueden modificarse mediante la adición de restos de histidina para ayudar a su purificación o mediante la adición de una secuencia señal para promover la inserción en la membrana celular. Dichos polipéptidos modificados se encuentran dentro del ámbito del término "polipéptido" usado en el presente documento.

Típicamente, los polipéptidos para su uso de acuerdo con la invención presentan actividad inmunoglobulina endoglucosidasa, y en particular, actividad IgG endoglucosidasa. Preferentemente, el polipéptido hidroliza el núcleo β -1,4-di-N-acetilquitobiosa del glucano de la IgG unido a asparagina. Preferentemente la actividad es específica para la IgG. La actividad endoglucosidasa puede determinarse mediante un ensayo adecuado. Por ejemplo, un polipéptido de ensayo puede incubarse con IgG a una temperatura adecuada, tal como a 37 °C. Los materiales de partida y los productos de reacción pueden después analizarse mediante SDS-PAGE. Típicamente, si el polipéptido de ensayo tiene actividad IgG endoglucosidasa, la masa molecular de la cadena pesada de la IgG se reduce en aproximadamente 3 kDa. Otro ensayo para determinar si un polipéptido de ensayo tiene actividad IgG endoglucosidasa es mediante la detección de IgG glucosilada usando lectina de aglutinina de *Lens culinaris* (LCA), opcionalmente usando peroxidasa de rábano picante y sustrato de peroxidasa. Típicamente, si el polipéptido de ensayo tiene actividad IgG endoglucosidasa, la señal carbohidrato se reduce. Otro ensayo para determinar si un polipéptido de ensayo tiene actividad IgG endoglucosidasa es mediante incubación de un polipéptido de ensayo con fragmentos Fc de IgG purificada seguido de reducción de la muestra con ditiotreitól 10 mM y análisis de

espectroscopía de masas (MALDI-TOF). Típicamente, si el polipéptido de ensayo tiene actividad IgG endoglucosidasa, la masa del fragmento Fc monomérico de la IgG se reduce en 1417 ± 14 Da.

La actividad endoglucosidasa de los polipéptidos puede caracterizarse adicionalmente mediante estudios de inhibición.

La actividad endoglucosidasa del polipéptido es generalmente específica de IgG ya que el polipéptido no puede degradar las otras clases de IgG, particularmente IgM, IgA, IgD e IgE, cuando se incuba con estas inmunoglobulinas en condiciones que permitan la escisión de IgG. El polipéptido EndoS puede hidrolizar moléculas de IgG presentes en el sujeto a tratar. Por tanto, cuando el sujeto es un ser humano, el polipéptido EndoS puede hidrolizar la IgG humana. La EndoS puede hidrolizar la IgG humana de las cuatro subclases (IgG₁₋₄). En realizaciones preferidas, el polipéptido EndoS puede hidrolizar la IgG de ser humano, de mono Rhesus, de ratón, de rata, de conejo, de caballo, de cabra, de perro y de cerdo.

Los polipéptidos para su uso en la invención pueden estar en una forma sustancialmente aislada. Se entenderá que el polipéptido puede mezclarse con vehículos o diluyentes que no interferirán con la finalidad deseada del polipéptido y aún considerarse como sustancialmente aislado. Un polipéptido para su uso 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.

Los polipéptidos para su uso en la presente invención pueden aislarse de cualquier organismo adecuado que exprese un polipéptido EndoS o una variante de un polipéptido EndoS. Típicamente, el polipéptido EndoS se aísla de cepas de *Streptococcus*, preferentemente cepas de *S. pyogenes*, que expresan adecuadamente la EndoS. Los organismos y cepas adecuados pueden identificarse mediante diversas técnicas. Por ejemplo, cepas de *S. pyogenes* pueden someterse inicialmente a ensayo con respecto a la presencia de un gen *ndoS*. Los cebadores o sondas de polinucleótidos pueden diseñarse basándose, por ejemplo, en las SEC ID Nos: 1, 2 o 3. La presencia del gen *ndoS* puede después verificarse mediante PCR usando dichos cebadores o por hibridación de sondas con ADN genómico de la cepa de *S. pyogenes*.

Las cepas estreptococales que expresan la EndoS activa o una variante de la misma pueden identificarse sometiendo a ensayo la actividad IgG endoglucosidasa en el sobrenadante de cultivo o mediante inmunodetección usando anticuerpos dirigidos contra EndoS. Las cepas estreptococales que se ha verificado que expresan la EndoS activa son las cepas API y SF370 del serotipo M1 de *S. pyogenes*, la cepa 4047 de *S. equi* y la cepa H70 de *S. zooepidermicus*. Además, el gen *ndoS* se encuentra en las siguientes cepas de *S. pyogenes*: cepas SSI-1 y MGAS5005 de serotipo M1, cepa MGAS10270 de serotipo M2, cepa MGAS315 de serotipo M3, cepa MGAS 10750 de serotipo M4, cepa Manfredo de serotipo M5, cepa MGAS10394 de serotipo M6, cepa MGAS9429 de serotipo M12, cepa MGAS8232 de serotipo M18, cepa MGAS6180 de serotipo M28 y cepa 591 de serotipo M49.

El aislamiento y purificación de EndoS de un cultivo que expresa *S. pyogenes*, o de cultivos de otras células que expresan EndoS está típicamente basado en la actividad IgG endoglucosidasa. Preferentemente, el método de purificación implica una etapa de precipitación con sulfato de amonio y una etapa de cromatografía de intercambio iónico. De acuerdo con un método, el medio de cultivo se fracciona añadiendo cantidades en aumento de sulfato de amonio. Las cantidades de sulfato de amonio pueden ser del 10 al 80%. Preferentemente, el medio de cultivo se fracciona con sulfato de amonio al 50% y el sobrenadante resultante se precipita adicionalmente con sulfato de amonio al 70%. Los polipéptidos sedimentados pueden después someterse a cromatografía de intercambio iónico, por ejemplo mediante FPLC o sobre una columna Mono Q. Las fracciones eluidas pueden ensayarse con respecto a la actividad IgG endoglucosidasa y las fracciones de actividad máxima pueden agruparse. Las fracciones pueden analizarse mediante SDS PAGE. Las fracciones pueden conservarse a -80 °C. En un método alternativo para purificar EndoS, la EndoS sin la secuencia señal (es decir, que tiene la secuencia de la SEC ID N°: 1) se expresa en *Escherichia coli* usando el Sistema de Fusión de Genes GST (Amersham-Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia). Un producto PCR de 2929 pares de bases que contiene las bases 304 a 3232 de la secuencia *ndoS* se amplifica a partir del ADN genómico de *S. pyogenes* usando los cebadores 5'-ACT-GGG-ATC-CCG-GAG-GAG-AAG-ACT-3' con un sitio *Bam*HI (subrayado) y 5'-TTA-ATC-TCG-AGG-TTG-CTA-TCT-AAG-3' con un sitio *Xho*I (subrayado). Este fragmento se digiere con *Bam*HI y *Xho*I y se liga en el plásmido pGEX*ndoS* generador de pGEX-5X-3 que se usa para transformar BL21(DE3)pLys de *E. coli*. pGEX*ndoS*/BL21(DE3)pLys se induce con isopropil β-D-tiogalactopiranosido 0,1 mM. Después de la inducción, las bacterias se someten a lisis usando BugBuster™ (Novagen) y la proteína de fusión GST-EndoS se purifica sobre Glutathione-Sepharose®. La etiqueta GST se retira usando el factor Xa de acuerdo con protocolos (Amersham-Pharmacia Biotech), y el factor Xa residual se retira usando Xarrest™-agarosa (Novagen). Esto da como resultado una preparación de EndoS recombinante (rEndoS) que es homogénea y se evalúa mediante SDS-PAGE y transferencia de Western usando anticuerpos específicos de EndoS. Antes de realizar experimentos *in vivo* las muestras de proteína se esterilizan por filtración a través de un filtro de 0,2 μm (Millipore). La proteína EndoS purificada se conserva a -80 °C en solución salina tamponada con fosfato.

Los polipéptidos para su uso en la invención también pueden prepararse como fragmentos de dichos polipéptidos aislados. Adicionalmente, los polipéptidos EndoS también pueden prepararse sintéticamente o por medios recombinantes. Por ejemplo, un polipéptido EndoS recombinante puede producirse transfectando células de mamífero en cultivo con un vector de expresión que comprenda una secuencia de nucleótidos que codifique el polipéptido unido operativamente a secuencias de control adecuadas, cultivando las células, extrayendo y purificando el polipéptido EndoS producido por las células.

La secuencia de aminoácidos de los polipéptidos para su uso en la invención puede modificarse para incluir aminoácidos de origen no natural o para aumentar la estabilidad del compuesto. Cuando los polipéptidos se producen mediante medios sintéticos, dichos aminoácidos pueden introducirse durante la producción. Los polipéptidos también pueden modificarse después de la producción sintética o recombinante.

Los polipéptidos para su uso en la invención también pueden producirse usando D-aminoácidos. En dichos casos, los aminoácidos se unirán en secuencia inversa en la orientación C a N. esto es convencional en la técnica para producir dichos polipéptidos.

En la técnica se conocen diversas modificaciones de cadena lateral y pueden realizarse en las cadenas laterales de los polipéptidos EndoS, siempre que los polipéptidos conserven la actividad IgG endoglucosidasa.

Polinucleótidos

Un polinucleótido que codifica un polipéptido o una variante EndoS puede usarse para tratar o prevenir una enfermedad o afección mediada por anticuerpos de IgG patógenos. En particular, el polinucleótido puede comprender, o consistir en: (a) la secuencia codificante de la SEC ID N°: 3; (b) una secuencia que es degenerada como resultado del código genético con respecto a 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 IgG endoglucosidasa; 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 IgG endoglucosidasa.

Típicamente, el polinucleótido es ADN. Sin embargo, el polinucleótido puede ser un polinucleótido de ARN. El polinucleótido puede ser mono o bicatenario y puede incluirse en sus nucleótidos sintéticos o modificados.

Un polinucleótido de la invención puede hibridarse típicamente con la secuencia codificante o el complemento de la secuencia codificante de la SEC ID N°: 3 a un nivel significativamente por encima del fondo. La hibridación de fondo puede producirse, por ejemplo, debido a otros ADN presentes en una biblioteca de ADN. El nivel de señal generado por la interacción entre un polinucleótido de la invención y la secuencia codificante o complemento de la secuencia codificante de la SEC ID N°: 3 es típicamente al menos 10 veces, preferentemente al menos 100 veces, tan intenso como las interacciones entre otros polinucleótidos y en la secuencia codificante de la SEC ID N°: 3. La intensidad de interacción puede medirse, por ejemplo, por radiomarcado de la sonda, por ejemplo, con ³²P. La hibridación selectiva puede conseguirse típicamente usando condiciones de rigurosidad media a elevada. Sin embargo, dicha hibridación puede realizarse en cualquiera de las condiciones adecuadas conocidas en la técnica (véase Sambrook et al, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 1989). Por ejemplo, si se requiere alta rigurosidad las condiciones adecuadas incluyen de 0,1 a 0,2 x SSC a 60 °C hasta 65 °C. Si se requiere menor rigurosidad las condiciones adecuadas incluyen 2 x SSC a 60 °C.

La secuencia codificante de la SEC ID N°: 3 puede modificarse mediante sustituciones de nucleótidos, por ejemplo de 1, 2 o 3 a 10, 25, 50, 100, 200, 500 o 750 sustituciones. El polinucleótido de la SEC ID N°: 3 puede, de manera alternativa o adicional, modificarse mediante una o más inserciones y/o deleciones y/o mediante una extensión en cualquiera de los dos extremos. También pueden incluirse secuencias adicionales tales como secuencias señal. El polipéptido modificado generalmente codifica un polipéptido que tiene actividad endoglucosidasa específica de IgG. Pueden realizarse sustituciones degeneradas y/o sustituciones que darían como resultado una sustitución de aminoácidos conservativa cuando la secuencia modificada se traduce, por ejemplo, como se muestra en la Tabla anterior.

Una secuencia de nucleótidos que puede hibridarse selectivamente con el complemento de la secuencia codificante de ADN de la SEC ID N°: 3 generalmente tendrá 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 codificante 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, al menos 100, al menos 200, al menos 500, más preferentemente al menos 750 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 o 2. La identidad de secuencia puede determinarse mediante cualquier método adecuado, por ejemplo, como se ha descrito anteriormente.

Para definir polinucleótidos de la invención puede usarse cualquier combinación de los grados de identidad de secuencia y tamaños mínimos mencionados anteriormente, prefiriéndose las combinaciones más rigurosas (por ejemplo, identidad de secuencia más alta sobre longitudes más largas). Por tanto, por ejemplo, un polinucleótido que

tiene una identidad de secuencia de al menos 90% sobre 60, preferentemente sobre 100 nucleótidos forma un aspecto de la invención, al igual que lo hace un polinucleótido que tiene una identidad de secuencia de al menos 95% sobre 500 nucleótidos.

- 5 Preferentemente, los fragmentos polinucleotídicos tienen una longitud de al menos 20, por ejemplo al menos 25, al menos 30 o al menos 50 nucleótidos. Típicamente tendrán una longitud de hasta 100, 150, 250 o 500 nucleótidos. Los fragmentos pueden tener una longitud mayor de 500 nucleótidos, por ejemplo hasta 600, 700, 800, 900, 1000, 1500, 2000, 2500 o 3000 nucleótidos, o incluso hasta algunos nucleótidos, tal como cinco, diez o quince nucleótidos, salvo en el caso de la secuencia codificante de la SEC ID N°: 3.

10 Los polinucleótidos para su uso en la invención pueden producirse de manera recombinante, sintética o mediante cualquier medio del que disponen los expertos en la técnica. También pueden clonarse mediante técnicas convencionales. Los polinucleótidos se proporcionan típicamente en forma aislada y/o purificada.

- 15 En general, los polinucleótidos cortos se producirán por medios sintéticos, lo que implica una preparación gradual de un nucleótido cada vez de la secuencia de ácido nucleico deseada. Para conseguir esto, en el campo técnico se dispone fácilmente de técnicas automáticas.

20 Generalmente, los polinucleótidos más largos se producirán usando medios recombinantes, por ejemplo usando técnicas de clonación mediante PCR (reacción en cadena de la polimerasa). Esto implicará preparar un par de cebadores (por ejemplo de aproximadamente 15-30 nucleótidos) para un región del gen *ndoS* que se desea clonar, poner los cebadores en contacto con ADN obtenido de una célula bacteriana, realizar una reacción en cadena de la polimerasa en condiciones que realicen la amplificación de la región deseada, aislar el fragmento amplificado (por ejemplo, purificando la mezcla de reacción en un gel de agarosa) y recuperando el ADN amplificado. Pueden diseñarse cebadores que contengan sitios de reconocimiento de enzimas de restricción adecuados de tal manera que el ADN amplificado pueda clonarse en un vector de clonación adecuado.

25 Dichas técnicas pueden usarse para obtener toda o parte de la secuencia del gen *ndoS* descrita en el presente documento. Aunque en general las técnicas mencionadas en el presente documento son bien conocidas en el campo técnico, puede hacerse referencia en particular a Sambrook et al. (1989).

30 Los polinucleótidos EndoS, como se describen en el presente documento, tienen utilidad en la producción de los polipéptidos para su uso en la presente invención, que pueden producirse *in vitro*, *in vivo* o *ex vivo*. Los polinucleótidos pueden de por sí utilizarse como agentes terapéuticos o pueden estar implicados en la síntesis de proteínas recombinantes.

35 Los polinucleótidos para su uso en la invención están típicamente incorporados en un vector recombinante reproducible. El vector puede usarse para reproducir el ácido nucleico en una célula hospedadora compatible. Por lo tanto, los polinucleótidos para su uso en la invención pueden prepararse introduciendo un polinucleótido EndoS en un vector replicable, introduciendo el vector en una célula hospedadora compatible y cultivando la célula hospedadora en condiciones en las que se produzca la replicación del vector. La célula hospedadora puede ser, por ejemplo, una célula de *E. coli*.

40 Preferentemente, el vector es un vector de expresión que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido EndoS. Dichos vectores de expresión se construyen rutinariamente en la técnica de biología molecular y pueden implicar, por ejemplo, el uso de ADN plasmídico e iniciadores, promotores, potenciadores y otros elementos apropiados, tales como, por ejemplo, señales de poliadenilación, que pueden ser necesarias y que se colocan en la orientación correcta para permitir la expresión de las proteínas. Otros vectores adecuados serán obvios para los expertos en la técnica. A modo de ejemplo adicional en este aspecto se hace referencia a Sambrook et al. (1989).

50 Preferentemente, un polinucleótido para su uso en la invención en un vector está unido operativamente a una secuencia de control que puede proporcionar la expresión de la secuencia codificante por la célula hospedadora, es decir, el vector es un vector de expresión. La frase "unido operativamente" se refiere a una yuxtaposición donde los componentes descritos están en relación lo que los permite actuar en su manera deseada. Una secuencia reguladora, tal como un promotor, "unida operativamente" a una secuencia codificante se coloca de tal manera que la expresión de la secuencia codificante se consigue en condiciones compatibles con la secuencia reguladora.

55 Los vectores pueden ser, por ejemplo, vectores de plásmidos, virus o fagos dotados de un origen de replicación, opcionalmente un promotor para la expresión de dicho polinucleótido y opcionalmente un regulador del promotor. El vector se adapta típicamente para su uso *in vivo*.

60 Los promotores y otras señales de regulación de expresión pueden seleccionarse para ser compatibles con la célula hospedadora para la que se diseña la expresión. Pueden usarse promotores de mamíferos, tales como promotores de β -actina. Especialmente se prefieren promotores específicos de tejido. También pueden usarse promotores virales, por ejemplo la repetición terminal larga del virus de la leucemia murina de Moloney (MMLV LTR), el promotor LTR del virus de sarcoma de rous (RSV), el promotor SV40, el promotor IE del citomegalovirus (CMV) humano,

adenovirus, promotores del HSV (tales como los promotores IE del HSV), o promotores del HPV, particularmente la región reguladora aguas arriba (URR) del HPV. En la técnica se dispone fácilmente de promotores virales.

El vector también puede incluir secuencias que flanquean el polinucleótido dando lugar a polinucleótidos que comprenden secuencias homólogas con secuencias genómicas eucariotas, preferentemente secuencias genómicas de mamíferos. Esto permitirá la introducción de los polinucleótidos de la invención en el genoma de células eucariotas por recombinación homóloga. En particular, para preparar un vector viral adecuado para administrar los polinucleótidos de la invención a una célula de mamífero puede usarse un vector plasmídico que comprenda el casete de expresión flanqueado por secuencias virales. Otros ejemplos de vectores virales adecuados incluyen vectores virales del herpes simple y retrovirus, incluyendo lentivirus, adenovirus, virus adenoasociados y virus HPV. Los expertos en la técnica conocen técnicas de transferencia de genes usando estos virus. Pueden usarse vectores retrovirales, por ejemplo, para integrar de modo estable el polinucleótido dando lugar al polinucleótido en el genoma hospedador. Por el contrario, los vectores adenovirales con replicación defectuosa siguen siendo episomales y por lo tanto permiten la expresión transitoria.

Enfermedades y afecciones

El polipéptido, o polinucleótido, EndoS, puede usarse para tratar o prevenir enfermedades o afecciones mediadas por anticuerpos de IgG patógenos. Es bien conocido en la técnica que los anticuerpos de IgG están implicados en la patogénesis de diversas enfermedades y afecciones diferentes. Los autores de la presente invención han descubierto que la función de los anticuerpos de IgG patógenos en dichas enfermedades puede inhibirse usando un polipéptido o polinucleótido EndoS.

La enfermedad o afección puede ser una enfermedad autoinmunitaria. Dichas enfermedades incluyen la enfermedad de Addison, alopecia areata, espondilitis anquilosante, síndrome antifosfolipídico, anemia aplásica, gastritis autoinmunitaria, sordera autoinmunitaria, anemia hemolítica autoinmunitaria, hepatitis autoinmunitaria, hipoparatiroidismo autoinmunitario, hipofisitis autoinmunitaria, enfermedad autoinmunitaria del oído interno, síndrome linfoproliferativo autoinmunitario, miocarditis autoinmunitaria, ooforitis autoinmunitaria, orquitis autoinmunitaria, poliendocrinopatía autoinmunitaria, enfermedad de Bechet, penfigoide bulboso, cardiomiopatía, polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica, síndrome de Churg-Strauss, enfermedad celiaca, enfermedad de Crohn, síndrome de CREST, enfermedad de Degos, epidermólisis ampollar adquirida, crioglobulinemia mixta esencial, arteritis de células gigantes, glomerulonefritis, síndrome de Goodpasture, enfermedad de Grave, síndrome de Guillan-Barre, tiroiditis de Hashimoto, púrpura trombocitopénica idiopática, enfermedad intestinal inflamatoria, enfermedad de Kawasaki, síndrome de Meniere, enfermedad mixta del tejido conectivo, úlcera de Mooren, esclerosis múltiple, miastenia grave, pénfigo foliáceo, pénfigo vulgaris, 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 Sjörger, tiroiditis subaguda, oftalmia simpática, lupus eritematoso sistémico, arteritis de Takayasu, diabetes mellitus de tipo 1, vitiligo, enfermedad de Vogt-Koyanagi-Harada o granulomatosis de Wegener. Preferentemente la enfermedad autoinmunitaria es artritis reumatoide (AR), lupus eritematoso sistémico o púrpura trombocitopénica idiopática.

La IgG activa la ruta clásica del sistema del complemento. Los polipéptidos y polinucleótidos de EndoS pueden por lo tanto usarse para tratar enfermedades y afecciones en las que la activación del complemento es perjudicial para el paciente. Por ejemplo, los polipéptidos y polinucleótidos EndoS pueden usarse para tratar trastornos derivados de trasplante, por ejemplo rechazo de trasplante (tal como rechazo de aloinjerto o xenoinjerto agudo o crónico) y enfermedad de injerto contra huésped. El trastorno derivado de trasplante puede producirse debido al trasplante de un tejido o un órgano en un paciente.

Los polipéptidos y polinucleótidos EndoS también se usan en el tratamiento post-operatorio, por ejemplo en el tratamiento de pacientes que se han sometido a operaciones de derivación cardíaca.

Además, los polipéptidos y polinucleótidos EndoS pueden usarse para el tratamiento de hemofilia adquirida, es decir para eliminar la IgG en pacientes con hemofilia que han desarrollado anticuerpos contra factores de coagulación.

El sujeto es típicamente un sujeto mamífero, tal como un ratón, rata o primate (por ejemplo un tití o un mono). El sujeto puede ser un ser humano o un animal. Cuando el sujeto es un animal de laboratorio, tal como un ratón, una rata o un primate, este puede tratarse para inducir una enfermedad o una afección mediada por anticuerpos de IgG patógenos. Por ejemplo, puede usarse el modelo de ratón de artritis inducida por anticuerpos anti-CII (CAIA) descrito por Nandakumar et al. (Am. J. Pathol. 163(5): 1827-1837, 2003) o una versión modificada de este modelo.

Terapia y profilaxis

La presente invención proporciona el uso de polipéptidos y polinucleótidos EndoS para tratar o prevenir una enfermedad o afección mediada por anticuerpos de IgG patógenos, donde dicha enfermedad o afección es una enfermedad autoinmunitaria, rechazo de trasplante o hemofilia adquirida. El tratamiento puede ser terapéutico o

profiláctico.

El polipéptido o polinucleótido EndoS puede administrarse a un individuo para prevenir la aparición 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 dicho individuo. Una cantidad profilácticamente eficaz es una cantidad que previene la aparición de uno o más síntomas de una enfermedad o afección.

Una cantidad terapéuticamente eficaz del polipéptido o polinucleótido EndoS es una cantidad eficaz para mejorar uno o más síntomas de una enfermedad o afección. Preferentemente, el individuo a tratar es un ser humano.

El polipéptido o polinucleótido EndoS puede administrarse al sujeto mediante cualquier adecuado. El polipéptido o polinucleótido puede administrarse por vía enteral o parenteral tal como por vía oral, bucal, anal, pulmonar, intravenosa, intraarterial, intramuscular, intraperitoneal, intraarticular, tópica u otras vías de administración apropiadas.

El polipéptido o polinucleótido EndoS puede administrarse al sujeto de tal manera que la terapia se dirige a un lugar en particular. Por ejemplo, un polipéptido EndoS puede administrarse directamente al lugar de un órgano transplantado. El polipéptido EndoS puede inyectarse por vía local, por ejemplo por vía intraarticular o en una o más articulaciones. La administración local de la EndoS en las articulaciones se prefiere particularmente para la profilaxis o tratamiento de artritis reumatoide (AR). El polipéptido EndoS puede conjugarse con reactivos que se unen específicamente a cartilago. Para polinucleótidos EndoS, pueden usarse vectores de expresión que codifican el polipéptido EndoS para dirigir la expresión de EndoS a un tejido en particular, usando, por ejemplo, promotores específicos de tejido o ARNi.

La formulación de cualquiera de los polipéptidos y polinucleótidos mencionados en el presente documento dependerá de factores tales como la naturaleza del polipéptido o polinucleótido y la afección a tratar. El polipéptido o polinucleótido puede administrarse de diversas formas de dosificación. Este puede administrarse por vía oral (por ejemplo, como comprimidos, trociscos, pastillas para chupar, suspensiones acuosas u oleaginosas, polvos o gránulos dispersables), por vía parenteral, subcutánea, intravenosa, intramuscular, intraesternal, transdérmica o mediante técnicas de infusión. El polipéptido o polinucleótido puede administrarse como supositorios. Un médico podrá determinar la vía de administración necesaria para cada paciente en particular.

Típicamente el polipéptido o polinucleótido se formula para su uso con un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable y esto puede realizarse utilizando métodos rutinarios en la técnica farmacéutica. El vehículo o diluyente farmacéutico puede ser, por ejemplo, una solución isotónica. Por ejemplo, las formas orales sólidas pueden contener, junto con el compuesto activo, 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 sódico de almidón; mezclas efervescentes; pigmentos; edulcorantes; agentes humectantes, tales como lecitina, polisorbatos, laurilsulfatos; y, en general, sustancias no tóxicas y farmacológicamente inactivas usadas en las formulaciones farmacéuticas. Dichas preparaciones farmacéuticas pueden prepararse de manera conocida, por ejemplo, mediante procesos de mezclado, granulación, formación de comprimidos, recubrimiento con azúcar o recubrimiento con películas.

Las 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, etil oleato, glicoles, por ejemplo, propilenglicol, y se desea, una cantidad adecuada de clorhidrato de lidocaína.

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

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

Las formulaciones orales incluyen excipientes normalmente empleados tales como, por ejemplo, calidades farmacéuticas de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, celulosa, carbonato de magnesio y similares. Estas composiciones están en forma de soluciones, suspensiones, comprimidos, píldoras, cápsulas, formulaciones de liberación sostenida o polvos y contienen del 10% al 95% de ingrediente activo,

preferentemente del 25% al 70%. Cuando la composición farmacéutica está liofilizada, el material liofilizado puede reconstituirse antes de la administración, por ejemplo, una suspensión. La reconstitución se efectúa preferentemente en tampón.

- 5 Las cápsulas, comprimidos y píldoras para administración oral a un paciente pueden proporcionarse con un recubrimiento entérico que comprende, por ejemplo, Eudragit "S", Eudragit "L", acetato de celulosa, acetato ftálico de celulosa o hidropropilmetilcelulosa.

10 También pueden usarse composiciones farmacéuticas adecuadas para administración por inyección sin aguja, por ejemplo, por vía transdérmica.

15 Se administra una cantidad de polipéptido o polinucleótido terapéuticamente eficaz. La dosis puede determinarse de acuerdo con diversos parámetros, especialmente de acuerdo con el polipéptido o polinucleótido usado; la edad, peso y afección del paciente a tratar, la vía de administración; y el régimen requerido. De nuevo, un médico podrá determinar la vía de administración y la dosificación necesarias para cualquier paciente en particular. 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, peso y afecciones del sujeto a tratar, el tipo y la gravedad de la enfermedad y la frecuencia y vía de administración. Preferentemente, los niveles diarios de dosificación son de 5 mg a 2 g.

20 Las secuencias de nucleótidos EndoS descritas anteriormente y los vectores de expresión que contienen dichas secuencias también pueden usarse como formulaciones farmacéuticas como se ha indicado anteriormente. Preferentemente, el ácido nucleico, tal como ARN o ADN, en particular ADN, se proporciona en forma de un vector de expresión, que puede expresarse en las células del individuo a tratar. Las vacunas pueden comprender 25 secuencias desnudas de nucleótidos o estar en combinación con lípidos catiónicos, polímeros o sistemas de direccionamiento. Las vacunas pueden administrarse mediante cualquier técnica disponible. Por ejemplo, el ácido nucleico puede introducirse por inyección con aguja, preferentemente por vía intradérmica, subcutánea o intramuscular. Como alternativa, el ácido nucleico puede administrarse directamente a través de la piel usando un dispositivo de administración de ácido nucleico tal como administración de genes mediada por partículas. El ácido 30 nucleico puede administrarse por vía tópica a la piel, o a las superficies mucosas, por ejemplo, por administración intranasal, oral, intravaginal o intrarectal.

La captación de las construcciones de ácido nucleico puede potenciarse mediante diversas técnicas de transfección conocidas, por ejemplo, las que incluyen el uso de agentes de transfección. Como ejemplos de estos agentes se 35 incluyen agentes catiónicos, por ejemplo, fosfato cálcico y DEAE-Dextrano y lipofectantes, por ejemplo lipofectam y transfectam. La dosificación del ácido nucleico a administrar puede modificarse. Típicamente 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 administración génica mediada por partículas y de 10 µg a 1 mg para otras vías.

40 La presente invención también proporciona un método de tratamiento, *ex vivo*, de sangre extraída de un paciente que padece una enfermedad o afección mediada por anticuerpos de IgG patógenos, donde dicha enfermedad o afección es una enfermedad autoinmunitaria, rechazo de trasplante o hemofilia adquirida que comprende poner en contacto la sangre con un polipéptido EndoS. La EndoS puede por tanto usarse para el tratamiento extracorporeal de 45 sangre. La EndoS puede usarse para tratar uno o más componentes de la sangre, tal como plasma o suero. El método *ex vivo* descrito en el presente documento puede realizarse en sangre que ya se ha extraído del cuerpo de un paciente. Opcionalmente, la sangre o producto sanguíneo puede volver a introducirse en el paciente después de haberse puesto en contacto con un polipéptido EndoS.

50 Los siguientes ejemplos ilustran la invención:

Ejemplo 1: la EndoS hidroliza eficazmente la IgG en sangre humana

Para ser eficaz como un agente terapéutico contra la IgG patológica, se necesita que la EndoS esté activa a bajas concentraciones en un medio de sangre humana completa. Para investigar esto, se produjo EndoS recombinante 55 (rEndoS) sin la secuencia señal (es decir que tiene la secuencia de la SEC ID N°: 1) y se purificó como se ha descrito anteriormente (Collin & Olsén, 2001, Infect. Immun. 69: 7187-7189). Se incubaron concentraciones finales en aumento (0, 0,31, 0,63, 1,25, 2,5, 5, 10 y 20 µg/ml) de rEndoS en 500 µl de sangre humana heparinizada procedente de voluntarios sanos con rotación vertical durante 1 hora a 37 °C. Las muestras se centrifugaron a 720 x g durante 10 min a 4 °C seguido de purificación de IgG en plasma usando proteína G Sepharose de acuerdo con las 60 instrucciones del fabricante (GE Healthcare Biosciences, Uppsala, Suecia). No hubo diferencias en cuanto a la eficacia de unión con la proteína G entre la IgG completamente glucosilada y la EndoS tratada con IgG, lo que concuerda con hallazgos previos para las proteínas de unión a IgG, proteína H (de *S. pyogenes*) y proteína A (de *Staphylococcus aureus*) (Collin & Olsén 2001, EMBO J. 20: 3046-3055). La IgG purificada se separó en SDS-PAGE al 10%, se tiñó con Coomassie o se electrotransfirió sobre PVDF (Immobilon-P, Millipore, Bedford, MA). La IgG glucosilada se detectó usando 5 µg/ml de lectina de aglutinina de *Lens culinaris* (LCA) biotinilada y 1 µg/ml de 65 Estreptavidina-Peroxidasa de rábano picante (Vector Laboratories, Burlingame, CA) y sustrato de peroxidasa

SuperSignal West Pico (Pierce, Rockford, IL). Las membranas se analizaron usando un sistema de formación de imágenes Chemidoc XRS y un programa informático de análisis de formación de imágenes Quantity One (Bio-Rad, Hercules, CA).

Estos experimentos mostraron que concentraciones en aumento de EndoS modificaban gradualmente la cadena pesada de la IgG a una masa molecular aparente más pequeña de aproximadamente 3 kDa y que apenas podía observarse ninguna cadena pesada de tamaño completo por encima de una concentración de 2,5-5 µg/ml de rEndoS (Figura 5A). Los experimentos de transferencia con lectina LCA en las mismas muestras mostraron que concentraciones en aumento de rEndoS proporcionaban gradualmente una señal de carbohidrato más baja y que prácticamente no había señal por encima de concentraciones de rEndoS de 2,5-5 µg/ml (Figura 5B). Previamente se ha observado que la ausencia de señales de lectina se corresponde bien con la hidrólisis completa del glucano de la IgG, analizado mediante espectroscopía de masas (Collin & Fischetti, 2004, J. Biol. Chem. 279: 22558-22570). Además, el análisis de densidad máxima muestra una curva de respuesta a la dosis que se nivela a niveles de fondo aproximadamente a una concentración de rEndoS de 5 µg/ml (Figura 5C).

Estos resultados indican que 5 µg/ml de rEndoS al cabo de 1 hora hidrolizan completamente las reservas de IgG en sangre humana.

Suponiendo una concentración plasmática de IgG de 10 mg/ml esto significaría la hidrólisis completa de IgG al cabo de 1 hora a una proporción de rEndoS con respecto a IgG de 1:2000. Por tanto, la rEndoS muestra una hidrólisis notablemente eficaz del glucano de IgG funcionalmente importante en un medio complejo tal como sangre humana.

Ejemplo 2: la EndoS hidroliza eficazmente la IgG en conejos

Para corroborar adicionalmente el uso de la EndoS como un agente terapéutico, se investigó la actividad hidrolizante de la EndoS sobre el glucano de la IgG en la circulación de animales vivos. Conejos suecos de orejas caídas (loop), con un peso corporal de aproximadamente 3 kg, recibieron una inyección por vía intravenosa de 1 mg de rEndoS, correspondiente a una proporción aproximada de rEndoS con respecto a IgG de 1:2000 dado que la rEndoS se distribuye solo en sangre. Los animales no mostraron síntomas de enfermedad. Se extrajeron muestras de suero a las 0, 1, 2, 4, 6, 8 y 12 horas y a los 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8 y 10 días. Se analizó el estado de glucosilación de la IgG en suero usando análisis de SDS-PAGE y de transferencia con lectina, como se ha descrito anteriormente, para sangre humana.

Estos experimentos mostraron que antes de la inyección, la masa molecular aparente de las cadenas pesadas de la IgG era comparable a la de la IgG de conejo intacta completamente glucosilada (Figura 6A, Tinción, Hora 0 e IgG). Por otro lado, 1 hora después de la inyección de rEndoS hubo ya un cambio parcial de las cadenas pesadas de IgG hacia una banda de proteína más pequeña de aproximadamente 3 kDa. Cuatro horas después de la inyección de rEndoS, las cadenas pesadas de la IgG estaban completamente modificadas a la forma de masa molecular aparente más baja y esto se mantuvo hasta la última muestra el día 10 después de la inyección (Figura 6A, Tinción, desde la Hora 4 al Día 10). El análisis de transferencia con lectina de las mismas muestras reveló que la señal carbohidrato de la cadena pesada de la IgG era casi nula 6-8 horas después de la inyección de rEndoS y esto se mantuvo hasta el día 10 donde solo hubo un ligero aumento en la señal de la lectina (Figura 6A, Transferencia con LCA).

Para observar si la rEndoS era activa dentro de un animal que ya había estado expuesto a la enzima, se realizó una segunda inyección con 1 mg de rEndoS 35 días después de la primera inyección. De nuevo, los animales parecieron no estar afectados por la inyección y se extrajeron muestras de suero y se analizaron como se ha indicado anteriormente. El análisis SDS-PAGE reveló que antes de la segunda inyección, la cadena pesada de IgG migró como cadena pesada de IgG de conejo de control completamente glucosilada (Figura 6B, Hora 0, IgG). Después de 1 hora la cadena pesada de la IgG se modificó parcialmente hacia una masa molecular aparente menor de 3 kDa y después de 6-8 horas la cadena pesada de la IgG se modificó completamente y esta modificación se mantuvo hasta el día 10-14 después de esta segunda administración (Figura 6B, Tinción, desde la Hora 1 al Día 14). El análisis de transferencia con lectina reveló que la señal de carbohidrato de la cadena pesada de la IgG era casi nula 1-2 días después de la inyección de rEndoS y esto se mantuvo hasta el día 8 en el que hubo un ligero aumento en la señal de lectina con un ligero aumento adicional entre el día 10 y día 14 (Figura 6B, Transferencia con LCA, Día 1-14).

Para investigar si la rEndoS aún tenía actividad dentro de un animal que había estado expuesto por vía intravenosa dos veces a la rEndoS, se realizó una tercera inyección con 1 mg de rEndoS 130 días después de la primera inyección. De nuevo, los animales no se vieron afectados por la inyección y se extrajeron muestras de suero y se analizaron como se ha indicado anteriormente. El análisis SDS-PAGE reveló que antes de la tercera inyección, la cadena pesada de la IgG migró como cadena pesada de IgG de conejo de control completamente glucosilada (Figura 6C, Hora 0, IgG). Después de 1 hora la cadena pesada de la IgG se modificó parcialmente hacia una masa molecular inferior a 3 kDa y esta modificación se mantuvo hasta el día 8-10 después de esta tercera administración (Figura 6C, Tinción, desde la Hora 1 al Día 14). El análisis de transferencia con lectina reveló que la señal de carbohidrato de la cadena pesada de la IgG era nula una hora después de la tercera inyección de rEndoS y esto se mantuvo hasta el día 5 en el que hubo un ligero aumento en la señal de lectina con un aumento adicional entre el día 6 y 14 (Figura 6C, Transferencia con LCA, Día 1-14).

Considerados en su conjunto, estos resultados indican que concentraciones bajas de EndoS hidrolizan eficazmente el glucano de la cadena pesada del conjunto completo de IgG de conejo *in vivo*. Además, la exposición intravenosa previa a EndoS no afecta de manera significativa a la actividad enzimática *in vivo* de la EndoS.

5 **Ejemplo 3: la EndoS es activa en conejos a pesar de anticuerpos dirigidos contra la enzima**

Dado que la EndoS fue totalmente activa cuando se inyectó por segunda y tercera vez, era de interés determinar si esto se debía o no a una respuesta inmunitaria baja contra la enzima, o si esto era específico de anticuerpos contra la EndoS que no interfería con la actividad enzimática. Esto fue de particular interés dado que se sabe que
10 individuos tanto sanos como infectados con *S. pyogenes* tienen anticuerpos contra la EndoS (Åkesson et al, 2004, J. Infect. Dis. 189: 797-804).

Para investigar esto, la rEndoS purificada se separó en SDS-PAGE al 10% y se electrotransfirió sobre PVDF que se cortó en tiras de 1,5 mm. Las tiras se incubaron con diluciones de 1:500 de todas las muestras de suero procedentes
15 de la primera, segunda y tercera inyección, seguido de incubación con anticuerpos de cabra anti-conejo marcados con peroxidasa (Pierce). Las tiras se revelaron usando quimioluminiscencia como se ha descrito anteriormente para las transferencias con lectina.

Este experimento reveló que antes de la primera inyección ya había anticuerpos que reaccionaban con la rEndoS
20 (Figura 7, Primera inyección, Hora 0). Hubo solo un ligero aumento en la reactividad contra la rEndoS 10 días después de la inyección (Figura 7, Primera inyección y Figura 7A inserto), pero hubo un intervalo en la reactividad entre 6 y 8 horas después de la inyección (Figura 7, Primera inyección). Una posible razón de este hallazgo es que los anticuerpos específicos que se unen a la rEndoS están formando complejo y el sistema reticuloendotelial los elimina de la circulación. Justo antes de la segunda inyección de la rEndoS la reactividad contra la rEndoS fue
25 comparable o ligeramente mayor que antes de la primera inyección, y la reactividad no aumentó durante los 3 primeros días después de la inyección (Figura 7, Segunda inyección, Hora 0 - Día 3). Desde el día 4 al 14 después de la segunda inyección, la reactividad contra la rEndoS aumentó gradualmente (Figura 7, Segunda inyección, Día 4-14). Antes de la tercera inyección de rEndoS, la reactividad contra la rEndoS fue ligeramente mayor que antes de la segunda inyección, y la reactividad no aumentó durante el primer día después de la inyección (Figura 7, Tercera
30 inyección, Hora 0 - Día 1). Desde el día 2 al 14 después de la tercera inyección, la reactividad contra la rEndoS aumentó (Figura 7, Tercera Inyección, Día 2-14) aunque los niveles de señal elevados dificultaron la determinación del nivel de aumento.

Dados los niveles de señal muy altos en las transferencias de Western de las muestras obtenidas después de la
35 segunda y tercera inyección, también se analizaron por ELISA las muestras antes y después de las tres inyecciones. Para los experimentos ELISA, se usaron 2 µg de EndoS para revestir placas de microtitulación (Nunc, Roskilde, Dinamarca), seguido de bloqueo con 20 µg/ml de albúmina de suero bovina en PBS. Como antisuero primario se usaron los sueros de los animales antes de las inyecciones con EndoS y a los 0,5, 1, 5 y 10 días después de las inyecciones en diluciones en serie de 1:100 a 1:200.000. Como anticuerpos secundarios se usaron anticuerpos anti-
40 conejo de cabra marcados con peroxidasa (Pierce) y ABTS (Roche, IN) como sustrato de peroxidasa. Se generó una curva patrón para la IgG de conejo revistiendo placas de microtitulación, como se ha indicado anteriormente, con diluciones en serie de IgG policlonal de conejo (Sigma) y como anticuerpos secundarios anticuerpos de cabra anti-conejo marcados con peroxidasa. Las placas se analizaron a 405 nm en un lector multimarca Victor3 (Perkin-Elmer, Waltham, MS).

Los experimentos ELISA confirmaron que justo antes de la segunda inyección de EndoS, la reactividad contra la
45 EndoS fue comparable o ligeramente mayor que antes de la primera inyección y que la reactividad aún no había aumentado 5 días después de la inyección (Fig. 7A, Primera y segunda inyección). Desde el día 5 al 10 después de la segunda inyección, la reactividad contra la EndoS aumentó gradualmente (Fig. 7A, Segunda inyección, Día 5-10). Antes de la tercera inyección de EndoS, los datos ELISA confirmaron que la reactividad contra la EndoS fue
50 ligeramente mayor que antes de la segunda inyección y que la reactividad no aumentó durante el primer día después de la inyección (Fig. 7A, Tercera inyección, Día 0-1). Desde el día 5 al 10 después de la tercera inyección, los datos ELISA revelaron que la reactividad contra la EndoS aumentaba drásticamente (Fig. 7A, Tercera inyección, Día 5-10).

Estos resultados indican que hay anticuerpos dirigidos contra la EndoS en animales no expuestos y que la EndoS
55 suscita una respuesta inmunitaria en conejos después de exposición intravenosa repetida. Sin embargo, estos anticuerpos no interfieren con la actividad de la rEndoS en la circulación durante tres administraciones consecutivas. Adicionalmente, la administración repetida no afectó al tiempo de circulación de aproximadamente 12 horas (definido como la capacidad para detectar la EndoS) de la enzima, analizado por inmunoprecipitación y análisis de transferencia de Western de la EndoS de muestras de suero de conejo.

Ejemplo 4: la EndoS escinde anticuerpos monoclonales específicos de CII.

Se realizaron análisis SDS-PAGE y de transferencia con lecitina de anticuerpos IgG monoclonales (CIIC1 y M2139)
65 incubados con y sin EndoS y separados por SDS-PAGE al 10% y los resultados se muestran en la Figura 8.

La EndoS hidroliza específicamente el núcleo β -1,4-di-*N*-acetilquitobiosa del glucano unido a la asparagina de la inmunoglobulina (IgG). Después de eliminar la cadena lateral de carbohidrato usando EndoS, el peso molecular de la IgG se redujo. La diferencia en cuanto al tamaño de las cadenas γ puede observarse claramente en la imagen de tinción de gel entre la muestra de IgG tratada con EndoS e IgG no tratada.

Para confirmar que la modificación del tamaño de la IgG estaba producida por la actividad de la EndoS y que se producía por la retirada del resto de glucano de las cadenas γ en lugar de degradación proteolítica, se realizó un análisis de transferencia con lectina. La lectina de *Galanthus nivalis* (GNL) reconoce preferentemente restos de α -1,3 manosa encontrados en el glucano biantenarico en cadenas γ . El análisis de transferencia con lectina de las mismas muestras con la lectina de GNL reveló una señal significativamente reducida cuando se incubó con EndoS. Por otro lado, las cadenas γ aún estaban glucolisadas cuando se incubaron en ausencia de EndoS. Estos datos indican que la EndoS puede retirar estructuras que contienen α -1,3 manosa de las cadenas γ de la IgG de ratón.

Ejemplo 5: los anticuerpos desglucosilados se unen a cartilago *in vivo*

Este experimento se realizó para comprender si la retirada de los restos de carbohidrato de los anticuerpos monoclonales (mAb) de la IgG específicos de colágeno de tipo II (CII) afectaba a su capacidad de unión con el colágeno de tipo II *in vivo*.

Ratas neonatales de 1-2 días de vida recibieron una inyección i.p. de 1 mg de anticuerpo de unión a CII (tanto normal como tratado con EndoS). Veinticuatro horas después de la transferencia del anticuerpo, se diseccionaron las patas y se congelaron inmediatamente en compuesto OCT usando isopentano y hielo seco. Usando un protocolo convencional, se realizó análisis inmunohistoquímico usando, como sistema de detección, anticuerpo anti-kappa de ratón (187.1) biotinilado y anticuerpo secundario conjugado con HRP. Los resultados se muestran en la Figura 9. No hubo diferencias en el patrón de unión de los anticuerpos tratados y no tratados con EndoS con en el cartilago de articulación *in vivo*.

Ejemplo 6: pérdida de artritogenicidad por desglucosilación de anticuerpos monoclonales anti-CII

Los anticuerpos monoclonales específicos de CII inducen una forma de artritis aguda en ratones, la denominada artritis inducida por anticuerpos contra colágeno (CAIA) descrita en Nandakumar et al (2003). La CAIA se asemeja a la fase efectora de la artritis sin implicar a la fase de estimulación de la respuesta inmunitaria. Esta artritis mediada por anticuerpos depende de los componentes del complemento, Fc γ Rs, citocinas efectoras TNF- α e IL-1 β y de neutrófilos y macrófagos. La CAIA se usó en el presente estudio para comprender la importancia de la desglucosilación de la IgG por tratamiento con EndoS. Se usó un cóctel de anticuerpos monoclonales que contenían dos anticuerpos: el mAb M2139 (IgG2b), que se une al epítipo J1 (551-564; GERGAAGIAGPK), y ClIC1 (IgG2a), que se une al C1¹ (359-363; ARGLT) del colágeno de tipo II, para inducir la CAIA, una forma aguda de artritis.

Para determinar si la retirada de las cadenas laterales de carbohidrato afectaba a la capacidad inductora de artritis de los anticuerpos monoclonales patógenos con respecto al colágeno de tipo II, este cóctel de anticuerpos monoclonales, tratado o no con la EndoS, se inyectó a ratones. El día 0, grupos de ratones F1 macho (BALB/c X B10.Q) recibieron una inyección de 9 mg de anticuerpos monoclonales (M2139 y ClIC1) anti-CII no tratados (n=7) o tratados con EndoS (n=5). El día 5, todos los ratones recibieron una inyección i.p. de 50 μ g de LPS de *E.coli*. En la Figura 10 se muestra la frecuencia de artritis (a) y puntuación media de artritis (b).

Como puede observarse en las Figuras 10a y 10b, hubo una inhibición absoluta de artritis clínica en ratones F1 (BALB/c X B10.Q) que anteriormente mostraron ser muy susceptibles a la artritis inducida por anticuerpos contra colágeno (CAIA). Por tanto, es evidente que la retirada de carbohidratos de las cadenas γ de la IgG por la EndoS anula su capacidad inductora de artritis (artritogenicidad).

Para confirmar la pérdida de artritogenicidad de los anticuerpos monoclonales por retirada de carbohidratos de las cadenas laterales de la IgG, la CAIA se indujo en ratones B 10.RIII, que tenían otro fondo genético.

El día 0, ratones macho B10.RIII recibieron una inyección de 9 mg de anticuerpos monoclonales (M2139 y ClIC1) anti-CII no tratados (n=11) o tratados con EndoS (n=12). El día 5, todos los ratones recibieron una inyección i.p. de 50 mg de LPS de *E.coli*. En la Figura 11 se muestra la frecuencia de artritis (a) y la puntuación media de artritis (b). Como puede observarse en la Figura 11, en los ratones B10.RIII, hubo una frecuencia y gravedad de artritis inducida por el cóctel de los mAb tratados con EndoS significativamente reducidas en comparación con el cóctel de los mAb no tratados.

Ejemplo 7: Activación del complemento por anticuerpos monoclonales reactivos contra CII *in vitro*

Para comprender por qué la retirada del carbohidrato de las cadenas γ de la IgG reducía o anulaba la capacidad clínica inductora de artritis de los mAb, se realizaron experimentos *in vitro* con los anticuerpos tratados y no tratados con la EndoS para valorar su capacidad para inducir la activación del complemento.

La Figura 12 muestra la deposición del primer componente del complemento C1q sobre los mAb que se unen a (a) colágeno de tipo II o (b) directamente a una superficie de plástico. No hubo diferencias en cuanto a la activación del sistema del complemento entre los anticuerpos tratados (M2139D) y los no tratados (M2139) con EndoS. El mAb de ClIC1 (tanto tratado como no tratado con EndoS) no activó el complemento de ninguna manera. G11 (IgG2b) y L243 (IgG2a) son anticuerpos monoclonales de control que se unen a antígenos irrelevantes.

La Figura 13 muestra la deposición del producto escindido (C3b) del componente del complemento C3 sobre los mAb que se unen a (a) colágeno de tipo II o (b) directamente a una superficie de plástico. No hubo diferencias en cuanto a la activación del sistema del complemento entre los anticuerpos tratados (M2139D) y no tratados (M2139) con EndoS. El mAb de ClIC1 (tanto tratado como no tratado con EndoS) no activó el complemento de ninguna manera. G11 (IgG2b) y L243 (IgG2a) son anticuerpos monoclonales de control que se unen a antígenos irrelevantes.

Ejemplo 8: Efecto de la desglucosilación de anticuerpos monoclonales específicos de CII sobre la explosión oxidativa en neutrófilos (PMNL)

Para determinar si existía una diferencia funcional en cuanto a la capacidad de los anticuerpos glucosilados y desglucosilados para inducir la explosión oxidativa por leucocitos polimorfonucleares, PMNL (neutrófilos), se revistieron microplacas de poliestireno con anticuerpos tratados y no tratados con EndoS y se incubaron con sangre completa de ratones que tenían tres genotipos diferentes (FcγR+/+, FcγR-/- y FcγR+/-). Después se realizaron ensayos de explosión oxidativa utilizando FACS (Separación de Células Activada por Fluorescencia). Los PMNL se identificaron usando anticuerpos RB6.

Los resultados se muestran en la Figura 14. No hubo diferencias en cuanto a la activación de la explosión oxidativa entre los anticuerpos glucosilados y desglucosilados.

Ejemplo 9: Histología de patas de ratón

Para comprobar el estado histológico de las articulaciones de las patas de ratón que recibieron los mAb glucosilados o tratados con EndoS, se usó tinción convencional de eosina-hematoxilina para teñir secciones de 6 μm de articulaciones descalcificadas fijadas en formalina de ratones F1 (BALB/c x B10.Q) (n=3-4) a los que se inyectaron 9 mg de cóctel de anticuerpos no tratados, desglucosilados o una mezcla equivalente de anticuerpos no tratados y tratados con EndoS.

Los resultados mostraron que hubo una infiltración masiva de células y cartílago y erosión ósea en las articulaciones de ratones a los que se había inyectado anticuerpos glucosilados. Por otro lado, las patas de los ratones a los que se había inyectado anticuerpos tratados con EndoS mostraron solo una leve erosión ósea y no hubo infiltración masiva de células. El cartílago parecía normal en estos ratones.

Ejemplo 10: Eliminación de anticuerpos normales y desglucosilados in vivo

Para determinar si la artritogenicidad reducida de los anticuerpos desglucosilados se debía a una eliminación temprana y potenciada de estos anticuerpos de los ratones en comparación con los anticuerpos glucosilados, se realizó un análisis de anticuerpos de unión a colágeno de tipo II por ELISA (ensayo Inmunoabsorbente ligado a enzimas) usando los sueros extraídos de ratones B10.RIII los días 1 y 5. Los resultados se muestran en la Figura 15. No hubo diferencias entre los niveles de anticuerpos presentes en suero de ratones a los que se había inyectado los mAb glucosilados y tratados con EndoS, lo que sugería un nivel de eliminación normal de los anticuerpos desglucosilados de los ratones.

Ejemplo 11: Formación de complejo inmunitario por anticuerpos desglucosilados

Se deseaba determinar si existía alguna diferencia obvia entre los anticuerpos glucosilados y los tratados con EndoS, además de las diferencias de unión a moléculas FcγR. Es muy probable que la primera etapa en el suceso desencadenante inicial en el modelo de artritis por transferencia de anticuerpos sea la formación de complejos inmunitarios colágeno-IgG sobre la superficie del cartílago o en el sinovio. Los epítomos del colágeno se localizan en una estructura repetitiva formada sobre la superficie del cartílago, y por tanto es posible que los dos anticuerpos diferentes puedan formar complejos multiméricos sobre las superficies articulares favoreciendo la artritogenicidad mediante la activación óptima del complemento o mediante la unión a células portadoras de FcγR.

Para investigar la cuestión de la formación de complejos inmunitarios estables, se realizó la inmunodifusión sencilla de anticuerpos sobre agarosa. Se impregnó CII de rata en gel agarosa al 1% (temperatura de gelificación baja de agarosa 26-30 °C) a 1 mg/ml en PBS que contenía azida sódica al 0,05%. Se cargaron 25 ul de anticuerpos a una concentración 1 mg/ml por pocillo. El gel se tiñó con Azul de Coomassie. Los resultados mostraron que los anticuerpos desglucosilados no formaban complejos inmunitarios estables en comparación con los mAb glucosilados. Esta incapacidad de formar complejos inmunitarios estables podría ser otra explicación de la pérdida de artritogenicidad de los anticuerpos desglucosilados.

Ejemplo 12: la EndoS salva a ratones de trombocitopenia letal mediada por anticuerpos.

Habiendo establecido que la EndoS hidroliza eficazmente el glucano de la IgG *in vivo* y que los animales toleraban la administración de la enzima, se investigó el uso de la EndoS para tratar una enfermedad grave mediada por IgG. El modelo de enfermedad seleccionado fue un modelo de ratón de púrpura trombocitopénica inmunitaria (PTI). En este modelo, por vía intraperitoneal se inyectó IgG policlonal de conejo dirigido contra plaquetas de ratón (α PLT-IgG), lo que conduce a una trombocitopenia grave, sangrado y finalmente a la muerte a dosis más altas de IgG.

El antisuero de conejo contra plaquetas de ratón se adquirió en Inter-Cell Technologies (Jupiter, FL). La fracción de IgG se aisló de este suero usando la proteína G Sepharose. La pureza de la proteína se confirmó mediante análisis SDS-PAGE y la concentración de la proteína se determinó usando el Reactivo de Ensayo de Proteínas Advanced (Cytoskeleton, Denver, CO).

Para los experimentos que usaban IgG previamente tratada, la IgG de conejo anti-plaquetas de ratón (α PLT-IgG) purificada se incubó con GST-EndoS o GST purificado, a una proporción de enzima con respecto a sustrato de 1:500 a 37 °C durante 24 horas seguido de la retirada de GST-EndoS y GST en una proteína Glutación-Sepharose (GE Healthcare). La hidrólisis del glucano de la IgG se confirmó mediante SDS-PAGE y transferencia con lectina usando LCA como se ha descrito anteriormente. Ratones hembra BALB/c (de un peso aproximadamente 20 g) se enjaularon en condiciones de luz y temperatura convencionales, se alimentaron con el pienso convencional de laboratorio y se les proporcionó agua a discreción. A los animales se les administraron, por inyección intraperitoneal (i. p.), 1,2 mg de IgG anti-plaquetas de ratón (no tratados, tratados con EndoS o tratados con GST) en 0,25 ml de PBS. Se controlaron los sangrados mucocutáneos, la actividad física y el aislamiento del grupo de los animales y se registró el tiempo de supervivencia.

Inmediatamente antes de la inyección de IgG de conejo anti-plaquetas de ratón y a intervalos regulares durante los experimentos, se extrajeron muestras de sangre de los ratones. De la vena de la cola previamente calentada, se extrajeron 5 ml de sangre completa en tubos que contenían 45 μ l de citrato sódico/ácido cítrico 0,1 M en PBS (pH 6,5). La población plaquetaria en estas muestras de sangre se identificó por citometría de flujo. Las muestras se marcaron con anti-CD-61 PE de ratón de hámster (BD Biosciences, San Jose, CA) durante 10 min a temperatura ambiente. A cada tubo se añadieron diez μ l de partículas SPHERO^a Rainbow Calibration (BD Biosciences) para permitir el recuento. Las poblaciones de eritrocitos se sometieron a lisis utilizando UtiLyse^a (Dako Cytomation, Glostrup, Dinamarca) y las muestras se analizaron sobre un citómetro de flujo FacsCalibur (BD Biosciences) en el modo logarítmico. A continuación, en una cámara Neubauer, se realizó el recuento manual del número de plaquetas en las muestras de sangre después de la lisis de los eritrocitos.

En un experimento piloto, tres ratones BALB/c hembra recibieron una inyección de 1,2 mg de α PLT-IgG y se realizaron recuentos plaquetarios con el tiempo usando citometría de flujo y microscopía como se ha descrito anteriormente. Esto reveló que los tres ratones desarrollaron rápidamente trombocitopenia y que la muerte se producía 24 horas después de la administración de α PLT-IgG (Figura 16A).

A continuación, se ensayó si el tratamiento previo de α PLT-IgG con GST-EndoS o GST como un control, antes de la administración a ratones tenía algún efecto sobre el desarrollo de la enfermedad y la tasa de supervivencia. Todos los animales (n=4) que recibieron inyección de α PLT-IgG tratado con GST-EndoS sobrevivieron sin desarrollar ningún síntoma de enfermedad, mientras que todos los animales (n=4) que recibieron inyección de α PLT-IgG tratado con GST desarrollaron sangrado subcutáneo grave y murieron a las 24 horas (Figura 16B). Esto representa una diferencia estadísticamente significativa entre los dos grupos de animales (p=0,0082). Además, el análisis diario del recuento plaquetario por citometría de flujo reveló que α PLT-IgG tratado con GST-EndoS no tuvo ningún efecto significativo sobre el recuento plaquetario de ratón, mientras que α PLT-IgG tratado con GST produjo una disminución rápida en los recuentos plaquetarios (Figura 16C). Los resultados de estos experimentos demuestran que el tratamiento de α PLT-IgG con EndoS *ex vivo* anula la patogenicidad de anticuerpos de IgG, que en combinación con la actividad *in vivo* de la EndoS, nos estimuló a investigar si la EndoS podía administrarse a los ratones después del inicio de la enfermedad para prevenir el desarrollo de trombocitopenia letal. Los ratones (n=8 por grupo) recibieron una inyección de 1,2 mg de α PLT-IgG seguido de inyección intraperitoneal de 100 μ g de GST-EndoS o GST 3 horas después de la administración de α PLT-IgG. Todos los animales (8/8) que fueron tratados con GST murieron al cabo de dos días, mientras que solo murieron 2/8 animales tratados con GST-EndoS (Figura 17A). Esto representa una diferencia estadísticamente significativa en la tasa de supervivencia entre los grupos (p=0,003). Los análisis de SDS-PAGE y de transferencia con lectina de IgG total de ratones tratados con GST-EndoS o GST, mostraron que, en animales tratados con GST-EndoS, el glucano de la cadena pesada se hidrolizaba completamente a las 24, 48 y 72 horas después del tratamiento con α PLT-IgG, mientras que en los animales tratados con GST la IgG estaba completamente glucosilada hasta que se produjo la muerte a las 24 horas (Figura 17B). Adicionalmente, el recuento plaquetario, analizado por citometría de flujo, demostró que la administración de α PLT-IgG inducía un descenso rápido en el recuento plaquetario, pero en ratones tratados con GST-EndoS el recuento plaquetario comenzó a aumentar regularmente y alcanzó valores normales después de 2-3 días (Figura 17C).

Para cuestionar nuestra hipótesis adicionalmente, se intentó simular la situación clínica de pacientes con PTI. Cuando estos pacientes solicitaban atención médica, el recuento plaquetario a menudo era muy bajo y ya manifestaban complicaciones subcutáneas y otras relacionadas con el sangrado. Por lo tanto, se indujo la enfermedad en ratones (n=14) con α PLT-IgG, pero no se inició el tratamiento con GST-EndoS o GST hasta que los animales mostraron claramente hematomas cutáneos visibles 5-7 horas después de inyección con α PLT-IgG. En estos experimentos 5/7 de los ratones tratados con GST-EndoS sobrevivieron y se recuperaron, mientras que todos (7/7) los ratones tratados con GST murieron al cabo de 2 días, representando de nuevo una diferencia estadísticamente significativa en la tasa de supervivencia entre los dos grupos (p=0,0015) (Figura 17D). Combinados, nuestros resultados demuestran que las propiedades de patogenicidad de α PLT-IgG en ratones dependen del estado de glucosilaciones de los anticuerpos y que la EndoS reduce drásticamente, tanto *ex vivo* como *in vivo*, la patogenicidad de los anticuerpos IgG antiplaquetarios. En resumen, la EndoS tuvo efectos positivos drásticos sobre el recuento plaquetario y la supervivencia, tanto cuando los anticuerpos patógenos se trataron previamente con la enzima como cuando la EndoS se administraba antes o después durante la enfermedad. Que sepan los inventores, esta es la primera vez que la hidrólisis *in vivo* de los glucanos de la IgG se ha utilizado como un tratamiento experimental de una enfermedad autoinmunitaria.

Los mecanismos causantes de los efectos positivos de la EndoS son, desde un punto de vista teórico, bastante obvios, ya que los inventores han descubierto anteriormente que la hidrólisis de la IgG por la EndoS inhibe la unión de todas las subclases de la IgG con los FcR y también reduce la activación del complemento. Lo que es de particular interés es que la EndoS no solo inhibe la unión de la IgG con los FcR, sino que también puede liberar la IgG ya unida a FcR por hidrólisis del glucano de la cadena pesada. También debe observarse que esto parece ser una interacción IgG-FcR que al igual que otras no resulta afectada; en determinadas circunstancias, la IgG hidrolizada por EndoS, se une mejor al FcR11b humano que la IgG no hidrolizada (datos no mostrados). En el contexto de actividad antiinflamatoria esto podría ser importante, ya que las interacciones de IgG con FcR11b han mostrado ser importantes para la actividad antiinflamatoria de la inmunoglobulina intravenosa (IGIV) que se usa para tratar afecciones autoinmunitarias. Sin ligarse a ninguna hipótesis, los inventores sugieren que, en determinadas circunstancias, la EndoS puede tener una doble actividad antiinflamatoria inhibiendo directamente la unión de la IgG patógena con los FcR activadores y modificándose hacia la acción inhibidora mediada a través de FcR11b.

Las propiedades de la EndoS constituyen una alternativa atractiva con respecto a terapias actuales de afecciones en las que participan anticuerpos patógenos, especialmente a la luz de los diversos estudios recientes que establecen que el glucano de la IgG es clave en la modulación efectora de la IgG. Esto incluye los descubrimientos de los propios inventores ya que la hidrólisis de este glucano por la EndoS apenas anula la activación del complemento a través de la ruta clásica y reduce la unión con receptores de Fc sobre los leucocitos. Basándose en las observaciones de los inventores, se demuestra que la EndoS puede usarse para tratar afecciones en las que los anticuerpos de IgG desempeñan una función patológica, incluyendo enfermedades autoinmunitarias, como las ilustradas en el presente documento mediante PT y rechazo agudo del aloinjerto de órganos mediado por anticuerpos.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> HANSA MEDICAL AB

<120> TRATAMIENTO

<130> N99679 SER/SJB

<160> 3

<170> Patent en versión 3.0

<210> 1

<211> 959

<212> PRT

<213> Streptococcus pyogenes

<400> 1

Glu	Glu	Lys	Thr	Val	Gln	Val	Gln	Lys	Gly	Leu	Pro	Ser	Ile	Asp	Ser
1				5					10					15	
Leu	His	Tyr	Leu	Ser	Glu	Asn	Ser	Lys	Lys	Glu	Phe	Lys	Glu	Glu	Leu
			20					25					30		
Ser	Lys	Ala	Gly	Gln	Glu	Ser	Gln	Lys	Val	Lys	Glu	Ile	Leu	Ala	Lys
		35					40					45			
Ala	Gln	Gln	Ala	Asp	Lys	Gln	Ala	Gln	Glu	Leu	Ala	Lys	Met	Lys	Ile
	50					55					60				
Pro	Glu	Lys	Ile	Pro	Met	Lys	Pro	Leu	His	Gly	Pro	Leu	Tyr	Gly	Gly
65					70					75				80	
Tyr	Phe	Arg	Thr	Trp	His	Asp	Lys	Thr	Ser	Asp	Pro	Thr	Glu	Lys	Asp
			85						90				95		
Lys	Val	Asn	Ser	Met	Gly	Glu	Leu	Pro	Lys	Glu	Val	Asp	Leu	Ala	Phe
			100					105					110		
Ile	Phe	His	Asp	Trp	Thr	Lys	Asp	Tyr	Ser	Leu	Phe	Trp	Lys	Glu	Leu
		115					120					125			
Ala	Thr	Lys	His	Val	Pro	Lys	Leu	Asn	Lys	Gln	Gly	Thr	Arg	Val	Ile
	130					135					140				
Arg	Thr	Ile	Pro	Trp	Arg	Phe	Leu	Ala	Gly	Gly	Asp	Asn	Ser	Gly	Ile
145					150					155				160	

Ala	Glu	Asp	Thr	Ser	Lys	Tyr	Pro	Asn	Thr	Pro	Glu	Gly	Asn	Lys	Ala	165	170	175
Leu	Ala	Lys	Ala	Ile	Val	Asp	Glu	Tyr	Val	Tyr	Lys	Tyr	Asn	Leu	Asp	180	185	190
Gly	Leu	Asp	Val	Asp	Val	Glu	His	Asp	Ser	Ile	Pro	Lys	Val	Asp	Lys	195	200	205
Lys	Glu	Asp	Thr	Ala	Gly	Val	Glu	Arg	Ser	Ile	Gln	Val	Phe	Glu	Glu	210	215	220
Ile	Gly	Lys	Leu	Ile	Gly	Pro	Lys	Gly	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Leu	Phe	225	230	235
Ile	Met	Asp	Ser	Thr	Tyr	Met	Ala	Asp	Lys	Asn	Pro	Leu	Ile	Glu	Arg	245	250	255
Gly	Ala	Pro	Tyr	Ile	Asn	Leu	Leu	Leu	Val	Gln	Val	Tyr	Gly	Ser	Gln	260	265	270
Gly	Glu	Lys	Gly	Gly	Trp	Glu	Pro	Val	Ser	Asn	Arg	Pro	Glu	Lys	Thr	275	280	285
Met	Glu	Glu	Arg	Trp	Gln	Gly	Tyr	Ser	Lys	Tyr	Ile	Arg	Pro	Glu	Gln	290	295	300
Tyr	Met	Ile	Gly	Phe	Ser	Phe	Tyr	Glu	Glu	Asn	Ala	Gln	Glu	Gly	Asn	305	310	315
Leu	Trp	Tyr	Asp	Ile	Asn	Ser	Arg	Lys	Asp	Glu	Asp	Lys	Ala	Asn	Gly	325	330	335
Ile	Asn	Thr	Asp	Ile	Thr	Gly	Thr	Arg	Ala	Glu	Arg	Tyr	Ala	Arg	Trp	340	345	350
Gln	Pro	Lys	Thr	Gly	Gly	Val	Lys	Gly	Gly	Ile	Phe	Ser	Tyr	Ala	Ile	355	360	365
Asp	Arg	Asp	Gly	Val	Ala	His	Gln	Pro	Lys	Lys	Tyr	Ala	Lys	Gln	Lys	370	375	380
Glu	Phe	Lys	Asp	Ala	Thr	Asp	Asn	Ile	Phe	His	Ser	Asp	Tyr	Ser	Val	385	390	395
Ser	Lys	Ala	Leu	Lys	Thr	Val	Met	Leu	Lys	Asp	Lys	Ser	Tyr	Asp	Leu	405	410	415
Ile	Asp	Glu	Lys	Asp	Phe	Pro	Asp	Lys	Ala	Leu	Arg	Glu	Ala	Val	Met	420	425	430
Ala	Gln	Val	Gly	Thr	Arg	Lys	Gly	Asp	Leu	Glu	Arg	Phe	Asn	Gly	Thr	435	440	445
Leu	Arg	Leu	Asp	Asn	Pro	Ala	Ile	Gln	Ser	Leu	Glu	Gly	Leu	Asn	Lys	450	455	460
Phe	Lys	Lys	Leu	Ala	Gln	Leu	Asp	Leu	Ile	Gly	Leu	Ser	Arg	Ile	Thr			

465		470		475		480									
Lys	Leu	Asp	Arg	Ser	Val	Leu	Pro	Ala	Asn	Met	Lys	Pro	Gly	Lys	Asp
		485							490					495	
Thr	Leu	Glu	Thr	Val	Leu	Glu	Thr	Tyr	Lys	Lys	Asp	Asn	Lys	Glu	Glu
		500						505					510		
Pro	Ala	Thr	Ile	Pro	Pro	Val	Ser	Leu	Lys	Val	Ser	Gly	Leu	Thr	Gly
		515					520					525			
Leu	Lys	Glu	Leu	Asp	Leu	Ser	Gly	Phe	Asp	Arg	Glu	Thr	Leu	Ala	Gly
	530					535					540				
Leu	Asp	Ala	Ala	Thr	Leu	Thr	Ser	Leu	Glu	Lys	Val	Asp	Ile	Ser	Gly
545					550					555					560
Asn	Lys	Leu	Asp	Leu	Ala	Pro	Gly	Thr	Glu	Asn	Arg	Gln	Ile	Phe	Asp
			565					570					575		
Thr	Met	Leu	Ser	Thr	Ile	Ser	Asn	His	Val	Gly	Ser	Asn	Glu	Gln	Thr
		580						585					590		
Val	Lys	Phe	Asp	Lys	Gln	Lys	Pro	Thr	Gly	His	Tyr	Pro	Asp	Thr	Tyr
	595						600					605			
Gly	Lys	Thr	Ser	Leu	Arg	Leu	Pro	Val	Ala	Asn	Glu	Lys	Val	Asp	Leu
	610					615					620				
Gln	Ser	Gln	Leu	Leu	Phe	Gly	Thr	Val	Thr	Asn	Gln	Gly	Thr	Leu	Ile
625					630					635					640
Asn	Ser	Glu	Ala	Asp	Tyr	Lys	Ala	Tyr	Gln	Asn	His	Lys	Ile	Ala	Gly
			645						650					655	
Arg	Ser	Phe	Val	Asp	Ser	Asn	Tyr	His	Tyr	Asn	Asn	Phe	Lys	Val	Ser
		660						665					670		
Tyr	Glu	Asn	Tyr	Thr	Val	Lys	Val	Thr	Asp	Ser	Thr	Leu	Gly	Thr	Thr
	675						680					685			
Thr	Asp	Lys	Thr	Leu	Ala	Thr	Asp	Lys	Glu	Glu	Thr	Tyr	Lys	Val	Asp
	690					695					700				
Phe	Phe	Ser	Pro	Ala	Asp	Lys	Thr	Lys	Ala	Val	His	Thr	Ala	Lys	Val
705				710					715						720
Ile	Val	Gly	Asp	Glu	Lys	Thr	Met	Met	Val	Asn	Leu	Ala	Glu	Gly	Ala
			725						730				735		
Thr	Val	Ile	Gly	Gly	Ser	Ala	Asp	Pro	Val	Asn	Ala	Arg	Lys	Val	Phe
		740					745					750			
Asp	Gly	Gln	Leu	Gly	Ser	Glu	Thr	Asp	Asn	Ile	Ser	Leu	Gly	Trp	Asp
	755						760					765			
Ser	Lys	Gln	Ser	Ile	Ile	Phe	Lys	Leu	Lys	Glu	Asp	Gly	Leu	Ile	Lys
	770					775						780			

```

His Trp Arg Phe Phe Asn Asp Ser Ala Arg Asn Pro Glu Thr Thr Asn
785                      790                      795                      800
Lys Pro Ile Gln Glu Ala Ser Leu Gln Ile Phe Asn Ile Lys Asp Tyr
                      805                      810                      815
Asn Leu Asp Asn Leu Leu Glu Asn Pro Asn Lys Phe Asp Asp Glu Lys
                      820                      825                      830
Tyr Trp Ile Thr Val Asp Thr Tyr Ser Ala Gln Gly Glu Arg Ala Thr
                      835                      840                      845
Ala Phe Ser Asn Thr Leu Asn Asn Ile Thr Ser Lys Tyr Trp Arg Val
                      850                      855                      860
Val Phe Asp Thr Lys Gly Asp Arg Tyr Ser Ser Pro Val Val Pro Glu
865                      870                      875                      880
Leu Gln Ile Leu Gly Tyr Pro Leu Pro Asn Ala Asp Thr Ile Met Lys
                      885                      890                      895
Thr Val Thr Thr Ala Lys Glu Leu Ser Gln Gln Lys Asp Lys Phe Ser
                      900                      905                      910
Gln Lys Met Leu Asp Glu Leu Lys Ile Lys Glu Met Ala Leu Glu Thr
                      915                      920                      925
Ser Leu Asn Ser Lys Ile Phe Asp Val Thr Ala Ile Asn Ala Asn Ala
                      930                      935                      940
Gly Val Leu Lys Asp Cys Ile Glu Lys Arg Gln Leu Leu Lys Lys
945                      950                      955

```

<210> 2
 <211> 995
 <212> PRT
 <213> Streptococcus pyogenes

<400> 2

```

Met Asp Lys His Leu Leu Val Lys Arg Thr Leu Gly Cys Val Cys Ala
1                      5                      10                      15
Ala Thr Leu Met Gly Ala Ala Leu Ala Thr His His Asp Ser Leu Asn
                      20                      25                      30
Thr Val Lys Ala Glu Glu Lys Thr Val Gln Val Gln Lys Gly Leu Pro
                      35                      40                      45
Ser Ile Asp Ser Leu His Tyr Leu Ser Glu Asn Ser Lys Lys Glu Phe
                      50                      55                      60
Lys Glu Glu Leu Ser Lys Ala Gly Gln Glu Ser Gln Lys Val Lys Glu

```

65		70		75		80									
Ile	Leu	Ala	Lys	Ala	Gln	Gln	Ala	Asp	Lys	Gln	Ala	Gln	Glu	Leu	Ala
			85					90						95	
Lys	Met	Lys	Ile	Pro	Glu	Lys	Ile	Pro	Met	Lys	Pro	Leu	His	Gly	Pro
			100					105						110	
Leu	Tyr	Gly	Gly	Tyr	Phe	Arg	Thr	Trp	His	Asp	Lys	Thr	Ser	Asp	Pro
			115					120						125	
Thr	Glu	Lys	Asp	Lys	Val	Asn	Ser	Met	Gly	Glu	Leu	Pro	Lys	Glu	Val
			130					135						140	
Asp	Leu	Ala	Phe	Ile	Phe	His	Asp	Trp	Thr	Lys	Asp	Tyr	Ser	Leu	Phe
145						150					155				160
Trp	Lys	Glu	Leu	Ala	Thr	Lys	His	Val	Pro	Lys	Leu	Asn	Lys	Gln	Gly
						165					170				175
Thr	Arg	Val	Ile	Arg	Thr	Ile	Pro	Trp	Arg	Phe	Leu	Ala	Gly	Gly	Asp
						180								190	
Asn	Ser	Gly	Ile	Ala	Glu	Asp	Thr	Ser	Lys	Tyr	Pro	Asn	Thr	Pro	Glu
			195					200						205	
Gly	Asn	Lys	Ala	Leu	Ala	Lys	Ala	Ile	Val	Asp	Glu	Tyr	Val	Tyr	Lys
			210					215						220	
Tyr	Asn	Leu	Asp	Gly	Leu	Asp	Val	Asp	Val	Glu	His	Asp	Ser	Ile	Pro
225						230					235				240
Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Glu	Asp	Thr	Ala	Gly	Val	Glu	Arg	Ser	Ile	Gln
						245					250				255
Val	Phe	Glu	Glu	Ile	Gly	Lys	Leu	Ile	Gly	Pro	Lys	Gly	Val	Asp	Lys
						260					265				270
Ser	Arg	Leu	Phe	Ile	Met	Asp	Ser	Thr	Tyr	Met	Ala	Asp	Lys	Asn	Pro
						275								285	
Leu	Ile	Glu	Arg	Gly	Ala	Pro	Tyr	Ile	Asn	Leu	Leu	Leu	Val	Gln	Val
						290								295	
Tyr	Gly	Ser	Gln	Gly	Glu	Lys	Gly	Gly	Trp	Glu	Pro	Val	Ser	Asn	Arg
305						310					315				320
Pro	Glu	Lys	Thr	Met	Glu	Glu	Arg	Trp	Gln	Gly	Tyr	Ser	Lys	Tyr	Ile
						325					330				335
Arg	Pro	Glu	Gln	Tyr	Met	Ile	Gly	Phe	Ser	Phe	Tyr	Glu	Glu	Asn	Ala
						340					345				350
Gln	Glu	Gly	Asn	Leu	Trp	Tyr	Asp	Ile	Asn	Ser	Arg	Lys	Asp	Glu	Asp
						355					360				365
Lys	Ala	Asn	Gly	Ile	Asn	Thr	Asp	Ile	Thr	Gly	Thr	Arg	Ala	Glu	Arg
						370								375	
															380

Tyr	Ala	Arg	Trp	Gln	Pro	Lys	Thr	Gly	Gly	Val	Lys	Gly	Gly	Ile	Phe	385		390		395		400
Ser	Tyr	Ala	Ile	Asp	Arg	Asp	Gly	Val	Ala	His	Gln	Pro	Lys	Lys	Tyr		405		410		415	
Ala	Lys	Gln	Lys	Glu	Phe	Lys	Asp	Ala	Thr	Asp	Asn	Ile	Phe	His	Ser		420		425		430	
Asp	Tyr	Ser	Val	Ser	Lys	Ala	Leu	Lys	Thr	Val	Met	Leu	Lys	Asp	Lys		435		440		445	
Ser	Tyr	Asp	Leu	Ile	Asp	Glu	Lys	Asp	Phe	Pro	Asp	Lys	Ala	Leu	Arg		450		455		460	
Glu	Ala	Val	Met	Ala	Gln	Val	Gly	Thr	Arg	Lys	Gly	Asp	Leu	Glu	Arg	465		470		475		480
Phe	Asn	Gly	Thr	Leu	Arg	Leu	Asp	Asn	Pro	Ala	Ile	Gln	Ser	Leu	Glu		485		490		495	
Gly	Leu	Asn	Lys	Phe	Lys	Lys	Leu	Ala	Gln	Leu	Asp	Leu	Ile	Gly	Leu		500		505		510	
Ser	Arg	Ile	Thr	Lys	Leu	Asp	Arg	Ser	Val	Leu	Pro	Ala	Asn	Met	Lys		515		520		525	
Pro	Gly	Lys	Asp	Thr	Leu	Glu	Thr	Val	Leu	Glu	Thr	Tyr	Lys	Lys	Asp		530		535		540	
Asn	Lys	Glu	Glu	Pro	Ala	Thr	Ile	Pro	Pro	Val	Ser	Leu	Lys	Val	Ser	545		550		555		560
Gly	Leu	Thr	Gly	Leu	Lys	Glu	Leu	Asp	Leu	Ser	Gly	Phe	Asp	Arg	Glu		565		570		575	
Thr	Leu	Ala	Gly	Leu	Asp	Ala	Ala	Thr	Leu	Thr	Ser	Leu	Glu	Lys	Val		580		585		590	
Asp	Ile	Ser	Gly	Asn	Lys	Leu	Asp	Leu	Ala	Pro	Gly	Thr	Glu	Asn	Arg		595		600		605	
Gln	Ile	Phe	Asp	Thr	Met	Leu	Ser	Thr	Ile	Ser	Asn	His	Val	Gly	Ser	610		615		620		
Asn	Glu	Gln	Thr	Val	Lys	Phe	Asp	Lys	Gln	Lys	Pro	Thr	Gly	His	Tyr	625		630		635		640
Pro	Asp	Thr	Tyr	Gly	Lys	Thr	Ser	Leu	Arg	Leu	Pro	Val	Ala	Asn	Glu		645		650		655	
Lys	Val	Asp	Leu	Gln	Ser	Gln	Leu	Leu	Phe	Gly	Thr	Val	Thr	Asn	Gln		660		665		670	
Gly	Thr	Leu	Ile	Asn	Ser	Glu	Ala	Asp	Tyr	Lys	Ala	Tyr	Gln	Asn	His		675		680		685	
Lys	Ile	Ala	Gly	Arg	Ser	Phe	Val	Asp	Ser	Asn	Tyr	His	Tyr	Asn	Asn							

690	695	700
Phe Lys Val Ser Tyr	Glu Asn Tyr Thr Val	Lys Val Thr Asp Ser Thr
705	710	715
Leu Gly Thr Thr Thr	Asp Lys Thr Leu Ala	Thr Asp Lys Glu Glu Thr
	725	730
Tyr Lys Val Asp Phe	Phe Ser Pro Ala	Asp Lys Thr Lys Ala Val His
	740	745
Thr Ala Lys Val Ile	Val Gly Asp Glu Lys	Thr Met Met Val Asn Leu
	755	760
Ala Glu Gly Ala Thr	Val Ile Gly Gly Ser	Ala Asp Pro Val Asn Ala
	770	775
Arg Lys Val Phe Asp	Gly Gln Leu Gly Ser	Glu Thr Asp Asn Ile Ser
785	790	795
Leu Gly Trp Asp Ser	Lys Gln Ser Ile Ile	Phe Lys Leu Lys Glu Asp
	805	810
Gly Leu Ile Lys His	Trp Arg Phe Phe	Asn Asp Ser Ala Arg Asn Pro
	820	825
Glu Thr Thr Asn Lys	Pro Ile Gln Glu Ala	Ser Leu Gln Ile Phe Asn
	835	840
Ile Lys Asp Tyr Asn	Leu Asp Asn Leu Leu	Glu Asn Pro Asn Lys Phe
	850	855
Asp Asp Glu Lys Tyr	Trp Ile Thr Val Asp	Thr Tyr Ser Ala Gln Gly
865	870	875
Glu Arg Ala Thr Ala	Phe Ser Asn Thr Leu	Asn Asn Ile Thr Ser Lys
	885	890
Tyr Trp Arg Val Val	Phe Asp Thr Lys Gly	Asp Arg Tyr Ser Ser Pro
	900	905
Val Val Pro Glu Leu	Gln Ile Leu Gly Tyr	Pro Leu Pro Asn Ala Asp
	915	920
Thr Ile Met Lys Thr	Val Thr Thr Ala Lys	Glu Leu Ser Gln Gln Lys
	930	935
Asp Lys Phe Ser Gln	Lys Met Leu Asp Glu	Leu Lys Ile Lys Glu Met
945	950	955
Ala Leu Glu Thr Ser	Leu Asn Ser Lys Ile	Phe Asp Val Thr Ala Ile
	965	970
Asn Ala Asn Ala Gly	Val Leu Lys Asp Cys	Ile Glu Lys Arg Gln Leu
	980	985
Leu Lys Lys		990
	995	

<210> 3
 <211> 3403
 <212> ADN

<213> Streptococcus pyogenes

<400> 3

```

ctcttttgtc ctgccatgga tggcaggttg gcaaaaaaat gagaaaagcc taaaaacctt
60
aaatttgtgt tattttacct atactttgta ccttggtttt ttaataaag tgttggtata
120
cttaaggcga actataggaa tgcgcttaca tggatggtat atcaactggg aagccatgac
180
ttagtaccaa aaataaggag tgtccaaatg gataaacatt tgttggtaaa aagaacacta
240
gggtgtgttt gtgctgcaac gttgatggga gctgccttag cgaccacca tgattcactc
300
aatactgtaa aagcggagga gaagactggt caggttcaga aaggattacc ttctatcgat
360
agcttgcatc atctgtcaga gaatagcaaa aaagaattta aagaagaact ctcaaaagcg
420
gggcaagaat ctcaaaaggt caaagagata ttagcaaaaag ctcagcaggc agataaacia
480
gctcaagaac ttgccaaaat gaaaattcct gagaaaatac cgatgaaacc gttacatggt
540
cctctctacg gtggttactt tagaacttgg catgacaaaa catcagatcc aacagaaaaa
600
gacaaagtta actcgatggg agagcttcct aaagaagtag atctagcctt tattttccac
660
gattggacaa aagattatag ccttttttgg aaagaattgg ccaccaaaca tgtgccaaag
720
ttaacaagc aagggacacg tgtcattcgt accattccat ggcgtttcct agctgggggt
780
gataacagtg gtattgcaga agataccagt aaatacccaa atacaccaga gggaaataaa
840
gcttagcca aagctattgt tgatgaatat gtttataaat acaaccttga tggcttagat
900

```

gtggatgttg aacatgatag tattccaaaa gttgacaaaa aagaagatac agcagggcga
960
gaacgctcta ttcaagtgtt tgaagaaatt gggaaattaa ttggacaaaa aggtgttgat
1020
aaatcgcggt tatttattat ggatagcacc tacatggctg ataaaaaccc attgattgag
1080
cgaggagctc cttatattaa ttattactg gtacaggtct atggttcaca aggagagaaa
1140
ggtggttggg agcctgtttc taatcgacct gaaaaaaca tggaagaacg atggcaaggt
1200
tatagcaagt atattcgtcc tgaacaatac atgattggtt tttctttcta tgaggaaaat
1260
gctcaagaag ggaatctttg gtatgatatt aattctcgca aggacgagga caaagcaa
1320
ggaattaaca ctgacataac tggaacgct gccgaacggt atgcaagggt gcaacctaa
1380
acaggtgggg ttaagggagg tatcttctcc tacgctattg accgagatgg tgtagctcat
1440
caacctaaaa aatatgctaa acagaaagag tttaaggacg caactgataa catcttccac
1500
tcagattata gtgtctccaa ggcattaaag acagttatgc taaaagataa gtcgtatgat
1560
ctgattgatg agaaagattt cccagataag gctttgcgag aagctgtgat ggcgcaggtt
1620
ggaaccagaa aaggtgattt ggaacgtttc aatggcacat tacgattgga taatccagcg
1680
attcaaagtt tagaaggctt aaataaattt aaaaaattag ctcaattaga cttgattggc
1740
ttatctcgca ttacaaagct cgaccgttct gttttacccg ctaatatgaa gccaggcaaa
1800
gataccttgg aaacagttct tgaaacctat aaaaaggata acaaagaaga acctgctact
1860
atccccaccag tatctttgaa ggtttctggt ttaactggtc tgaaagaatt agatttgtca
1920
ggttttgacc gtgaaacctt ggctgggtct gatgccgcta ctctaacgct tttagaaaaa
1980
gttgatattt ctggcaacaa acttgatttg gtcacaggaa cagaaaatcg acaaattttt
2040

gatactatgc tatcaactat cagcaatcat gttggaagca atgaacaaac agtgaaattt
 2100
 gacaagcaaa aaccaactgg gcattaccca gatacctatg ggaaaactag tctgcgctta
 2160
 ccagtggcaa atgaaaaagt tgatttgcaa agccagcttt tgtttgggac tgtgacaaat
 2220
 caaggaaccc taatcaatag cgaagcagac tataaggctt accaaaatca taaaattgct
 2280
 ggacgtagct ttgttgattc aaactatcat tacaataact ttaaagtttc ttatgagaac
 2340
 tataccgtta aagtaactga ttccacattg ggaaccacta ctgacaaaac gctagcaact
 2400
 gataaagaag agacctataa ggttgacttc tttagcccag cagataagac aaaagctggt
 2460
 catactgcta aagtgattgt tggtagcgaa aaaaccatga tggttaattt ggcagaaggc
 2520
 gcaacagtta ttggaggaag tgctgatcct gtaaagtcaa gaaaggtatt tgatgggcaa
 2580
 ctgggcagtg agactgataa tatctcttta ggatgggatt ctaagcaaag tatttatatt
 2640
 aaattgaaag aagatggatt aataaagcat tggcgtttct tcaatgattc agcccgaat
 2700
 cctgagacaa ccaataaacc tattcaggaa gcaagtctac aaatttttaa tatcaaagat
 2760
 tataatctag ataatttggt ggaaaatccc aataaatttg atgatgaaaa atattggatt
 2820
 actgtagata cttacagtgc acaaggagag agagctactg cattcagtaa tacattaaat
 2880
 aatattacta gtaaattattg gcgagttgtc tttgatacta aaggagatag atatagttcg
 2940
 ccagtagtcc ctgaactcca aatttttaggt tatccgttac ctaacgccga cactatcatg
 3000
 aaaacagtaa ctactgctaa agagttatct caacaaaaag ataagttttc tcaaagatg
 3060
 cttgatgagt taaaaataaa agagatggct ttagaaactt ctttgaacag taagattttt
 3120
 gatgtaactg ctattaatgc taatgctgga gttttgaaag attgtattga gaaaaggcag
 3180

ctgctaaaaa aataaaca aa gtaactttct tagatagcaa cattcagatt aaattaacaa
3240
aatgtgacta tgataaaggt ttgctggaat tgattaacca aaagactaaa aatctgagat
3300
gaatagtccc agatTTTTtag tcttttatag gttttgatga cataaagcta aataatcggt
3360
agactaccag aaagggcgct tgtccgtgag acatggctgt ctt
3403

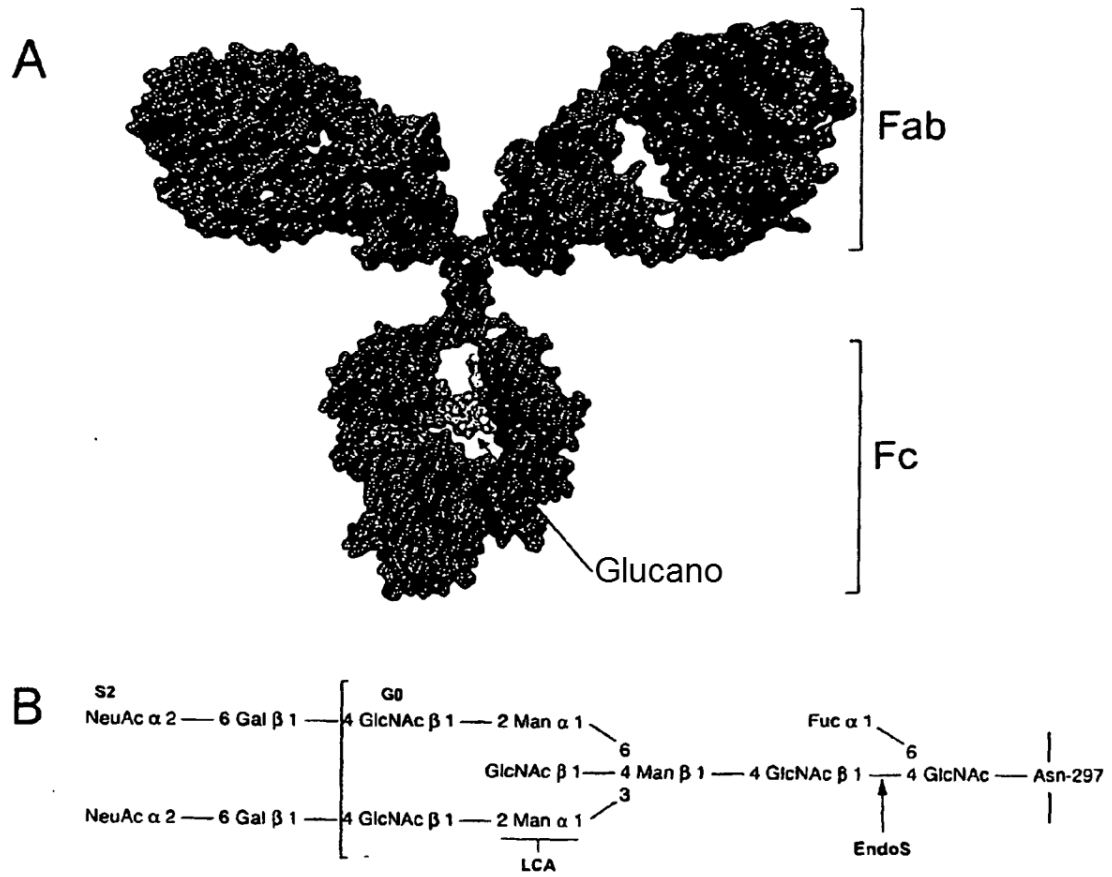
REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido EndoS, o un polinucleótido que codifica un polipéptido EndoS, para su uso en un método para el tratamiento o la prevención de una enfermedad o afección mediada por anticuerpos de IgG, donde dicha enfermedad o afección es una enfermedad autoinmunitaria, rechazo de trasplante o hemofilia adquirida.
2. Un polipéptido o polinucleótido para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, donde dicho polipéptido EndoS comprende:
 - (a) la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 1;
 - (b) una variante de la misma que tiene una identidad de al menos el 50% con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 1 y que tiene actividad IgG endoglucosidasa; o
 - (c) un fragmento de cualquiera de las mismas que tiene actividad IgG endoglucosidasa.
3. Un polipéptido para su uso de acuerdo con la reivindicación 2, que consiste en la secuencia mostrada en la SEC ID N°: 1.
4. Un polinucleótido para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende:
 - (a) la secuencia codificante de la SEC ID N°: 3;
 - (b) una secuencia que, como resultado del código genético, está degenerada con respecto a la secuencia definida en (a);
 - (c) una secuencia que tiene una identidad de al menos el 60% con una secuencia definida en (a) o en (b) y que codifica un polipéptido que tiene actividad IgG endoglucosidasa; o
 - (d) un fragmento de una cualquiera de las secuencias definidas en (a), (b) o (c), que codifica un polipéptido que tiene actividad IgG endoglucosidasa.
5. Un polinucleótido para su uso de acuerdo con la reivindicación 4, que consiste en la secuencia de ácido nucleico mostrada en la SEC ID N°: 3.
6. Un polipéptido o polinucleótido para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde dicha enfermedad autoinmunitaria es enfermedad de Addison, alopecia areata, espondilitis anquilosante, síndrome antifosfolípido, anemia aplásica, gastritis autoinmunitaria, sordera autoinmunitaria, anemia hemolítica autoinmunitaria, hepatitis autoinmunitaria, hipoparatiroidismo autoinmunitario, hipofisitis autoinmunitaria, enfermedad autoinmunitaria del oído interno, síndrome linfoproliferativo autoinmunitario, miocarditis autoinmunitaria, ooforitis autoinmunitaria, orquitis autoinmunitaria, poliendocrinopatía autoinmunitaria, enfermedad de Bechet, penfigoide bulboso, cardiomiopatía, polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica, síndrome de Churg-Strauss, enfermedad celiaca, enfermedad de Crohn, síndrome de CREST, enfermedad de Degos, epidermólisis ampollosa adquirida, crioglobulinemia mixta esencial, arteritis de células gigantes, glomerulonefritis, síndrome de Goodpasture, enfermedad de Grave, síndrome de Guillan-Barre, tiroiditis de Hashimoto, púrpura trombocitopénica idiopática, enfermedad intestinal inflamatoria, enfermedad de Kawasaki, síndrome de Meniere, enfermedad mixta del tejido conectivo, úlcera de Mooren, esclerosis múltiple, miastenia grave, pénfigo foliáceo, pénfigo vulgaris, 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 Sjörger, tiroiditis subaguda, oftalmia simpática, lupus eritematoso sistémico, arteritis de Takayasu, diabetes mellitus de tipo 1, vitíligo, enfermedad de Vogt-Koyanagi-Harada o granulomatosis de Wegener.
7. Un polipéptido o polinucleótido para su uso de acuerdo con la reivindicación 6, donde dicha enfermedad autoinmunitaria es artritis reumatoide.
8. Un polipéptido o polinucleótido para su uso de acuerdo con la reivindicación 6, en el que dicha enfermedad autoinmunitaria es lupus eritematoso sistémico.
9. Un polipéptido o polinucleótido para su uso de acuerdo con la reivindicación 6, en el que dicha enfermedad autoinmunitaria es púrpura trombocitopénica idiopática.
10. Un polipéptido o polinucleótido para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde dicho rechazo de trasplante es rechazo de aloinjerto o de xenoinjerto.
11. Un polipéptido EndoS, o un polinucleótido que codifica un polipéptido EndoS, para su uso en la preparación de un medicamento para el tratamiento o prevención de una enfermedad o afección mediada por anticuerpos de IgG, donde dicha enfermedad o afección es una enfermedad autoinmunitaria, rechazo de trasplante o hemofilia adquirida.

12. Un método de tratamiento, *ex vivo*, de sangre extraída de un paciente que padece una enfermedad o afección mediada por anticuerpos de IgG, donde dicha enfermedad o afección es una enfermedad autoinmunitaria, rechazo de trasplante o hemofilia adquirida y donde dicho método comprende poner en contacto la sangre con un polipéptido EndoS.

5

Figura 1



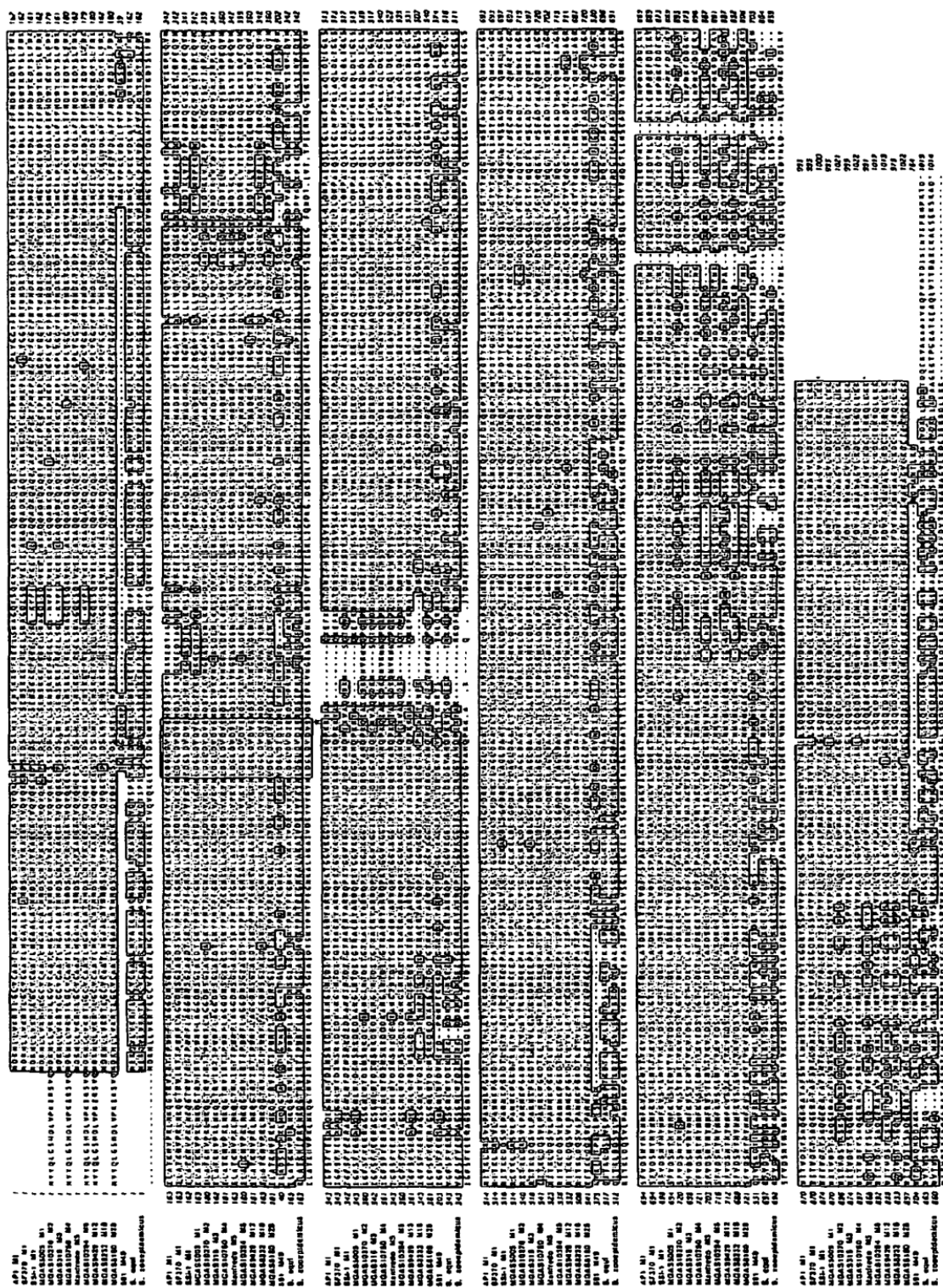


Figura 3

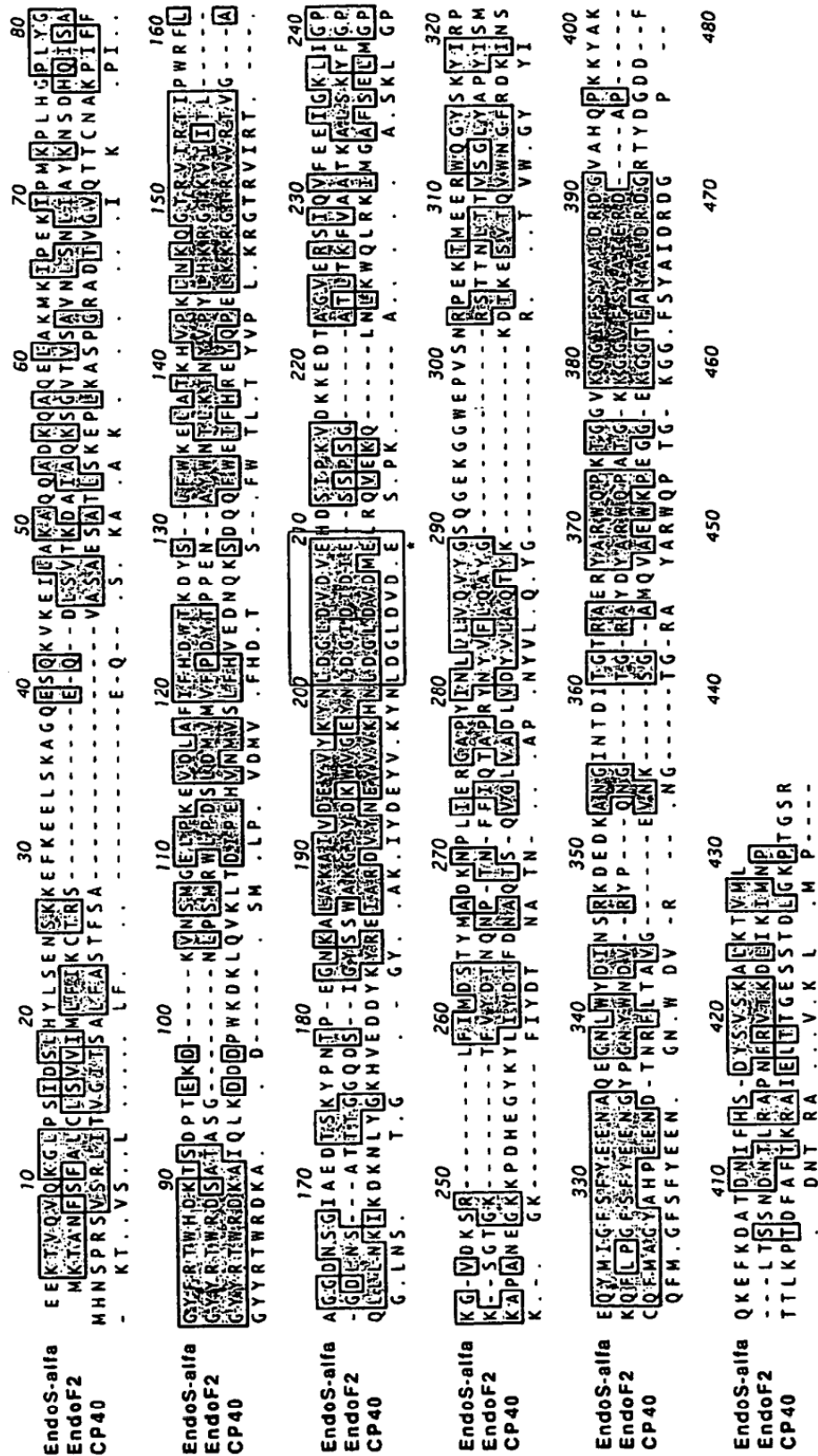


Figura 4

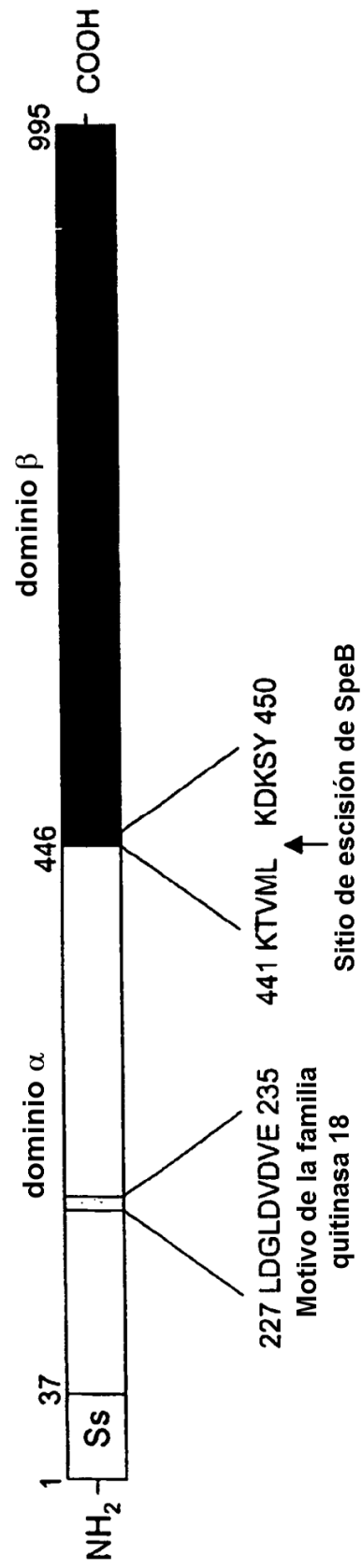


Figura 5

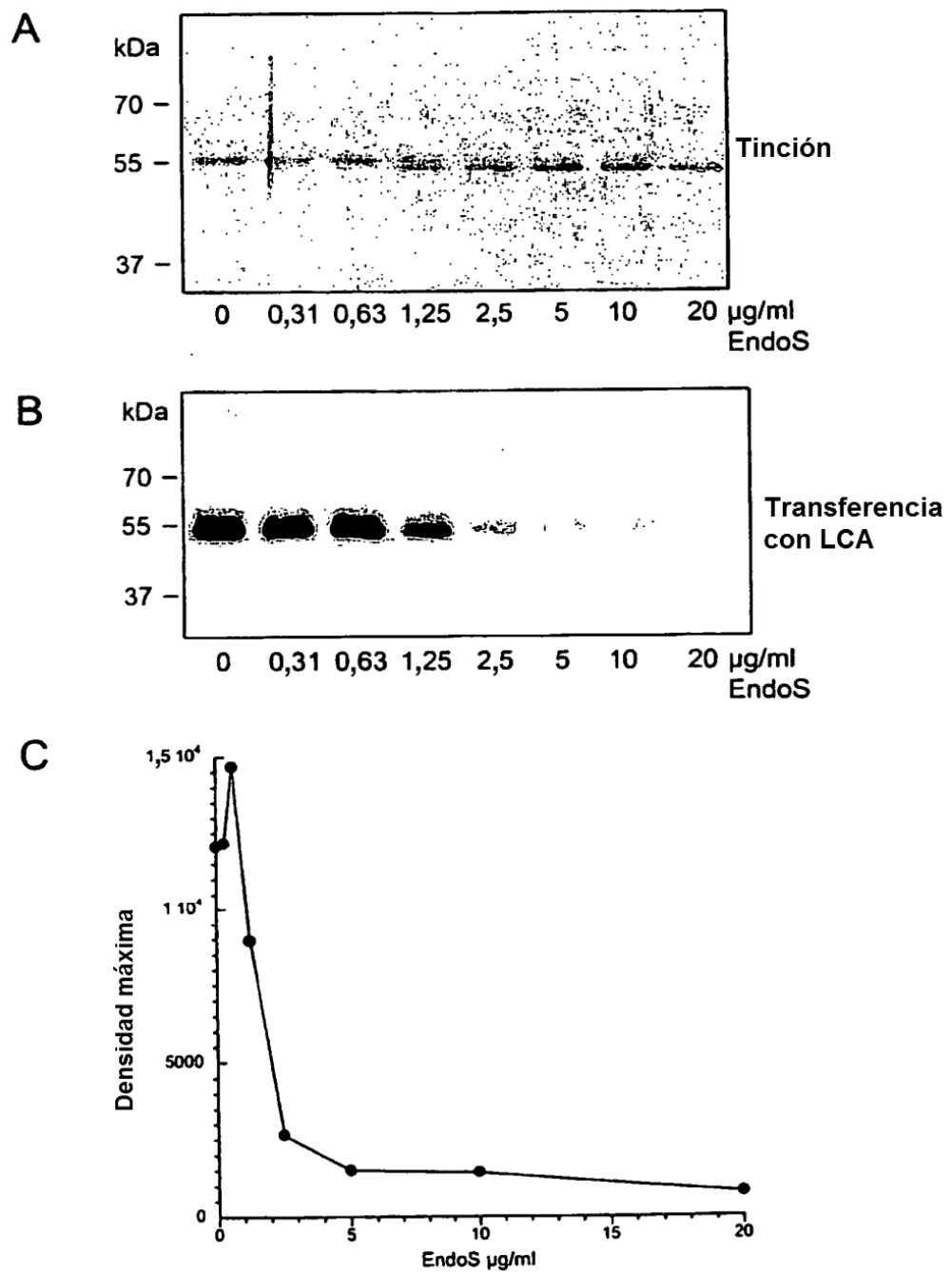


Figura 6

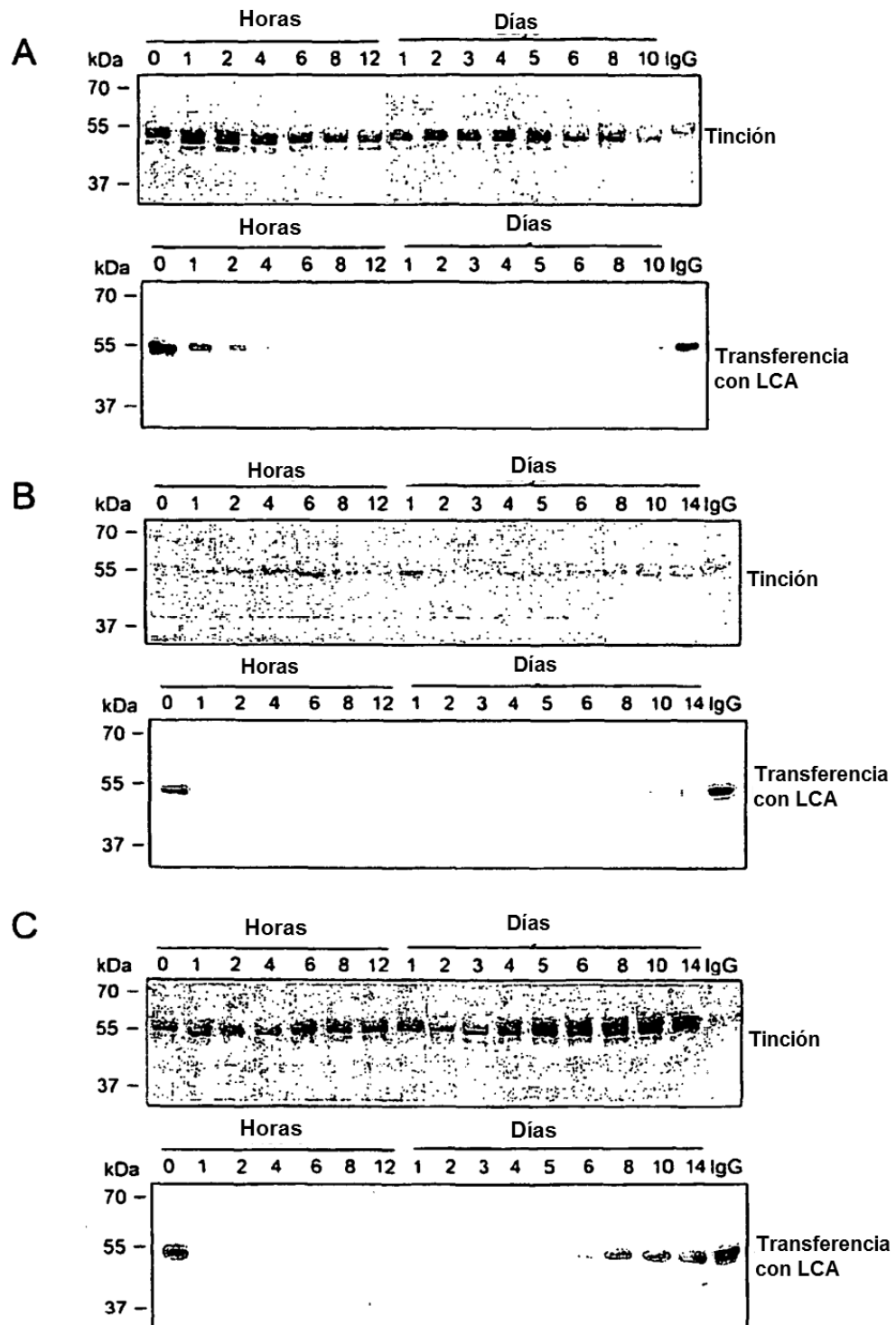


Figura 7

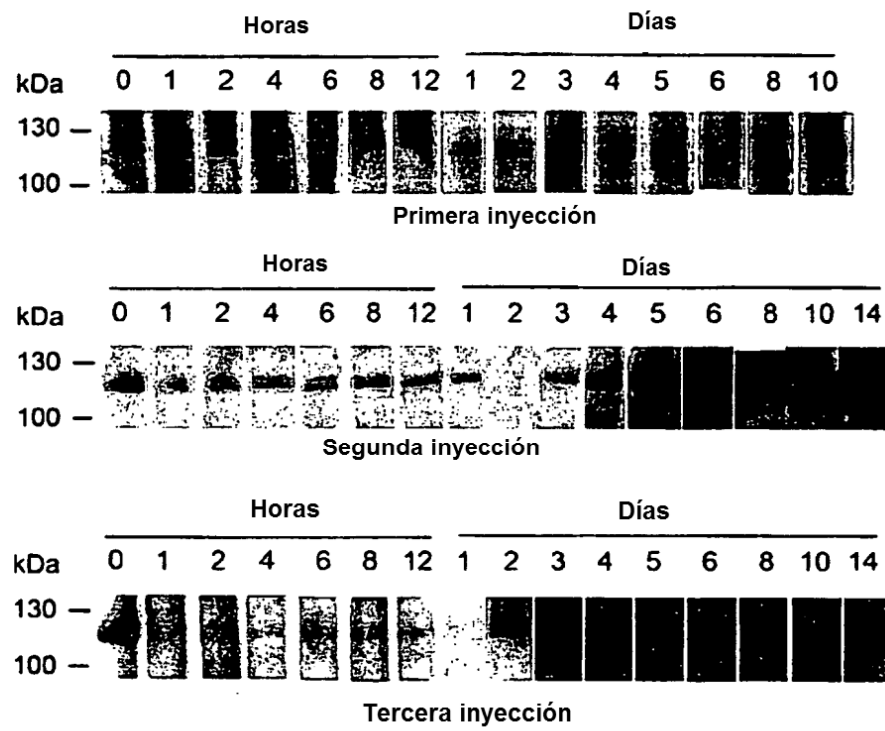


Figura 7A

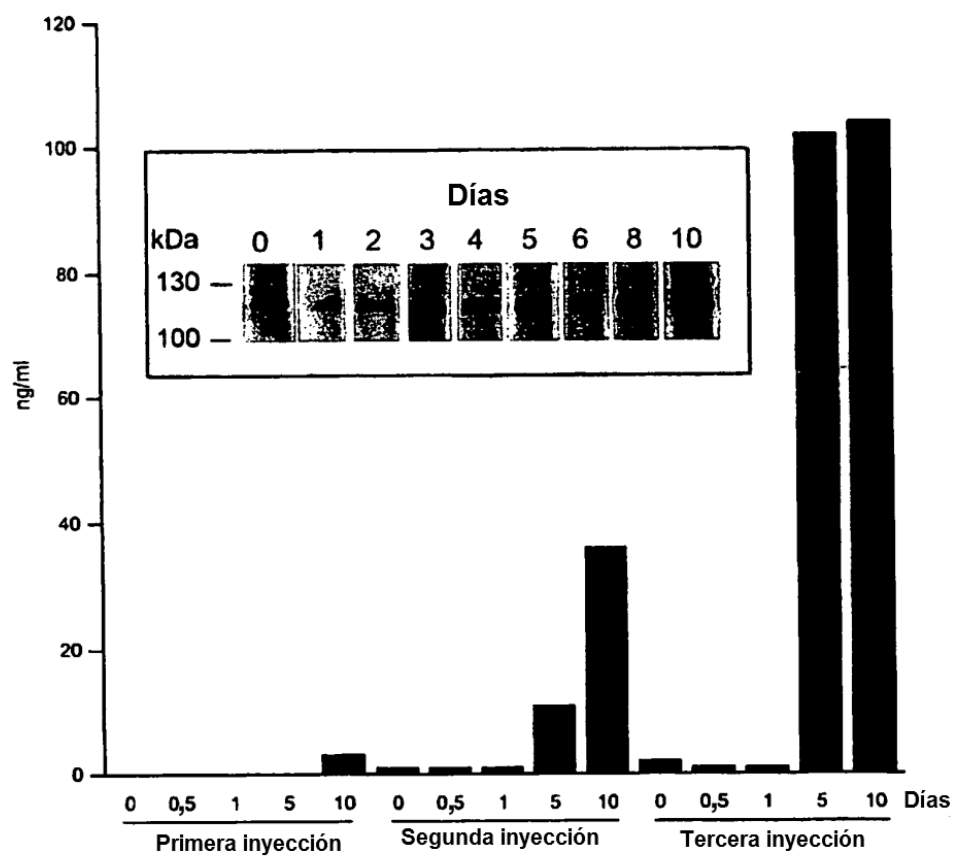


Figura 8

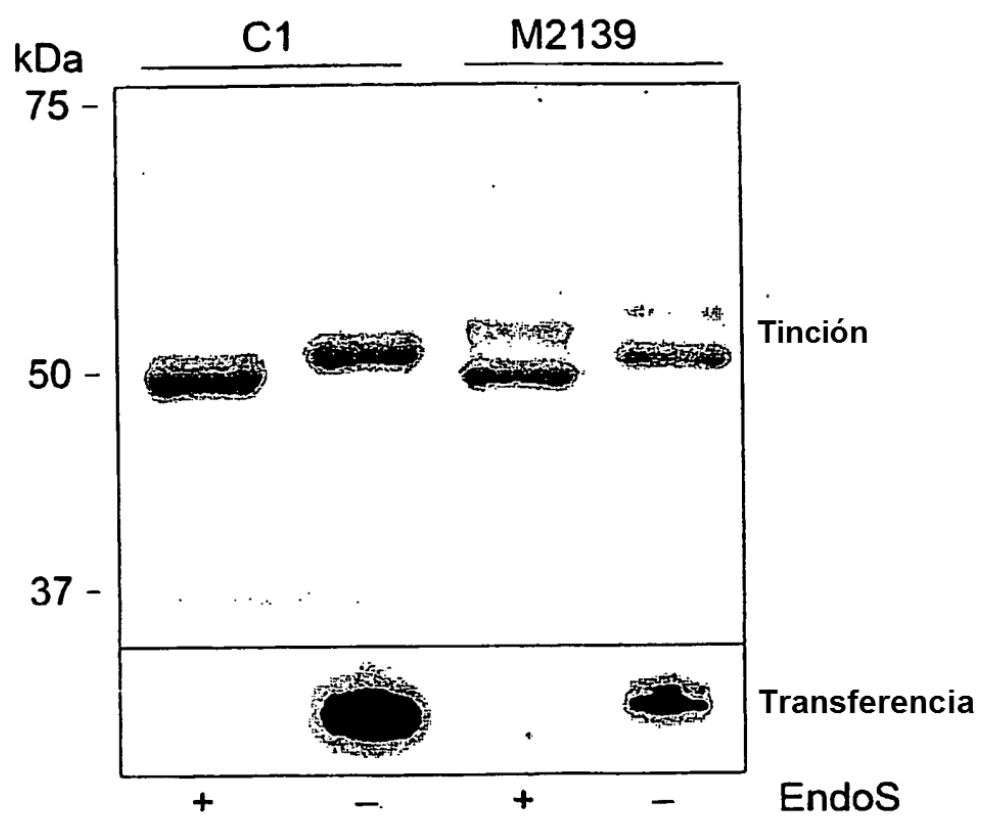


Figura 9

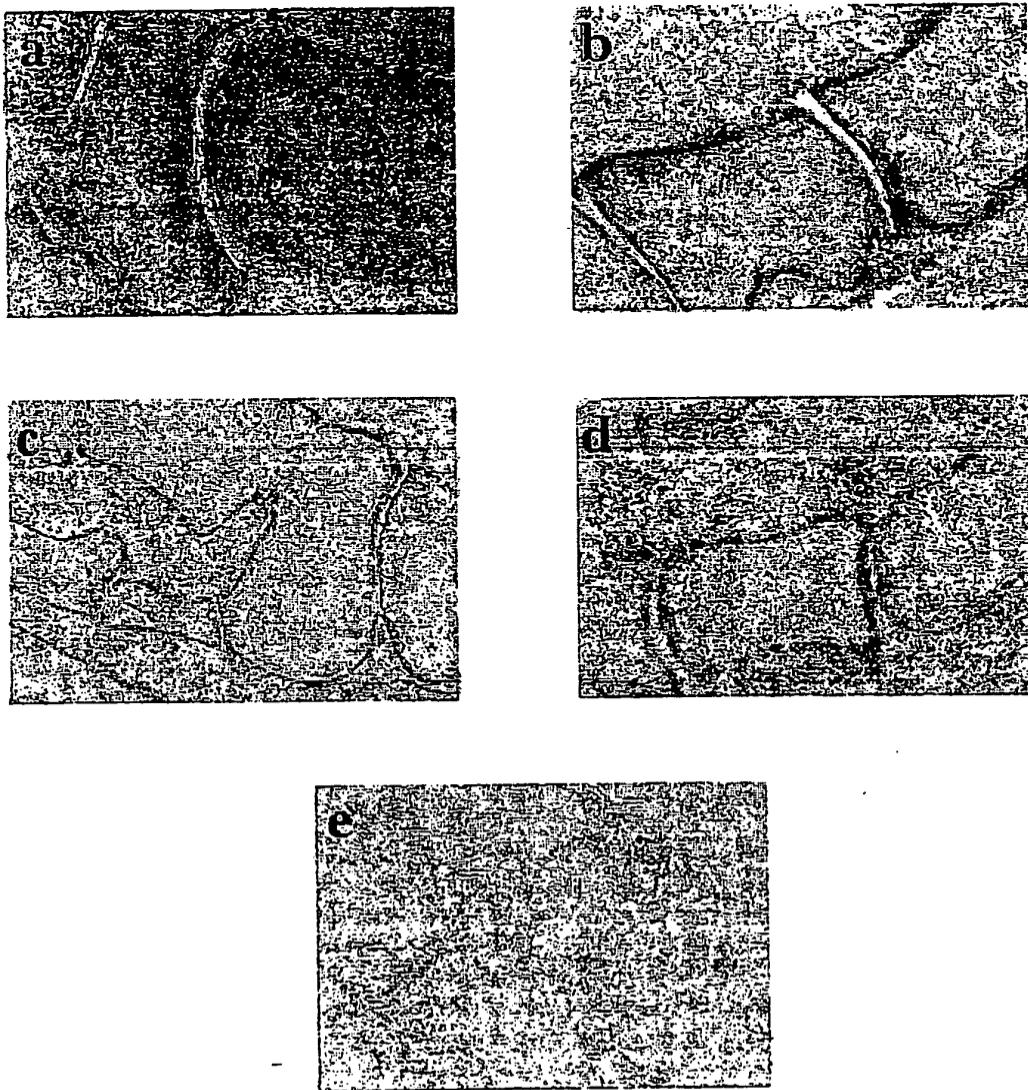


Figura 10

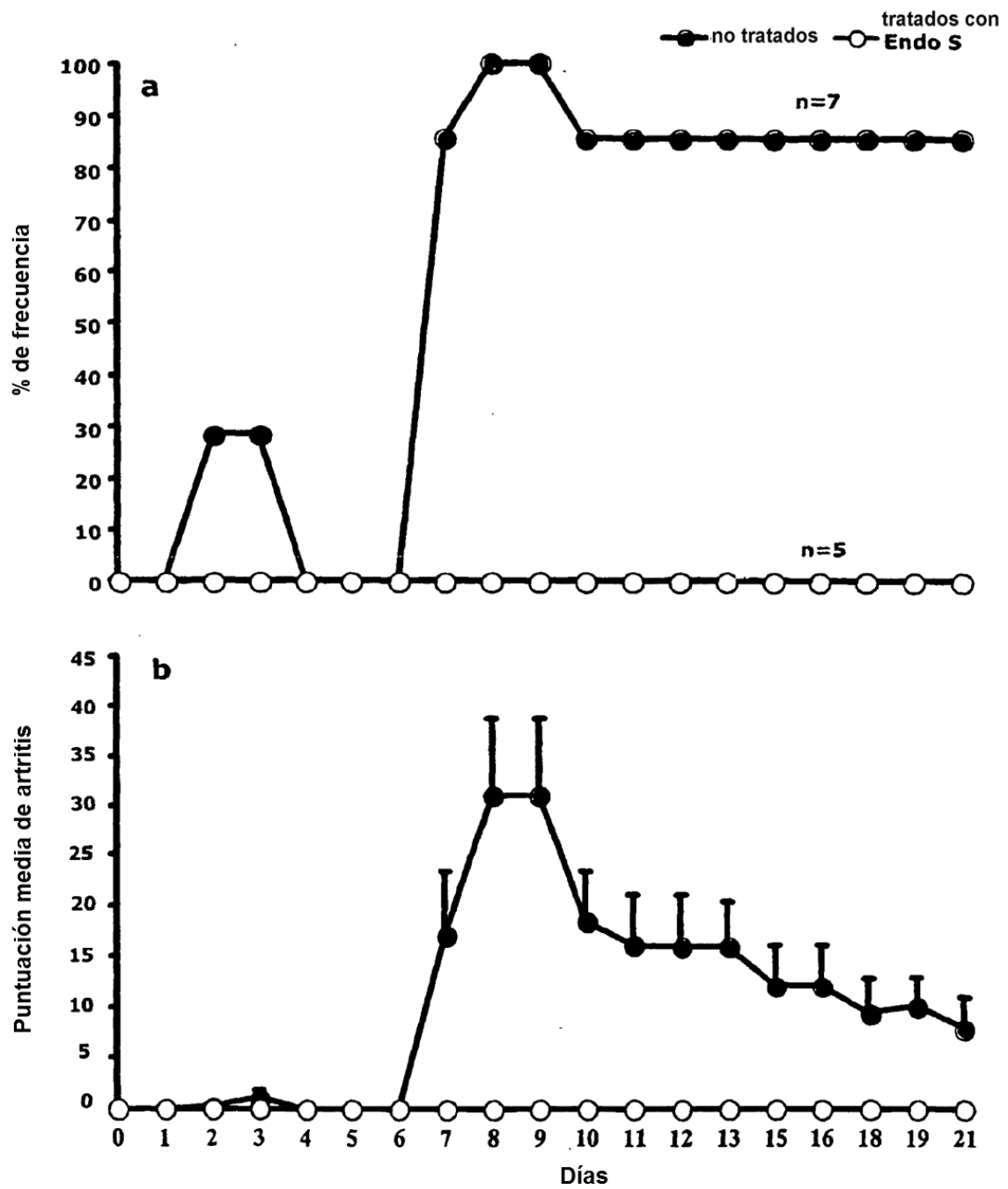


Figura 11

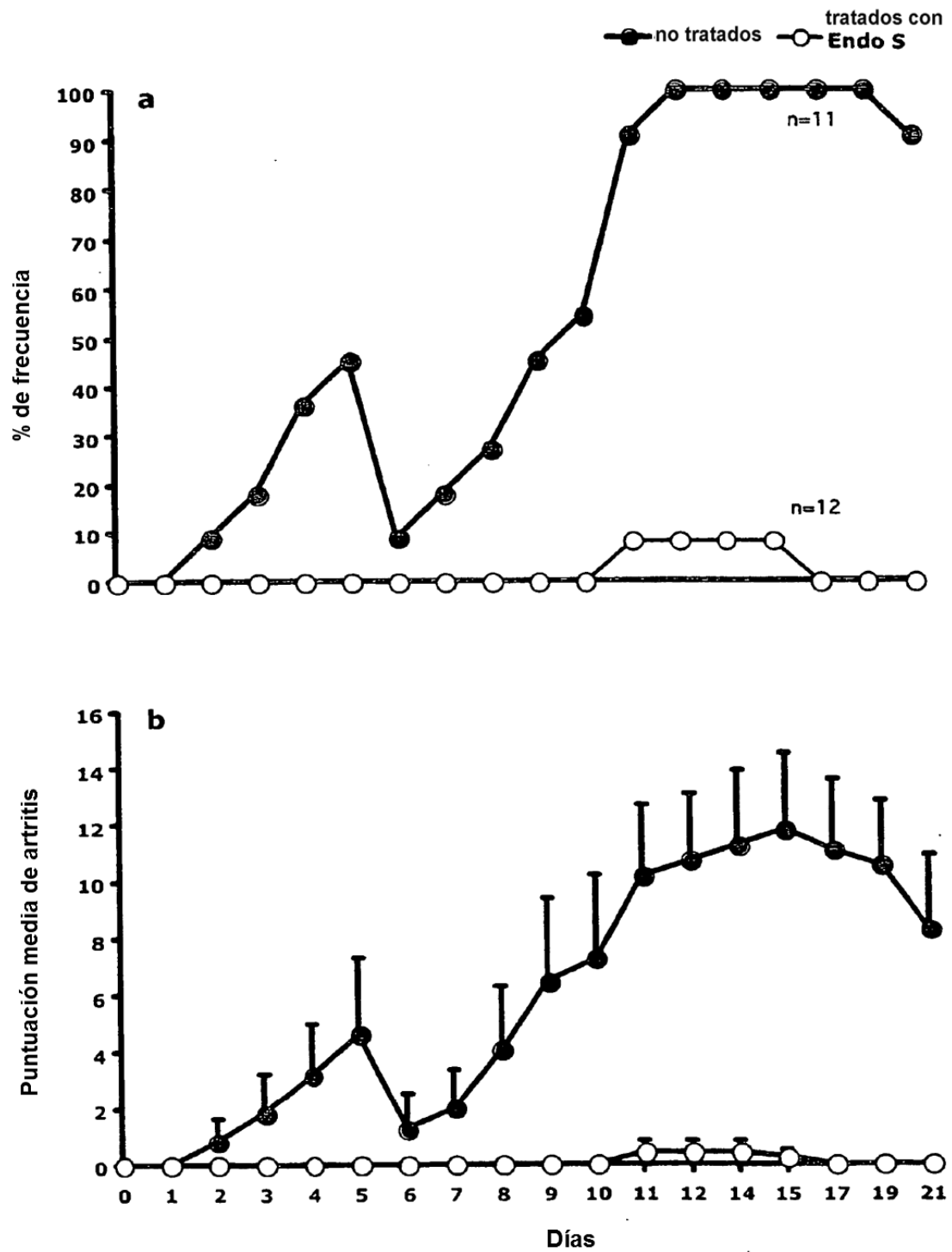


Figura 12

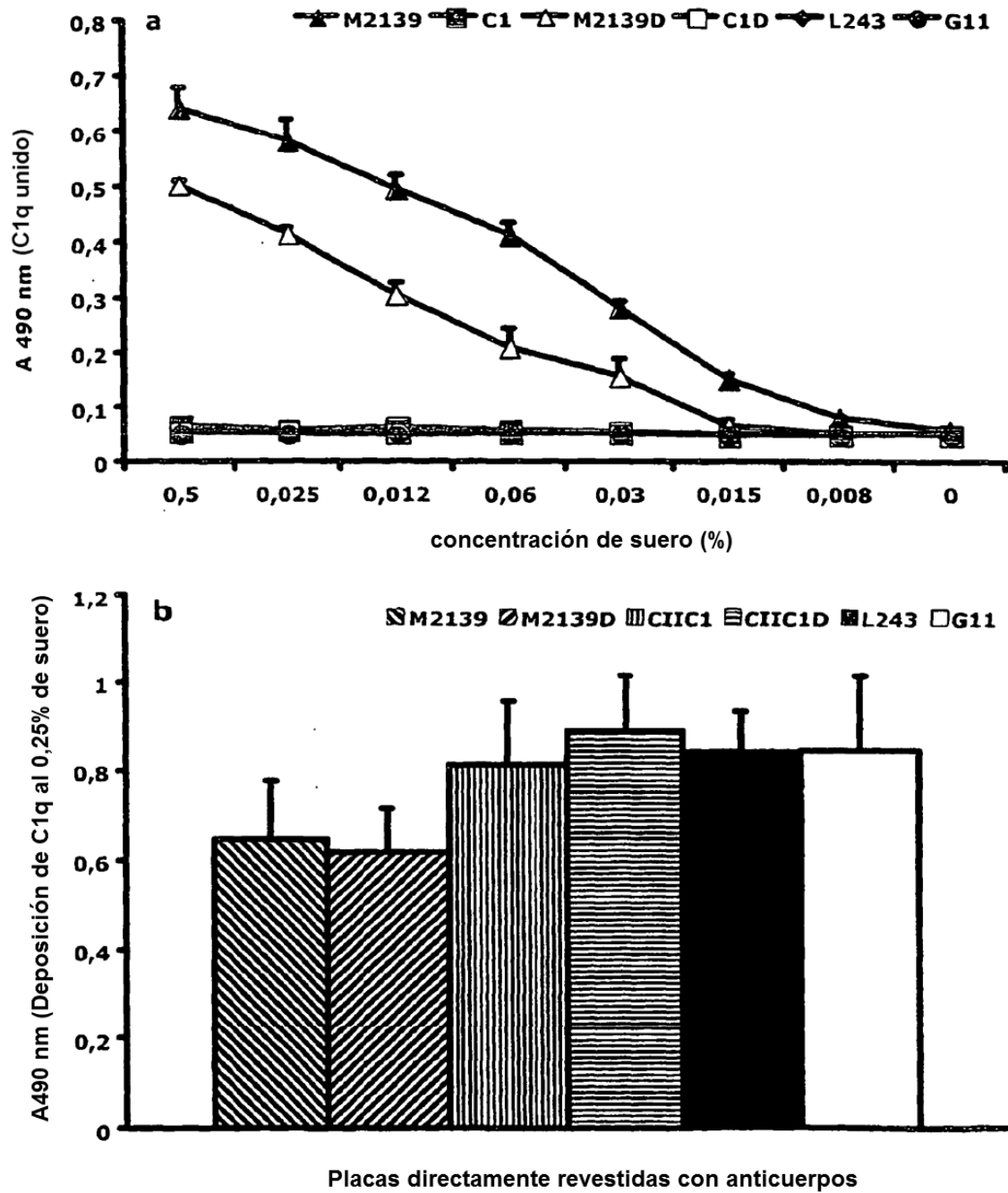


Figura 13

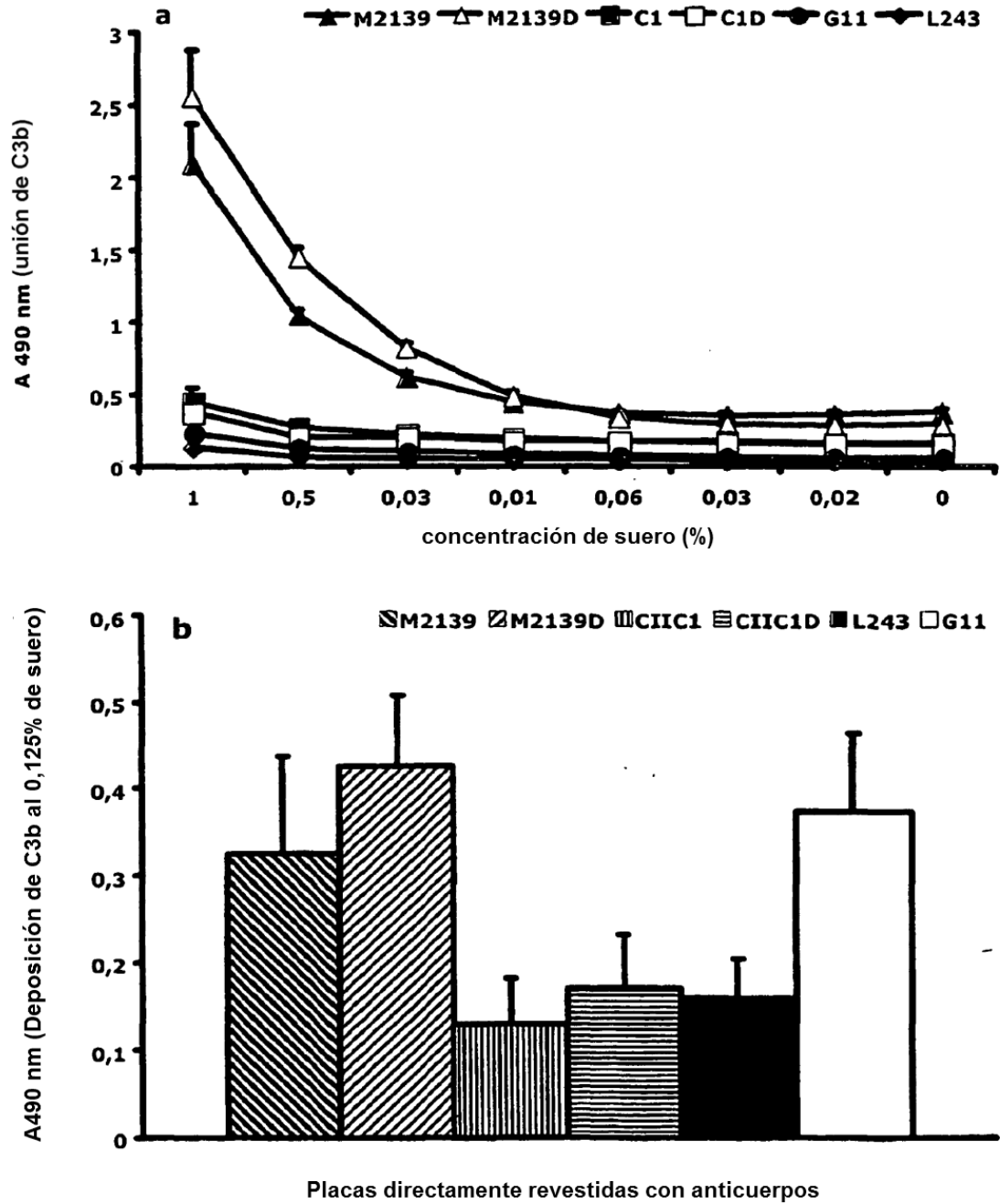


Figura 14

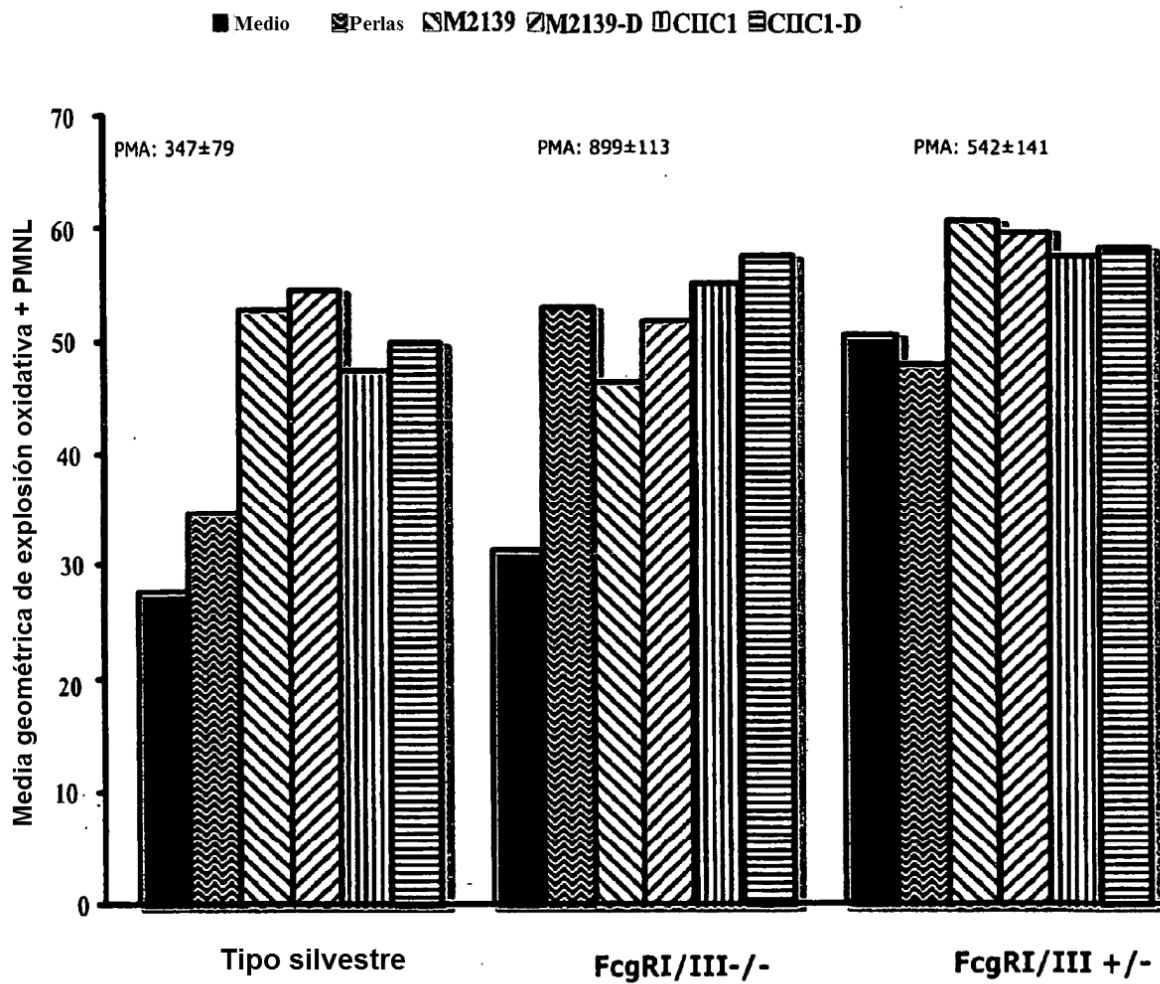


Figura 15

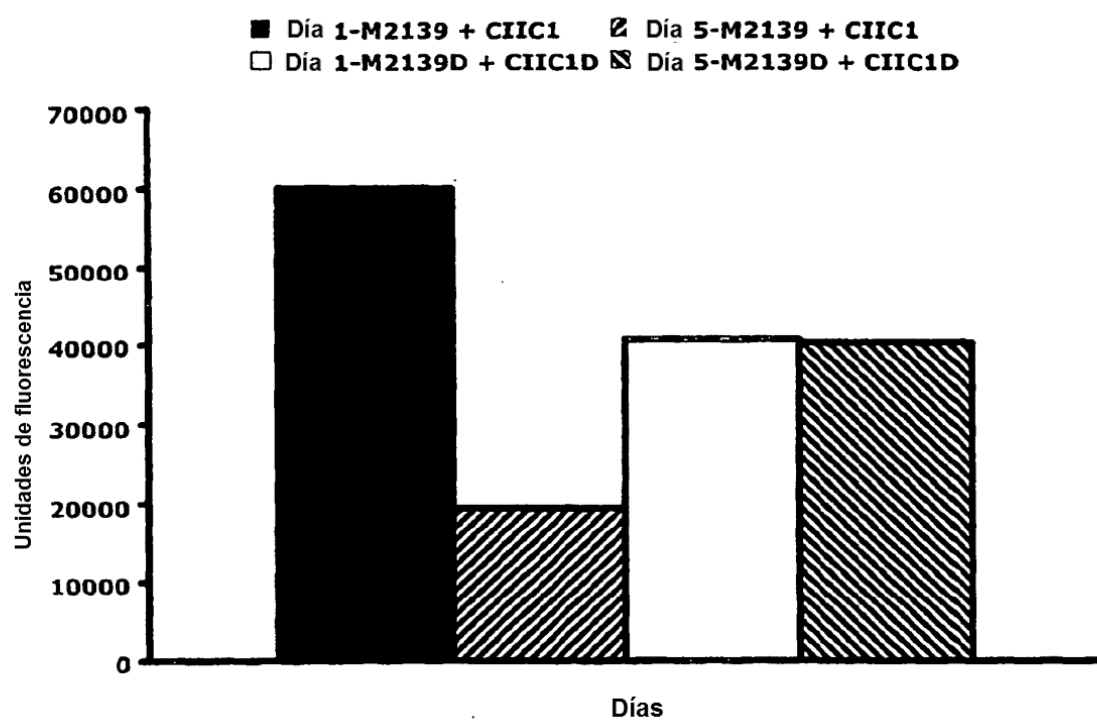


Figura 16

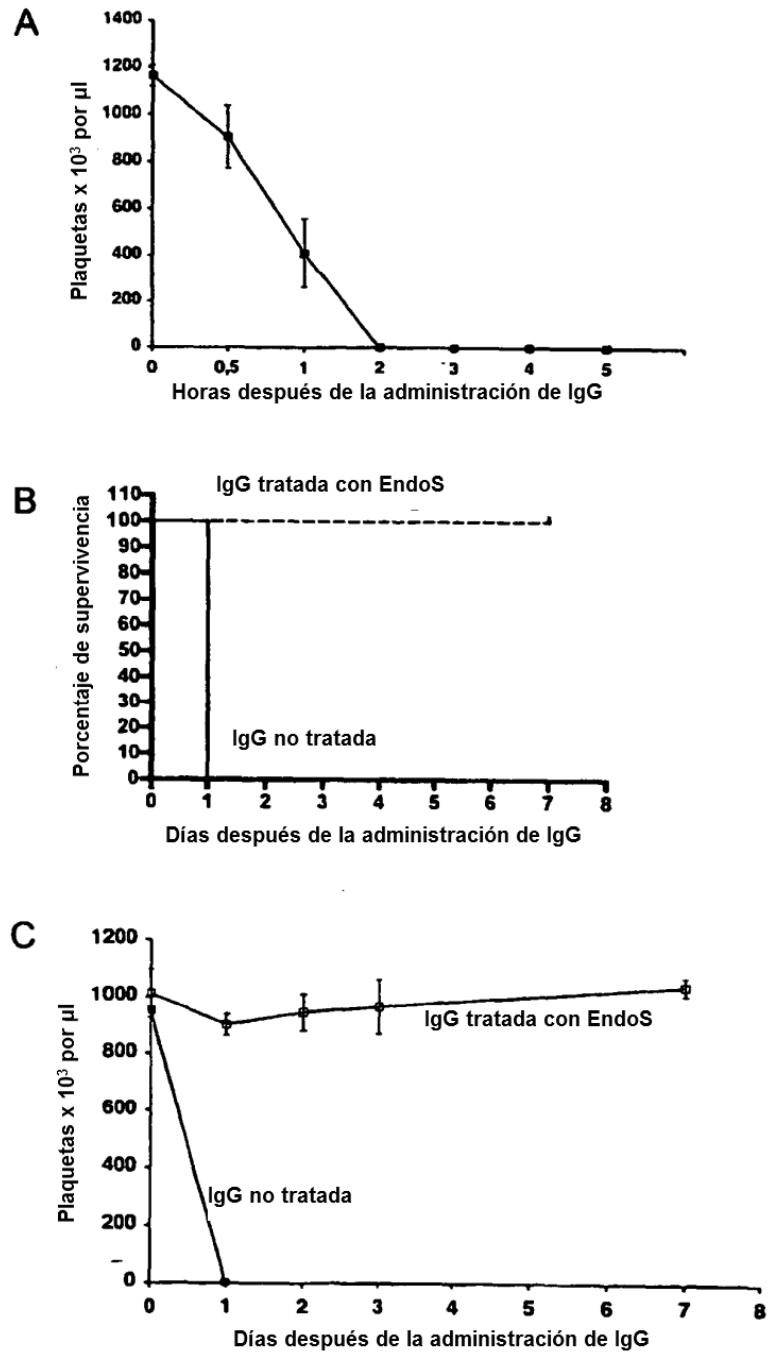


Figura 17

