

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 559 274**

51 Int. Cl.:

C12N 9/52 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.12.2002 E 02804912 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.11.2015 EP 1458861**

54 Título: **IdeS, una enzima degradadora de IgG de Streptococcus pyogenes**

30 Prioridad:

18.12.2001 GB 0130228

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

11.02.2016

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**VON PAWEL-RAMMINGEN, ULRICH;
JOHANSSON, BJORN y
BJORCK, LARS**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 559 274 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

IdeS, una enzima degradadora de IgG de *Streptococcus pyogenes*

5 **Campo de la invención**

La invención se refiere a una nueva proteína de *Streptococcus pyogenes* que expresa la actividad cistina proteasa de IgG. La invención se refiere además al tratamiento, vacunación y diagnóstico de la infección por *S. pyogenes* y al desarrollo de nuevas herramientas para biotecnología.

10

Antecedentes de la invención

S. pyogenes (estreptococo del Grupo A) es un importante patógeno bacteriano humano mejor conocido como la causa de las infecciones de la piel y respiratorias. Las infecciones estreptocócicas varían en su gravedad desde enfermedades relativamente leves, tales como impétigo y faringitis, a dolencias graves que suponen una amenaza para la vida tales como septicemia, fascitis necrotizante, y síndrome de choque tóxico estreptocócico (Bisno y Stevens, 1996; Cunningham, 2000). Las secuelas de las infecciones por *S. pyogenes* producidas en la piel y garganta incluyen dolencias graves tales como fiebre reumática aguda y glomerulonefritis post estreptocócica.

15

20

S. pyogenes expresa proteínas superficiales ancladas a la pared celular con capacidad para interactuar con una importante cantidad de proteínas extracelulares humanas tales como albúmina, IgG, IgA, fibrinógeno, fibronectina, y α_2 -macroglobulina (para referencias, véase Navarre y Schneewind, 1999). Muchas de estas interacciones entre proteínas están mediadas por miembros de la familia de las proteínas M.

25

Kawabata et al (2002) *Biochem & Biophys Res Comm* 296(5) p 1329-1333 (con n.º de acceso EMBL AB045752) se refiere a una proteína de unión a inmunoglobulina de *S. pyogenes*.

30

Fagbemi et al (1992) *Vet Parasitol* 43(3-4) p223-232 describen una cisteína proteasa de *Fasciola gigantica*, que se ha utilizado para generar una respuesta inmune.

Sumario de la invención

Los presentes inventores han identificado, purificado y caracterizado una nueva cistina proteasa extracelular producida por *S. pyogenes*. La proteasa, designada enzima IdeS degradadora de la inmunoglobulina G de *S. pyogenes* muestra una amplia especificidad por IgG, escindiendo la región bisagra de la inmunoglobulina. La proteína escinde no solamente la IgG unida a la superficie bacteriana por las proteínas de unión a IgGf, sino también opsonizando la IgG, y por tanto parece tener un papel en ayudar a *S. pyogenes* a evadir el sistema inmune del hospedador. Los inventores han mostrado que IdeS se expresa en las fases logarítmica y estacionaria del crecimiento bacteriano, y en numerosas cepas de *S. pyogenes* clínicamente relevantes, incluyendo las de los serotipos M1 M12 y M55. Se han encontrado anticuerpos contra IdeS en individuos que padecen infecciones de *S. pyogenes*, como los que se han encontrado en sueros de convalecientes que pueden bloquear la actividad enzimática de IdeS. IdeS es por tanto de uso en el tratamiento y diagnóstico de dolencias asociadas con infección de *S. pyogenes*. La proteasa es también útil para desarrollar nuevas herramientas biotecnológicas.

35

40

45

En un aspecto, la invención se refiere a un método para identificar una sustancia que activa o inhibe la actividad cisteína proteasa de IgG de un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 1 que comprende:

50

(i) poner en contacto un polipéptido que consiste de:

(a) la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 1;

(b) una de sus variantes que tiene al menos un 80 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 1 y que tiene la actividad cisteína proteasa de IgG; o

(c) un fragmento peptídico más corto que (a) que tiene la actividad cisteína proteasa de IgG

55

e IgG con una sustancia en condiciones que permitirían la actividad cisteína proteasa de IgG en ausencia de la sustancia; y

(ii) determinar por tanto si la sustancia activa o inhibe dicha actividad,

60

donde dicha sustancia es una biblioteca combinatoria, una molécula orgánica, un péptido, un péptido mimético, una biblioteca de expresión de fagos o un anticuerpo.

En otro aspecto, la invención se refiere a:

65

- un método para generar fragmentos Fc o Fab de IgG que comprende poner en contacto la IgG con un polipéptido que consiste en:

- (a) la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 1;
- (b) una de sus variantes que tiene al menos un 80 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 1 y que tiene la actividad cisteína proteasa de IgG; o
- (c) un fragmento peptídico más corto que (a) que tiene la actividad cisteína proteasa de IgG.

5

En otro aspecto, la invención se refiere a:

- un método para detectar IgG en una muestra, que comprende:

10 (i) poner en contacto la muestra con un polipéptido que consiste en:

- (a) la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 1;
- (b) una de sus variantes que tiene al menos un 80 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 1 y que tiene la actividad cisteína proteasa de IgG; o
- (c) un fragmento peptídico más corto que (a) que tiene la actividad cisteína proteasa de IgG,

15

en condiciones que permitan la actividad cisteína proteasa específica de la IgG del polipéptido; y

- (ii) vigilar la presencia de fragmentos de escisión específicos de IgG;

20

donde la presencia de fragmentos de escisión específicos es indicadora de la presencia IgG en la muestra.

Breve descripción de las figuras

25

La Figura 1 muestra la secuencia de aminoácidos que se encuentra en la región bisagra de la IgG humana incluyendo el sitio de escisión de IdeS.

La Figura 2 muestra una representación esquemática de un marco de lectura abierto (ORF) que codifica IdeS aislada de *S. pyogenes* AP1, incluyendo una presunta secuencia de señalización y un motivo RGD.

La Figura 3 muestra factores de supervivencia de bacterias *S. pyogenes* en células de tipo macrófagos, tras la incubación de las bacterias en plasma inmune o no inmune, y con o sin IdeS.

30

La Figura 4 muestra la escisión de IdeS de la IgG unida a la superficie bacteriana de *S. pyogenes*.

Breve descripción de las secuencias

35

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

La SEC ID N°: 2 es una secuencia de aminoácidos que codifica IdeS aislada de *S. pyogenes* AP1, que incluye una presunta secuencia de señalización.

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

La SEC ID N°: 4 es el cebador de la PCR para Ide1.

40

La SEC ID N°: 5 es el cebador de la PCR para Ide2.

La SEC ID N°: 6 es el cebador de la PCR para Ide5x

La SEC ID N°: 7 es el cebador de la PCR para Ide3x

La SEC ID N°: 8 es la secuencia de aminoácidos del extremo N de un producto de escisión de la IgG de IdeS humana.

45

La SEC ID N°: 9 es la secuencia de aminoácidos del extremo N de IdeS aislada de *S. pyogenes* AP1.

La SEC ID N°: 10 es una señal de unión a la pared celular que se encuentra en numerosas proteínas bacterianas.

Descripción detallada de la invención

50

La divulgación se refiere a determinados polipéptidos. Se describe también el uso de estos polipéptidos en la profilaxis y el diagnóstico de la infección por cepas de *S. pyogenes*.

55

Los polipéptidos descritos en el presente documento son los que comprenden la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 1 y muestran la actividad cisteína proteasa de IgG, junto con sus variantes funcionales, derivados y fragmentos. La divulgación se refiere también a las variantes y fragmentos de la SEC ID N°: 1 que tienen la capacidad de generar una respuesta inmune en un individuo y en particular aquellas que generan anticuerpos que tienen la capacidad de bloquear la actividad enzimática de IdeS, o de generar una respuesta inmune protectora. Preferentemente, el polipéptido comprende la secuencia de SEC ID N°:1. El polipéptido puede incluir adicionalmente una secuencia de señalización como en la SEC ID N°:2.

60

Las variantes de polipéptidos son aquellas donde la secuencia de aminoácidos varía con respecto a la mostrada en la SEC ID N°: 1, pero que retienen el mismo carácter esencial de funcionalidad básica que IdeS. Las variantes de polipéptidos pueden por tanto mostrar actividad de cisteína proteasa de IgG o la capacidad de generar una respuesta inmune en un individuo. En particular, dichas variantes incluyen aquellas que pueden generar anticuerpos

65

que tienen la capacidad de bloquear la actividad enzimática de IdeS, o de generar una respuesta inmune protectora. Normalmente, los polipéptidos que tienen preferentemente al menos 80 % o al menos 90 % y de forma particularmente preferente al menos 95 %, al menos 97 % o al menos 99 % de identidad, con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°:1 se consideran variantes de la proteína. Dichas variantes pueden incluir variantes alélicas y la delección, modificación o adición de aminoácidos únicos o grupos de aminoácidos en la secuencia de proteína, siempre que el péptido mantenga una funcionalidad básica de IdeS.

Los inventores han encontrado también que es posible proporcionar mutantes de IdeS, en cuya mutación en el dominio catalítico elimina la actividad cisteína proteasa de la proteína. Dicho mutante puede comprender la sustitución o la delección del resto cisteína catalítico en la posición 94 (C94) de IdeS. Por ejemplo, la cisteína puede estar sustituida con glicina. Se describe con más detalle a continuación la utilidad de dichas variantes. La divulgación se refiere también a variantes de fragmentos de dicha IdeS mutada, pero que mantienen otras funciones de IdeS, tales como la capacidad de generar una respuesta inmune o de unirse a IgG.

Pueden realizarse sustituciones de aminoácidos, por ejemplo desde 1, 2 o 3 a 10, 20 o 30 sustituciones. El polipéptido modificado retiene generalmente la actividad como una cisteína proteasa específica de IgG. Se pueden hacer sustituciones conservativas, de acuerdo por ejemplo con la siguiente Tabla. Los aminoácidos situados en el mismo bloque de la segunda columna y preferentemente en la misma línea de 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

Preferentemente, los polipéptidos comprenden un resto cisteína y un resto histidina en una separación que se encuentra normalmente en las cisteínas proteasas. Por ejemplo, en la SEC ID N°: 1, estos restos se encuentran en una separación de aproximadamente 130 aa, como aparece normalmente en las cisteína proteasas.

Están comprendidos en el alcance de la divulgación secuencias o fragmentos de polipéptidos más cortos. Por ejemplo, un péptido de al menos 20 aminoácidos o hasta de 50, 60, 70, 80, 100, 150 o 200 aminoácidos de longitud se considera comprendido en el alcance de la divulgación siempre que demuestre una funcionalidad básica de IdeS. En particular, pero no de forma exclusiva, este aspecto abarca la situación donde la proteína es un fragmento de la secuencia de la proteína completa y puede representar una región de unión a IgG o un epítipo. Es posible que dichos fragmentos no retengan la actividad cisteína proteasa de IgG.

Los polipéptidos pueden estar también químicamente modificados, por ejemplo, modificados después de la traducción. Por ejemplo, pueden estar glicosilados o comprender restos aminoácidos modificados. Pueden estar modificados mediante la adición de restos histidina que ayudan a su purificación o mediante la adición de una secuencia de señalización que promueve la inserción en la membrana celular. Puede ser deseable proporcionar los péptidos o proteínas en una forma adecuada para la unión a un soporte sólido. Las proteínas o péptidos pueden por tanto modificarse para potenciar su unión a un soporte sólido, por ejemplo, mediante la adición de un resto cistina. Dichos polipéptidos modificados están comprendidos en el alcance del término "polipéptido" de la divulgación.

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

La actividad cisteína proteasa de los polipéptidos puede caracterizarse adicionalmente mediante estudios de inhibición. Preferentemente, la actividad está inhibida por el derivado peptídico Z-LVG-CHN₂ y/o por el ácido

yodoacético, ambos de los cuales son inhibidores de las proteasas. Sin embargo, la actividad no está generalmente inhibida por E64.

5 La actividad cisteína proteasa de los polipéptidos es generalmente específica de IgG ya que los polipéptidos pueden no degradar otras clases de Ig, concretamente IgM, IgA, IgD e IgE, cuando se incuban con estas inmunoglobulinas en condiciones que permiten la escisión de IgG. En realizaciones preferidas, el polipéptido tiene la capacidad de escindir la IgG humana, de conejo o de cabra, y preferentemente, no tiene la capacidad de escindir la IgG de murino.

10 La divulgación se refiere también a IdeS mutante, cuya la actividad catalítica de la cisteína proteasa se ha reducido o perdido. La ausencia de actividad cisteína proteasa puede evaluarse como se describe para el IdeS no mutante. Dichos mutantes pueden retener la capacidad de unirse a IgG. Puede evaluarse la unión de IgG mediante estudios de unión, por ejemplo IdeS inmovilizante, y ponerse en contacto dicho IdeS inmovilizada con IgG, y vigilar la presencia de cualquier IgG unida. Dicho mutante puede no expresar actividad cisteína proteasa o tener una actividad cisteína proteasa reducida en comparación con un polipéptido no modificado de esta manera.

15 De acuerdo con un aspecto de la divulgación, los polipéptidos proporcionados pueden generar una respuesta inmune, preferentemente una respuesta inmunoprotectora contra *S. pyogenes* en un individuo. Estos polipéptidos son útiles para su la inclusión en vacunas dirigidas a una infección por *S. pyogenes*. El polipéptido puede generar anticuerpos que tienen la capacidad de bloquear la actividad enzimática de IdeS. Esta actividad puede vigilarse, por ejemplo, como se describe para la actividad de IdeS, en que IdeS o una de sus variantes que retiene la actividad cisteína proteasa de IgG se incuba con IgG en presencia del anticuerpo generado. La escisión de IgG por IdeS puede vigilarse como anteriormente. Los polipéptidos pueden también utilizarse para generar anticuerpos que se pueden utilizar en el diagnóstico o el tratamiento por inmunoterapia de la infección de *S. pyogenes*. Dichos polipéptidos pueden comprender un epítipo del polipéptido IdeS y pueden no demostrar de otra forma la actividad cisteína proteasa de IgG. Preferentemente, los polipéptidos son fragmentos. Por ejemplo, los fragmentos pueden tener al menos 6 aminoácidos de longitud, preferentemente al menos 10, tal como al menos 12 o 15 o hasta 20, 30 o 40 aminoácidos. Se pueden usar también fragmentos más largos tales como de hasta 60 o 150 aa de longitud.

30 Puede identificarse un péptido que genere una respuesta inmune mediante estudios de inmunización. Por ejemplo, puede administrarse un péptido candidato a un animal y, posteriormente, se puede determinar la respuesta de anticuerpos o de linfocitos T generados que es específica del péptido. Puede evaluarse el antisuero generado tras la administración de un péptido a un animal para determinar su capacidad de unirse a un péptido o de unirse a IdeS. Posteriormente, puede estimularse al animal con *S. pyogenes* para evaluar si se ha generado una respuesta inmunoprotectora.

35 Los polipéptidos pueden estar en forma sustancialmente aislada. Se entenderá que el polipéptido puede mezclarse con transportadores o diluyentes que no interferirán con el fin previsto del polipéptido y se seguirá considerando como sustancialmente aislado. Un polipéptido puede estar también en una forma sustancialmente purificada, en cuyo caso comprenderá generalmente el polipéptido en una preparación donde más del 50 %, por ejemplo, más de un 80 %, 90 %, 95 % o 99 %, en peso del polipéptido en la preparación es uno de los mencionados polipéptidos.

45 Una proteína o péptido puede marcarse con una etiqueta reveladora. La etiqueta reveladora puede ser cualquier etiqueta adecuada que permita detectar la proteína o el péptido. Las etiquetas adecuadas incluyen radioisótopos tales como ¹²⁵I, ³⁵S o enzimas, anticuerpos, polinucleótidos y enlazadores tales como biotina. Los polipéptidos marcados de la invención pueden utilizarse en procedimientos diagnósticos tales como inmunoensayos. En dichos ensayos puede preferirse proporcionar los péptidos unidos a un soporte sólido, por ejemplo, la superficie de un pocillo o tira reactiva de inmunoensayo. La presente divulgación se refiere también a dichos polipéptidos marcados y/o inmovilizados empaquetados en la forma de un kit en un envase. El kit puede contener opcionalmente otros reactivos adecuado(s), control(es) o instrucciones y similares.

50 Los polipéptidos para su uso en la presente invención pueden aislarse de cepas adecuadas que expresan IdeS de *S. pyogenes*. Las cepas adecuadas pueden identificarse mediante numerosas técnicas. Por ejemplo, Las cepas de *S. pyogenes* pueden someterse inicialmente a ensayo para determinar la presencia de un gen *ideS*. Los cebadores o sondas de polinucleótidos pueden diseñarse basándose en, por ejemplo, Las SEC ID N^{os}: 1, 2 o 3. Los cebadores adecuados se definen en las SEC ID N^{os}: 4, 5, 6 y 7. La presencia del gen *ides* puede verificarse a continuación mediante la PCR utilizando los cebadores o mediante hibridación de las sondas con el ADN genómico de la cepa de *S. pyogenes*.

60 Las cepas de *S. pyogenes* que expresan IdeS activa pueden identificarse evaluando la actividad cisteína proteasa de IgG en el sobrenadante del cultivo. Preferentemente se añade el inhibidor E64 al sobrenadante para inhibir cualquier actividad serina proteasa de SpeB. Los presentes inventores han mostrado que al menos cinco cepas sometidas a ensayo expresan IdeS activa: las cepas AP1, AP12, AP55, KTL3 y SF370. Preferentemente, la cepa expresante se selecciona entre AP1, AP12 y AP55.

65 El aislamiento y la purificación de IdeS de un cultivo que expresa *S. pyogenes* se realiza normalmente sobre la base de la actividad serina proteasa de IgG. 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 crecientes de sulfato de amonio. Las cantidades de sulfato de amonio pueden ser 10 a 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 %. Las proteínas aglomeradas se pueden someter a continuación a cromatografía de intercambio iónico, por ejemplo mediante FPLC en una columna Mono Q. Las fracciones eluidas pueden evaluarse para determinar la actividad cisteína proteasa de IgG y las fracciones de actividad de los picos pueden combinarse entre sí. Las fracciones pueden analizarse mediante SDS PAGE. Por ejemplo, se puede obtener una secuencia del extremo N a partir de la banda de proteína obtenida mediante SDS PAGE. Las fracciones pueden almacenarse a -20 °C.
- Los polipéptidos para su uso en la invención también pueden prepararse como fragmentos de dichas proteínas aisladas. Además, las proteínas y los péptidos de la invención pueden prepararse también sintéticamente o por medios recombinantes como se describe a continuación.
- La secuencia de aminoácidos de las proteínas y los polipéptidos puede modificarse para incluir aminoácidos que no se producen naturalmente o para aumentar la estabilidad del compuesto. Cuando las proteínas o los péptidos se producen por medios sintéticos, dichos aminoácidos pueden introducirse durante la producción. Las proteínas o los péptidos también pueden modificarse siguiendo una producción tanto sintética como recombinante.
- Las proteínas o los péptidos también pueden producirse utilizando aminoácidos D. En dichos casos, los aminoácidos se unirán en secuencia inversa en la orientación C a N. Esto es convencional en la técnica para producir dichas proteínas o péptidos.
- Se conocen en la materia numerosas modificaciones de la cadena secundaria y se pueden preparar para las cadenas secundarias de las proteínas o péptidos. Dichas modificaciones incluyen, por ejemplo, modificaciones de aminoácidos mediante alquilación reductora por reacción con un aldehído seguida por reducción con NaBH₄, amidación con metilacetimidato o acilación con anhídrido acético.
- Se describen también polinucleótidos que codifican los anteriores polipéptidos, y su uso en medicina. En particular, se describen polinucleótidos concretos que comprenden o consisten de (a) la secuencia de codificación de SEC ID N°:3 o una secuencia complementaria de la anterior; (b) secuencia que se hibrida en condiciones rigurosas con las secuencias definidas en (a); (c) secuencia que está degenerada como resultado del código genético a una secuencia como la definida en (a) o (b); (d) secuencia que tiene al menos un 60 % de identidad con las secuencias definidas en (a) (b) o (c); y (e) fragmentos de las secuencias anteriores.
- Normalmente, el polinucleótido es ADN. Sin embargo, la invención puede comprender polinucleótidos de ARN. Los polinucleótidos pueden ser monocatenarios o bicatenarios, y pueden incluir en ellos nucleótidos sintéticos o modificados.
- Un polinucleótido puede hibridarse con la secuencia de codificación del complemento de la secuencia de codificación de SEC ID N°: 3 a un nivel significativamente por encima del nivel de fondo. Puede producirse la hibridación de fondo, por ejemplo, debido a otros ADN presentes en la biblioteca de ADN. El nivel de señalización generado por la interacción entre un polinucleótido de la invención y la secuencia de codificación o el complemento de la secuencia de codificación de la SEC ID N°: 3 es normalmente al menos de 10 veces, preferentemente al menos 100 veces, tan intensa como la interacciones entre otros polinucleótidos y la secuencia de codificación de la SEC ID N°: 3. Puede medirse la intensidad de la interacción, por ejemplo, mediante radiomarcado de la sonda, por ejemplo, con ³²P. La hibridación selectiva puede conseguirse normalmente utilizando condiciones del medio muy rigurosas. Sin embargo, dicha hibridación puede llevarse a cabo con cualquiera de las condiciones adecuadas conocidas en la materia (véase Sambrook *et al*, 1989. Por ejemplo, si se requiere una restricción amplia, las condiciones adecuadas incluyen de 0,1 a 0,2 x SSC a 60 °C hasta 65 °C. Si se requiere una restricción más baja, las condiciones adecuadas incluyen 2 x SSC a 60 °C.
- La secuencia de codificación de la SEC ID N°: 3 puede modificarse mediante sustituciones de nucleótidos, por ejemplo desde 1, 2 o 3 a 10, 25, 50 o 100 sustituciones. El polinucleótido de la SEC ID N°: 3 puede modificarse de forma alternativa o adicional por una o más inserciones y/o deleciones y/o por una extensión en cualquiera o en ambos extremos. Pueden incluirse también secuencias adicionales tales como secuencias de señalización. El polinucleótido modificado codifica generalmente un polipéptido que tiene actividad cisteína proteasa específica de IgG. Como alternativa, un polinucleótido codifica una porción de epitopo de un polipéptido IdeS. Pueden realizarse sustituciones degeneradas y/o pueden realizarse sustituciones que dieran como resultado una sustitución de aminoácidos conservativa cuando se tradujera la secuencia modificada, por ejemplo, como se muestra en la Tabla anterior.
- Una secuencia de nucleótidos que puede hibridarse selectivamente con el complemento de la secuencia de codificación del ADN de SEC ID N°: 3 tendrá generalmente al menos el 60 %, al menos el 70 %, al menos el 80 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 98 % o al menos el 99 % de identidad de la secuencia con la secuencia de codificación de la SEC ID N°: 3 sobre una región de al menos 20, preferentemente al menos 30, por

ejemplo al menos 40, al menos 60, más preferentemente al menos 100 nucleótidos o lo más preferente sobre la longitud completa de SEC ID N°: 3.

5 Por ejemplo, el paquete UWGCG proporciona el programa BESTFIT que se puede usar para calcular la homología (utilizada por ejemplo en sus ajustes por defecto) (Devereux et al (1984) *Nucleic Acids Research* 12, p387-395). Los algoritmos PILEUP y BLAST se pueden usar para calcular la homología en línea de las secuencias (normalmente sobre sus ajustes por defecto), por ejemplo, como se describe en Altschul (1993) *J. Mol. Evol.* 36:290-300; Altschul et al (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-10.

10 El programa informático para llevar a cabo los análisis BLAST está públicamente disponible del National Centre for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Este algoritmo implica en primer lugar identificar una pareja de secuencias con una alta puntuación (HSP) identificando palabras de longitud corta W en la petición de secuencia que empareja o satisface alguna puntuación T del umbral valorada como positiva cuando se alinea con una palabra de la misma longitud en la secuencia de la base de datos. T se denomina el umbral de puntuación de palabras adyacentes (Altschul *et al*, 1990). Estos aciertos iniciales de palabras adyacentes actúan como semillas para iniciar búsquedas para encontrar los HSP que las contienen. Los aciertos de palabras se extienden en ambas direcciones a lo largo de cada secuencia para que se pueda aumentar de forma coherente la puntuación de la alineación acumulativa. Las extensiones de los aciertos de palabras en cada dirección se detienen cuando: la puntuación de la alineación acumulativa disminuye en una cantidad X de su valor máximo conseguido; la puntuación acumulativa llega a un valor de cero o inferior, debido a la acumulación de una o más alineaciones de restos con puntuación negativa; o se alcanza el extremo de cualquier secuencia. Los parámetros W, T y X del algoritmo BLAST determinan la sensibilidad y la velocidad de la alineación. El programa BLAST utiliza por defecto una longitud (W) de 11, la matriz de puntuación BLOSUM62 (véanse Henikoff y Henikoff (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 10915-10919) alineaciones (B) de 50, expectativa (E) de 10, M=5, N=4, y una comparación de ambas cepas.

25 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 la similitud proporcionada por el algoritmo BLAST es la probabilidad de la suma más pequeña (P(N)), que proporciona una indicación de la probabilidad por la cual se podría producir por casualidad un emparejamiento entre dos nucleótidos o secuencias de aminoácidos. Por ejemplo, una secuencia se considera similar a otra secuencia si la probabilidad de la suma más pequeña comparando la primera secuencia con la segunda secuencia es menor de aproximadamente 1, preferentemente menos de aproximadamente 0,1, más preferentemente menos de aproximadamente 0,01, y lo más preferente menos de aproximadamente 0,001.

35 Se puede utilizar cualquier combinación de los anteriores grados mencionados de identidad de secuencias y tamaños mínimos para definir polinucleótidos, prefiriéndose las combinaciones más restrictivas (es decir, mayor identidad de secuencia sobre longitudes más largas). De esta manera, por ejemplo, un polinucleótido que tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia sobre 25, preferentemente sobre 30 nucleótidos forma un aspecto de la divulgación, al igual que un polinucleótido que tiene al menos un 95 % de identidad de secuencia sobre 40 nucleótidos.

45 Los fragmentos de polinucleótidos, tales como los adecuados para su uso como sondas o cebadores tendrán preferentemente al menos 10, preferentemente al menos 15 o al menos 20, por ejemplo al menos 25, al menos 30 o al menos 40 nucleótidos de longitud. Tendrán normalmente un máximo de 40, 50, 60, 70, 100 o 150 nucleótidos de longitud. Las sondas y fragmentos pueden tener una longitud superior a 150 nucleótidos, por ejemplo hasta 200, 300, 400, 500, 600, 700 nucleótidos de longitud, o incluso hasta unos pocos nucleótidos, tales como cinco o diez nucleótidos, abreviatura de la secuencia de codificación de la SEC ID N°: 3.

50 Los polinucleótidos se pueden producir de forma recombinante, sintética, o mediante cualquier método conocido de los expertos en la materia. Pueden clonarse también mediante técnicas normalizadas. Los polinucleótidos se proporcionan normalmente en forma aislada y/o purificada.

55 En general, los cebadores se producirán por medios sintéticos, que implica una fabricación por etapas de un nucleótido a la vez de la secuencia de ácidos nucleicos deseada. Las técnicas para llevar a cabo esto utilizando técnicas automatizadas están fácilmente disponibles en la materia.

60 Se producirán generalmente polinucleótidos más largos utilizando medios recombinantes, por ejemplo, utilizando técnicas de clonación mediante la PCR (reacción en cadena de la polimerasa). Esto implicará fabricar una pareja de cebadores (por ejemplo, de aproximadamente 15-30 nucleótidos) para una región del gen *ideS* que se desea clonar, poniendo los cebadores en contacto con el ADN obtenido de una célula bacteriana, llevando a cabo una reacción en cadena de la polimerasa en condiciones que produzcan la amplificación de la región deseada, aislando el fragmento amplificado (por ejemplo, purificando la mezcla de reacción en un gel de agarosa) y recuperando el ADN amplificado. Los cebadores pueden diseñarse para contener sitios adecuados de reconocimiento de la enzima de restricción de tal manera que el ADN amplificado se pueda clonar en un vector de clonación adecuado. Los cebadores adecuados son por ejemplo, los de las SEC ID N°s: 4, 5, 6 o 7.

Dichas técnicas se pueden usar para obtener toda o parte de la secuencia del gen the *ideS* descrita en el presente documento. Aunque en general, las técnicas mencionadas en el presente documento son bien conocidas en la materia, se puede hacer referencia en concreto a Sambrook et al, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 1989.

5 Los polinucleótidos pueden tener utilidad en la producción de polipéptidos de acuerdo con la divulgación, que puede tener lugar *in vitro*, *in vivo* o *ex vivo*. Los polinucleótidos se pueden usar como agentes terapéuticos o de inmunización por derecho propio o pueden estar implicados en la síntesis de proteínas recombinantes.

10 Los polinucleótidos se pueden usar como cebador, por ejemplo, un cebador de la PCR, un cebador para una reacción de amplificación alternativa, una sonda por ejemplo marcada con una etiqueta reveladora por medios convencionales utilizando etiquetas radioactivas o no radioactivas, o los polinucleótidos pueden clonarse en vectores.

15 Los polinucleótidos o cebadores pueden transportar una etiqueta reveladora. Las etiquetas adecuadas incluyen radioisótopos tales como ³²P o ³⁵S, marcadores enzimáticos, u otras etiquetas de proteínas tales como biotina. Se pueden añadir dichas etiquetas a los polinucleótidos o cebadores de la invención y se pueden detectar utilizando técnicas conocidas *per se*.

20 Una persona experta en la materia puede usar polinucleótidos o cebadores o sus fragmentos, marcados o sin marcar, en ensayos basados en ácidos nucleicos para detectar o secuenciar *ideS* en una muestra.

25 Dichos ensayos de detección comprenden generalmente poner una muestra que comprende ADN o ARN en contacto con una sonda que comprende un polinucleótido o cebador en condiciones de hibridación y detectar cualquier duplete formado entre la sonda y el ácido nucleico en la muestra. Dicha detección puede conseguirse utilizando técnicas como la PCR o inmovilizando la sonda sobre un soporte sólido, eliminando de la muestra el ácido nucleico que no se hibrida con la sonda, y a continuación detectando el ácido nucleico que se hibrida con la sonda. Como alternativa, la muestra de ácido nucleico se puede inmovilizar sobre un soporte sólido, y se puede detectar la cantidad de sonda unida a dicho soporte.

30 Las sondas pueden envasarse cómodamente en la forma de un kit de ensayo en un envase adecuado. En dichos kits, la sonda se puede unir a un soporte sólido cuando los formatos de ensayo para los cuales se diseña el kit requieren dicha unión. El kit puede contener también reactivos adecuados para tratar la muestra que se va a sondear, hibridando la sonda con ácido nucleico en la muestra, reactivos de control, instrucciones, y similares.

35 Los polinucleótidos pueden incorporarse a un vector replicable recombinante. El vector se puede usar para replicar el ácido nucleico en una célula hospedadora compatible. Por tanto, los polinucleótidos pueden prepararse introduciendo un polinucleótido en un vector replicable, introduciendo el vector en una célula hospedadora compatible y haciendo crecer la célula hospedadora en condiciones que consigan la replicación del vector.

40 Preferentemente, el vector es un vector de expresión que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido de la invención. Dichos vectores de expresión se construyen de forma rutinaria en la técnica de la biología molecular y pueden por ejemplo implicar el uso de un ADN de plásmido y los iniciadores, promotores, potenciadores y otros elementos adecuados, que puedan ser necesarios, y que se sitúan en la orientación correcta, para permitir la expresión de la proteína. Serán evidentes otros vectores adecuados para las personas expertas en la materia. Para ejemplos adicionales a este respecto, los inventores se refieren a Sambrook *et al.* 1989.

50 Los polinucleótidos se pueden insertar también en los vectores descritos anteriormente en una orientación de sentido contrario a fin de proporcionar la producción de un ARN de sentido contrario. Se puede producir también ARN de sentido contrario u otros polinucleótidos de sentido contrario o ARN interferente, ARNi, por medios sintéticos. Dichos polinucleótidos de sentido contrario o ARNi se pueden usar como compuestos de ensayo en los ensayos de la invención o pueden ser útiles en un método de tratamiento del cuerpo humano o animal mediante terapia.

55 Preferentemente, un polinucleótido para su uso en un vector está unido operativamente a una secuencia control que puede proporcionar la expresión de la secuencia de codificación por la célula hospedadora, es decir, el vector es un vector de expresión. El término "unido operativamente" se refiere a una yuxtaposición donde los componentes descritos están en una relación que les permite funcionar en su manera prevista. Una secuencia reguladora, tal como un promotor, "unida operativamente" a una secuencia de codificación se sitúa de tal manera que se consigue la expresión de la secuencia de codificación en condiciones compatibles con la secuencia reguladora.

60 Los vectores pueden ser, por ejemplo, vectores plásmidos, vectores víricos o vectores de fagos proporcionados con un origen de replicación, opcionalmente un promotor para la expresión del mencionado polinucleótido y opcionalmente un regulador del promotor. Los vectores pueden contener uno o más genes marcadores seleccionables, por ejemplo, un gen de resistencia a la ampicilina en el caso de un plásmido bacteriano o un gen de resistencia para un vector fúngico.

65

Los promotores y otras señales de regulación de la expresión se pueden seleccionar para ser compatibles con la célula hospedadora para la cual se ha diseñado la expresión. Por ejemplo, los promotores de levaduras incluyen los promotores de *S. cerevisiae* GAL4 y ADH, *S. pombe* *mt1* y el promotor *adh*. Los promotores de mamíferos incluyen el promotor de la metalotioneína que se puede inducir en respuesta a metales pesados tales como cadmio. Se pueden usar también promotores víricos tales como el promotor del antígeno T grande de SV40 o promotores de adenovirus. Todos estos promotores están fácilmente disponibles en la técnica.

Se pueden usar promotores de mamíferos, tales como promotores de la p-actina. Son especialmente preferidos los promotores específicos de tejidos. Se pueden usar también promotores víricos, por ejemplo, la repetición terminal larga del virus Moloney de la leucemia de murino (MMLV LTR), el promotor LTR del virus del sarcoma de rous (VSR), el promotor de SV40, el promotor IE del citomegalovirus humano (CMV), adenovirus, los promotores del VHS (tales como los promotores IE del VHS), o los promotores del VPH, particularmente la región reguladora corriente arriba del VPH (URR). Están fácilmente disponibles en la técnica los promotores víricos.

El vector puede incluir además secuencias que flanquean el polinucleótido que proporcionan polinucleótidos que comprenden secuencias homólogas a las secuencias genómicas eucariotas, preferentemente secuencias genómicas de mamíferos, o secuencias genómicas víricas. Esto permitirá la introducción de los polinucleótidos en el genoma de las células o virus eucariotas mediante recombinación homóloga. En particular, se puede usar un vector de plásmido que comprende el casete de expresión flanqueado por secuencias víricas para preparar un vector vírico adecuado para administrar los polinucleótidos de la invención a una célula de mamífero. Otros ejemplos de vectores víricos adecuados incluyen los vectores del virus del herpes simple y de retrovirus, incluyendo lentivirus, adenovirus, virus adenoasociados y virus VPH. Los expertos en la materia conocen las técnicas de transferencia génica utilizando estos virus. Se pueden usar, por ejemplo, vectores de retrovirus para integrar de forma estable el polinucleótido que proporciona un aumento de polinucleótidos en el genoma hospedador. Los vectores de adenovirus con defectos en la replicación, por el contrario, siguen siendo episómicos y permiten por tanto una expresión transitoria.

Los vectores se pueden usar *in vitro*, por ejemplo, para la producción de ADN o ARN o utilizarse para transfectar o transformar una célula hospedadora, por ejemplo, una célula hospedadora de mamífero. Los vectores pueden también adaptarse a utilizarse *in vivo*, por ejemplo, en un método de terapia génica o de inmunización mediante ácido nucleico.

Los vectores de expresión se pueden transformar en una célula hospedadora adecuada para proporcionar la expresión de un polipéptido o de un fragmento de polipéptido de la invención. La célula hospedadora, transformada o transfectada con un vector de expresión como se ha descrito anteriormente, se cultiva en condiciones que permitan la expresión del polipéptido o fragmento, y se recupera el polipéptido o fragmento expresado. El aislamiento y la purificación pueden llevarse a cabo como se ha descrito anteriormente. Se seleccionarán las células hospedadoras para que sean compatibles con el vector y serán preferentemente bacterianas. Las células hospedadoras pueden ser también células de un animal no humano, o una planta transformada con un polinucleótido de la invención.

Se describen también anticuerpos que pueden unirse de forma específica a un polipéptido de la invención. Dichos anticuerpos son por ejemplo útiles en métodos de purificación, aislamiento o cribado o a su vez como agentes terapéuticos por derecho propio.

Los anticuerpos se pueden sensibilizar contra epítopos específicos de los polipéptidos de acuerdo con la invención. Un anticuerpo, u otro compuesto, "se une específicamente" a una proteína cuando se une con afinidad preferente o alta a la proteína para la cual es específica, pero no se une sustancialmente o se une solo con baja afinidad a las otras proteínas. Son bien conocidos en la materia una variedad de protocolos para la unión competitiva o ensayos inmunoradiométricos para determinar la capacidad de unión específica de un anticuerpo (véase por ejemplo Maddox et al, J. Exp. Med. 158, 1211-1226, 1993). Dichos inmunoensayos implican normalmente la formación de complejos entre la proteína específica y su anticuerpo y la medida de la formación del complejo.

Para los fines de esta divulgación, el término "anticuerpo", a menos que se especifique lo contrario, incluye fragmentos que se unen a un polipéptido de la invención. Dichos fragmentos incluyen fragmentos Fv, F(ab') y F(ab')₂, así como anticuerpos monocatenarios. Adicionalmente, los anticuerpos y sus fragmentos pueden ser anticuerpos quiméricos, anticuerpos injertados a CDR o anticuerpos humanizados.

Se pueden producir anticuerpos mediante cualquier método adecuado. Son bien conocidos en la técnica los medios para preparar y caracterizar anticuerpos, véase por ejemplo Harlow y Lane (1988) "Antibodies: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY. Por ejemplo, se puede producir un anticuerpo sensibilizando el anticuerpo en un hospedador animal contra el polipéptido completo o uno de sus fragmentos, por ejemplo, uno de sus epítopos antigénicos, en el presente documento después del "inmunógeno".

Un método para producir un anticuerpo policlonal comprende inmunizar un animal hospedador adecuado, por ejemplo, un animal experimental, con el inmunógeno y aislar las inmunoglobulinas del suero del animal. El animal

puede, por tanto, inocularse con el inmunógeno, extraerse posteriormente la sangre del animal y purificarse la fracción de IgG.

5 Un método para producir un anticuerpo monoclonal comprende inmortalizar células que producen el anticuerpo deseado. Se pueden producir células de hibridoma fusionando esplenocitos procedentes de un animal experimental inoculado con células tumorales (Kohler y Milstein (1975) Nature 256, 495-497). Se puede seleccionar una célula inmortalizada productora del anticuerpo deseado mediante un procedimiento convencional. Se pueden hacer crecer hibridomas en cultivo o inyectarse por vía intraperitoneal para la formación de fluido de ascites en el torrente sanguíneo de un hospedador alogénico o un hospedador inmunocomprometido. El anticuerpo humano puede prepararse mediante inmunización *in vitro* de linfocitos humanos, seguido por transformación de los linfocitos con el virus de Epstein-Barr.

15 Para la producción de anticuerpos monoclonales y policlonales, el animal experimental es de forma adecuada una cabra, un conejo, rata o ratón. Si se desea, el inmunógeno puede administrarse como un conjugado con el que se acopla el inmunógeno, por ejemplo, mediante una cadena secundaria de restos aminoácidos, a un transportador adecuado. La molécula transportadora es normalmente un transportador fisiológicamente aceptable. El anticuerpo obtenido puede aislarse y, si se desea, purificarse.

20 Los anticuerpos, tanto monoclonales como policlonales, que se dirigen contra los polipéptidos de la divulgación son particularmente útiles en diagnóstico.

25 Los anticuerpos se pueden usar en un método para detectar polipéptidos de la divulgación en una muestra biológica. En general, dicho método comprende (a) incubar una muestra biológica con el anticuerpo en condiciones que permitan la formación de un complejo anticuerpo-antígeno; y (b) determinar si se forma el complejo anticuerpo-antígeno que comprende el anticuerpo. Una muestra puede ser por ejemplo un extracto de tejido, sangre, suero y saliva. De manera similar, se puede usar un polipéptido de la divulgación para detectar la presencia de anticuerpos dirigidos contra IdeS en una muestra, por ejemplo, para proporcionar un indicador de infección por *S. pyogenes*. Preferentemente, un polipéptido de la divulgación para su uso de acuerdo con este aspecto comprende un polipéptido mutante que no tiene actividad cisteína proteasa o tiene una actividad cisteína proteasa reducida, pero mantiene la capacidad de unirse a IgG.

35 Los anticuerpos o polipéptidos se pueden unir a un soporte sólido y/o envasarse en kits en un recipiente adecuado junto con reactivos, controles, instrucciones, etc., adecuados. Los anticuerpos o polipéptidos pueden unirse a una etiqueta reveladora y por tanto pueden ser adecuados para su uso en métodos de formación de imágenes *in vivo*.

40 Los anticuerpos, incluyendo fragmentos de anticuerpos son también útiles en la inmunoterapia pasiva. Los anticuerpos monoclonales, en particular, se pueden usar para sensibilizar anticuerpos anti-idiotipo. Los anticuerpos anti-idiotipo son anticuerpos que transportan una "imagen interna" del antígeno del agente infeccioso contra el cual se desea protección. Son bien conocidas en la materia las técnicas para sensibilizar anticuerpos anti-idiotipo. Estos anticuerpos anti-idiotipo pueden ser también útiles para el tratamiento de *S. pyogenes*, así como para la elucidación de las regiones inmunógenas de los polipéptidos de la divulgación.

45 La invención se refiere también a agentes moduladores que activan o inhiben la actividad cisteína proteasa de IgG de los presentes polipéptidos, en particular, agentes que inhiben la actividad. Los agentes pueden unirse a los polipéptidos. Los agentes pueden modular la unión a IgG de los polipéptidos y/ la actividad cisteína proteasa. Los presentes inventores han mostrado que los inhibidores de IdeS incluyen ácido yodoacético y Z-LVG-CHN₂ y también anticuerpo dirigidos contra IdeS.

50 Los agentes moduladores pueden identificarse en métodos de cribado utilizando los presente polipéptidos. En general, dichos métodos de cribado comprenden:

- (i) poner en contacto un polipéptido y una sustancia en condiciones que permitan la actividad cisteína proteasa de IgG en ausencia de la sustancia; y
- (ii) determinar por tanto si la mencionada sustancia activa o inhibe la actividad del polipéptido.

55 Se puede utilizar cualquier formato de ensayo adecuado. Se prefieren formatos de ensayo que permiten realizar cribados de alto rendimiento.

60 El ensayo puede llevarse a cabo utilizando un polipéptido de la divulgación. El polipéptido puede estar en una preparación purificada o por ejemplo en un sobrenadante de cultivo. Lo más preferible, dicho ensayo podría llevarse a cabo en un único pocillo de placas de plástico para microvaloración de tal manera que se pueden llevar a cabo cribados de alto rendimiento. Normalmente, el polipéptido se incuba con una sustancia de ensayo en la oscuridad a una temperatura de 25 a 42 °C. La reacción enzimática comienza mediante la adición de IgG. A continuación, los productos de reacción pueden analizarse mediante SDS PAGE.

65

- Además del polipéptido, la sustancia y el sustrato de IgG, la mezcla de reacción puede contener un tampón adecuado. Un tampón adecuado incluye cualquier tampón biológico adecuado que puede proporcionar capacidad tamponante a un pH conductor a los requerimientos de reacción de la enzima. El ensayo de la invención puede llevarse a cabo a cualquier temperatura a la cual el polipéptido, en ausencia de inhibidor, es activo. Normalmente, el ensayo se puede llevar a cabo en un intervalo de entre 25 a 42 °C, en particular a 37 °C.
- Se llevaron a cabo ensayos control típicos en ausencia de la sustancia. La sustancia sometida a ensayo se puede evaluar con cualquier otro polipéptido/enzima para excluir la posibilidad de que la sustancia sea un inhibidor general de la expresión génica o de la actividad enzimática. Se pueden llevar a cabo experimentos control en células que no expresan el polipéptido de la invención para establecer si las respuestas deseadas son el resultado de la inhibición o activación del polipéptido. Preferentemente, el ensayo se llevó a cabo en presencia de E64, un inhibidor de la cisteína proteasa de SpeB, particularmente cuando se usaron en el ensayo células de *S. pyogenes*.
- Los ensayos se pueden llevar a cabo también usando construcciones que comprenden un promotor del gen *IdeS* unido operativamente a una secuencia de codificación heteróloga, para identificar compuestos que modulan la expresión de *IdeS* a nivel transcripcional.
- Un promotor significa un promotor de la transcripción. Se pueden aislar promotores *IdeS* por métodos conocidos por los expertos en la materia y que se han descrito anteriormente. El término "heterólogo" indica que la secuencia de codificación no está unida operativamente con el promotor en la naturaleza; la secuencia de codificación es generalmente de un organismo diferente al del promotor. El promotor puede fusionarse directamente con una secuencia de codificación o mediante un enlazador. La secuencia enlazadora puede comprender una secuencia que tiene características potenciadoras para reforzar los niveles de expresión.
- Preferentemente el promotor está unido operativamente a la secuencia de codificación de un polipéptido indicador. El polipéptido indicador puede ser, por ejemplo, el polipéptido bacteriano p-glucuronidasa (GUS), proteína fluorescente verde (GFP), luciferasa (*luc*), cloranfenicol transferasa (CAT) o p-galactosidasa (*lacZ*).
- Pueden incorporarse construcciones génicas promotor:indicador tales como las descritas anteriormente en un vector replicable recombinante. El vector se puede usar para replicar la construcción de ácido nucleico en una célula hospedadora compatible. Los vectores pueden ser, por ejemplo, vectores plásmidos, vectores víricos o vectores de fagos provistos de un origen de replicación. Se puede usar cualquier célula hospedadora donde el promotor sea funcional, pero normalmente la célula hospedadora será una célula de la especie de la cual se deriva el promotor. Las construcciones génicas de promotor:indicador pueden introducirse en células hospedadoras utilizando técnicas convencionales.
- Se divulga por tanto en el presente documento un método para identificar un modulador de la expresión de *IdeS*. Normalmente, una construcción polipeptídica de promotor:indicador o una célula que hospeda la construcción se pondrá en contacto con una sustancia de ensayo en condiciones que permitirían la expresión del polipéptido indicador en ausencia de la sustancia de ensayo.
- Se puede usar cualquier polipéptido indicador, pero normalmente se utilizan GUS o GFP. GUS se sometió a ensayo midiendo la hidrólisis de un sustrato adecuado, por ejemplo ácido 5-bromo-4-cloro-3-indolilBp-D-glucurónico (X-gluc) o 4-metilumbelliferil-pBglucurónido (MUG). La hidrólisis de MUG da como resultado un producto que se puede medir fluorométricamente. Se cuantificó GFP midiendo la fluorescencia a 590 nm tras la excitación a 494 nm. Estos métodos son bien conocidos de los expertos en la materia.
- Las sustancias también pueden evaluarse directamente para determinar su unión a un polipéptido de la divulgación. Por ejemplo, se puede incubar una sustancia radiomarcada con un polipéptido de la divulgación y vigilarse la unión de la sustancia al polipéptido. Se puede determinar también la unión no específica de la sustancia llevando a cabo un ensayo de unión competitiva. Se puede identificar también la sustancia que inhibe la interacción de un polipéptido de la divulgación con IgG utilizando un ensayo de interacción de proteínas tal como inmunoprecipitación o una técnica basada en ELISA.
- Una sustancia que modula la expresión o la actividad de un polipéptido de la divulgación puede por tanto unirse directamente al promotor del gen relevante, inhibiendo o activando de esta manera la transcripción del gen. La inhibición puede producirse evitando el inicio o la finalización de la transcripción. Se puede producir la activación, aumentando por ejemplo la afinidad del complejo de transcripción por el promotor. Como alternativa, un modulador puede unirse a una proteína que está asociada con el promotor y que es necesaria para la transcripción.
- Una sustancia que modula la actividad del polipéptido puede por tanto unirse a la enzima. Dicha unión puede dar como resultado la activación o la inhibición de la proteína. Se puede producir la inhibición, por ejemplo, si el modulador se asemeja al sustrato y se une al sitio activo de la enzima. Se evita de esta manera que la IgG se una al mismo sitio activo y se reduzca la velocidad de catálisis reduciendo la proporción de las moléculas de enzima unidas al sustrato. Un modulador que inhibe la actividad puede por tanto unirse al sustrato.

Las sustancias adecuadas que se pueden evaluar en los anteriores ensayos incluyen bibliotecas combinatorias, entidades y compuestos químicos definidos, péptidos y péptidos miméticos, oligonucleótidos y bibliotecas de productos naturales, tales como productos de expresión (por ejemplo, bibliotecas de expresión de fagos) y productos de anticuerpos.

5 Normalmente, se cribarán moléculas orgánicas, preferentemente moléculas orgánicas pequeñas que tienen un peso molecular de entre 50 a 2500 daltons. Los productos candidatos pueden ser biomoléculas que incluyen, sacáridos, ácidos grasos, esteroides, purinas, pirimidinas, derivados, análogos estructurales o sus combinaciones. Se obtienen agentes candidatos a partir de una amplia variedad de fuentes que incluyen bibliotecas de compuestos sintéticos o naturales. Los agentes farmacológicos conocidos se pueden someter a modificaciones químicas dirigidas o aleatorias, tales como acilación, alquilación, esterificación, amidación, etc. para producir análogos estructurales.

15 Se pueden usar sustancias en un cribado inicial de, por ejemplo, 10 sustancias por reacción, y las sustancias de estos lotes que muestran inhibición o activación evaluarse individualmente. Se pueden usar las sustancias a una concentración de entre 1 nM a 1000 μ M, preferentemente de 1 μ M a 100 μ M, más preferentemente de 1 μ M a 10 μ M. Preferentemente, la actividad de una sustancia se compara con la actividad que muestra un activador o inhibidor conocido.

20 Un modulador de la expresión y/o la actividad del presente polipéptido es aquel que produce una reducción o aumento medibles en la expresión y/o la actividad en ensayos tales como los descritos anteriormente. De esta manera, los moduladores pueden ser inhibidores o activadores de la expresión y/o la actividad.

25 Los inhibidores preferidos son aquellos que inhiben la expresión y/o la actividad en al menos el 10 %, al menos el 20 %, al menos el 30 %, al menos el 40 %, al menos el 50 %, al menos el 60 %, al menos el 70 %, al menos el 80 %, al menos el 90 %, al menos el 95 % o al menos el 99 % a una concentración del inhibidor de 1 μ g ml⁻¹, 10 μ g ml⁻¹, 100 μ g ml⁻¹, 500 μ g ml⁻¹, 1 mg ml⁻¹, 10 mg ml⁻¹, 100 mg ml⁻¹.

30 Los activadores preferidos son aquellos que activan la expresión y/o la actividad en al menos el 10 %, al menos el 25 %, al menos el 50 %, al menos el 100 %, al menos, 200 %, al menos 500 % o al menos 1000 % a una concentración del activador de 1 μ g ml⁻¹, 10 μ g ml⁻¹, 100 μ g ml⁻¹, 500 μ g ml⁻¹, 1 mg ml⁻¹, 10 mg ml⁻¹, 100 mg ml⁻¹.

35 El porcentaje de inhibición o activación representa el porcentaje de disminución o aumento en la expresión/actividad en una comparación de ensayos en presencia y ausencia de la sustancia de ensayo. Cualquier combinación de los grados anteriormente mencionados de porcentaje de inhibición o activación y concentración de inhibidor o activador se puede usar para definir un inhibidor o activador de la invención, prefiriéndose mayor inhibición o activación a concentraciones más bajas.

40 Se describen en este documento polipéptidos, polinucleótidos, anticuerpos y agentes que se han descrito anteriormente para su uso en tratamiento o profilaxis. En particular, son útiles para el tratamiento de la infección por *S. pyogenes* de un ser humano o animal. El tratamiento puede ser terapéutico o profiláctico.

45 Preferentemente, la cepa infectante de *S. pyogenes* es una cepa que expresa IdeS. Dichas cepas pueden identificarse como se ha descrito anteriormente. Normalmente, la cepa es del serotipo M1, M12 o M55. Los ejemplos de cepas adecuadas incluyen AP1, AP12, AP55, KTL3 y SF370. En una realización preferida, la cepa es del serotipo M1, tal como AP1.

50 Las dolencias que suelen ser diana incluyen las asociadas con infección aguda y también secuelas tras infección aguda. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, impétigo, faringitis, septicemia, fascitis necrotizante, síndrome de choque tóxico estreptocócico, fiebre reumática aguda y glomerulonefritis post-estreptocócica.

Preferentemente, el individuo que se va a tratar es un ser humano.

55 La invención proporciona adicionalmente composiciones farmacéuticas que comprenden los polipéptidos o sustancias de la divulgación y un transportador o diluyente farmacéuticamente aceptable.

60 La formulación con transportadores y/o excipientes normalizados farmacéuticamente aceptables puede llevarse a cabo utilizando métodos rutinarios en la técnica farmacéutica. Por ejemplo, una sustancia activa se puede disolver en solución salina fisiológica o agua para inyecciones. La naturaleza exacta de una formulación dependerá de varios factores incluyendo la sustancia concreta que se va a administrar y la ruta deseada de administración. Los tipos adecuados de formulación se describen completamente en Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Eastern Pennsylvania, 17^a Ed, 1985, cuya divulgación se ha incorporado en el presente documento por referencia en su totalidad.

65 Las sustancias pueden administrarse por rutas entéricas o parenterales tales como por vía oral, bucal, anal, pulmonar, intravenosa, intraarterial, intramuscular, intraperitoneal, tópica u otras rutas de administración adecuadas.

Los polipéptidos de la divulgación son útiles para el tratamiento profiláctico de individuos. Normalmente, el polipéptido utilizado representa o codifica un epítipo de IdeS. En general, el polipéptido puede generar una respuesta inmune, en particular una respuesta inmunoprotectora en el individuo que se va a tratar. Preferentemente, se generan anticuerpos que tienen la capacidad de bloquear la actividad enzimática de la IgG de IdeS. Dichos polipéptidos pueden identificarse mediante los métodos descritos anteriormente.

En general, para dichos usos, los polipéptidos se incorporan a composiciones de vacunas.

Se pueden preparar vacunas de una o más de las proteínas o péptidos de la divulgación y un transportador o diluyente fisiológicamente aceptable. Normalmente, dichas vacunas se preparan como inyectables, tanto como soluciones o suspensiones líquidas; se pueden preparar también formas sólidas para disolución en, o suspensión en, líquidos antes de la inyección. La preparación también se puede emulsionar, o la proteína se puede encapsular en un liposoma. El ingrediente inmunógeno activo puede mezclarse con un excipiente que es farmacéuticamente aceptable y compatible con el principio activo. Los excipientes adecuados son, por ejemplo, agua, solución salina, dextrosa, glicerol, etanol, o similares y sus combinaciones.

Además, si se desea, la vacuna puede contener cantidades menores de sustancias auxiliares tales como agentes humectantes o emulsionantes, agentes tamponadores del pH, y/o adyuvantes que potencian la eficacia de la vacuna. Los ejemplos de adyuvantes que pueden ser eficaces incluyen, pero no se limitan a: hidróxido de aluminio, N-acetil-muramyl-L-treonil-D-isoglutamina (thr-MDP), N-acetil-nor-muramyl-L-alanil-D-isoglutamina (CGP 11637, denominado no-MDP), N-acetilmuramyl-L-alanil-D-isoglutaminil-L-alanina-2-(1'-2'-dipalmitoil-sn-glicero-3-hidroxi-fosforilo)-etilamina (CGP 19835A, denominado MTP-PE), y RIBI, que contiene tres componentes extraídos de bacterias, monofosforil lípido A, dimicolato de trehalosa y esqueleto de la pared celular (MPL+TDM+CWS) en una emulsión de escualeno/Tween 80 al 2 %. Se puede determinar la eficacia de un adyuvante midiendo la cantidad de anticuerpos dirigidos contra un polipéptido inmunógeno que contiene una secuencia antigénica de IdeS resultante de la administración de este polipéptido en vacunas que también incluyen diversos adyuvantes.

Las vacunas se administran convencionalmente por vía parenteral, mediante inyección, por ejemplo, tanto por vía subcutánea como intramuscular. Las formulaciones adicionales que son adecuadas para otros modos de administración incluyen supositorios, formulaciones orales y formulaciones para la administración transdérmica. Para supositorios, los aglutinantes y transportadores tradicionales pueden incluir, por ejemplo, polialquilenglicoles o triglicéridos; dichos supositorios pueden estar formados a partir de mezclas que contienen el principio activo en el intervalo de 0,5 % a 10 %, preferentemente de 1 % a 2 %. Las formulaciones orales incluyen dichos excipientes normalmente empleados como, por ejemplo, calidades farmacéuticas de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, celulosa, carbonato de magnesio, y similares. Estas composiciones toman la forma de soluciones, suspensiones, comprimidos, píldoras, cápsulas, formulaciones o polvos de liberación continua y contienen de 10 % a 95 % de principio activo, preferentemente de 25 % a 70 %. Cuando la composición de vacuna se liofiliza, el material liofilizado puede reconstituirse antes de la administración, por ejemplo, una suspensión. La reconstitución se efectúa preferentemente en tampón.

Se pueden proporcionar cápsulas, comprimidos y píldoras para su administración oral a un paciente con un revestimiento entérico que comprende, por ejemplo, Eudragit "S", Eudragit "L", acetato de celulosa, acetato ftalato de celulosa o hidroxipropilmetil celulosa.

Se pueden usar también composiciones de vacuna adecuadas para inyección sin aguja, por ejemplo, por vía transdérmica.

Las proteínas o péptidos de la divulgación pueden formularse en la vacuna como formas neutras o salinas. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen sales de adición de ácido (formadas con los grupos amino libres del péptido) y que se forman con ácidos inorgánicos tales como, por ejemplo, ácidos clorhídrico o fosfórico, o dichos ácidos orgánicos tales como acético, oxálico, tartárico y maleico. Pueden derivarse también sales formadas con los grupos carboxilo libres de bases inorgánicas tales como, por ejemplo, sodio, potasio, amonio, calcio, hierro, y bases orgánicas tales como isopropilamina, trimetilamina, 2-etilamino etanol, histidina y procaína.

Las vacunas se administran de una manera compatible con la formulación de la dosificación y en tal cantidad serán profiláctica y/o terapéuticamente eficaces. La cantidad que se va a administrar, que está generalmente comprendida en el intervalo de 5 µg a 100 mg, preferentemente 250 µg a 10 mg de antígeno por dosis, depende del sujeto que se va a tratar, la capacidad del sistema inmune del sujeto para sintetizar anticuerpos, y el grado de protección deseado. Las cantidades precisas de principio activo requeridas para administrarse pueden depender del criterio del médico a cargo del tratamiento y pueden ser peculiares de cada sujeto.

La vacuna puede administrarse en único calendario de dosis, o preferentemente en un calendario de dosis múltiple. Un calendario de dosis múltiple es aquel donde un curso primario de vacunación puede ser de 1-10 dosis separadas, seguido por otras dosis administradas en intervalos de tiempo posteriores requeridos para mantener y/o reforzar la respuesta inmune, por ejemplo, de 1 a 4 meses para una segunda dosis, y si es necesario, una(s) dosis posterior(es) tras varios meses. El régimen de dosificación se determinará también, al menos en parte, por la

necesidad del individuo y dependerá del criterio del médico a cargo del tratamiento.

Las secuencias de nucleótidos y los vectores de expresión descritos en el presente documento también pueden utilizarse como formulaciones de vacuna como se ha reseñado anteriormente. Preferentemente, el ácido nucleico, tal como ARN o ADN, en particular ADN, se proporciona en la forma de un vector de expresión, que se puede expresar en las células del individuo que se va a tratar. Las vacunas pueden comprender secuencias de nucleótidos puras 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 mediante inyección con aguja, preferentemente por vía intradérmica, subcutánea o intramuscular. Como alternativa, el ácido nucleico puede administrarse directamente a través de la piel utilizando un dispositivo de administración de ácido nucleico tal como una administración génica mediada por partículas. El ácido nucleico puede administrarse por vía tópica a la piel, o a las superficies de la mucosa mediante por ejemplo administración intranasal, oral, intravaginal o intrarrectal.

Se puede potenciar la captación de construcciones de ácidos nucleicos mediante algunas técnicas de transfección conocidas, por ejemplo, las que incluyen el uso de agentes de transfección. Los ejemplos de estos agentes incluyen agentes catiónicos, por ejemplo, fosfato de calcio y DEAE-Dextrano y lipofectantes, por ejemplo, lipofectam y transfectam. Se puede alterar la dosificación del ácido nucleico que se va a administrar. Normalmente, el ácido nucleico se administra en el intervalo de 1 pg a 1 mg, preferentemente de 1 pg a 10 µg de ácido nucleico por administración génica mediada por partículas y 10 µg a 1 mg para otras rutas.

Los agentes inhibidores, identificados de acuerdo con los métodos de cribado anteriores, también pueden ser útiles en la prevención o tratamiento de dolencias asociadas con la infección. Estos agentes pueden formularse con transportadores y/o excipientes farmacéuticamente aceptables convencionales utilizando métodos rutinarios.

Los anticuerpos divulgados en el presente documento y las sustancias de la divulgación pueden ser útiles para el tratamiento terapéutico de las infecciones por *S. pyogenes*.

Los anticuerpos, policlonales y monoclonales, que son neutralizantes, son útiles en inmunoterapia pasiva. Los anticuerpos monoclonales, en particular, se pueden usar para sensibilizar anticuerpos anti-idiotipo como anteriormente. Estos anticuerpos anti-idiotipo pueden ser también útiles para el tratamiento de *S. pyogenes*, así como para la elucidación de las regiones inmunógenas de los polipéptidos de la divulgación. Los fragmentos de anticuerpo, por ejemplo, fragmentos Fab, pueden ser también útiles en la inmunoterapia de la infección por *S. pyogenes*.

Los anticuerpos pueden formularse con un transportador farmacéuticamente aceptable y administrarse de la misma manera que se muestra para las composiciones de vacuna. Preferentemente, el anticuerpo se administra en una cantidad eficaz para mejorar la infección por *S. pyogenes* en el individuo.

Los inhibidores de la actividad de IdeS, por ejemplo, los identificados por los métodos de cribado anteriores, pueden ser útiles para el tratamiento terapéutico de las infecciones por *S. pyogenes*. Estas sustancias pueden formularse con transportadores y/o excipientes farmacéuticamente aceptables convencionales utilizando métodos rutinarios y administrarse de la misma manera que se muestra para las composiciones de vacuna. El inhibidor se administra a un individuo en una cantidad terapéuticamente eficaz. Se puede administrar la dosis de un inhibidor de acuerdo con diversos parámetros, especialmente de acuerdo con la sustancia utilizada; la edad, el peso y la dolencia del paciente que se va a tratar; la ruta de administración; y el régimen requerido. Un médico podrá determinar la ruta de administración requerida y la dosificación de cualquier paciente concreto.

En un aspecto, se puede tratar una infección por *S. pyogenes* mediante la administración de un anticuerpo y un agente inhibidor. El anticuerpo y el agente pueden administrarse simultáneamente, independientemente, o secuencialmente. De acuerdo con ello, la divulgación se refiere también a productos donde el anticuerpo y el agente se suministran para su uso en dicho régimen de tratamiento.

Se describen también en el presente documento métodos para el diagnóstico de la infección por *S. pyogenes* en un individuo, preferentemente un ser humano. Los polipéptidos y anticuerpos descritos anteriormente pueden utilizarse para dicho diagnóstico. Los polipéptidos se pueden utilizar para detectar anticuerpos específicos contra los polipéptidos en el individuo o viceversa, determinando de esta manera la infección. Los polipéptidos adecuados para su uso en diagnóstico son los que tienen la capacidad de unión específica del anticuerpo. Por ejemplo, dichos polipéptidos comprenden normalmente un epítipo de IdeS. Se pueden identificar los polipéptidos adecuados mediante los métodos descritos anteriormente. Los anticuerpos para su uso en diagnóstico pueden identificarse y producirse mediante los métodos descritos anteriormente.

El método diagnóstico puede llevarse a cabo *in vitro* o *in vivo*. Preferentemente, el método se lleva a cabo *in vitro* utilizando una muestra tomada del individuo que se va a someter a ensayo para determinar la infección por *S. pyogenes*. Una muestra puede ser por ejemplo un extracto de tejido, sangre, suero o saliva. En general, el método puede implicar (i) poner en contacto una muestra biológica tomada del individuo con un polipéptido o anticuerpo en

condiciones que permitan la formación de un complejo anticuerpo-polipéptido; y (ii) determinar si se forma el complejo anticuerpo-polipéptido.

5 Normalmente, los polipéptidos o anticuerpos para su uso en el ensayo se marcan adecuadamente. Se conocen en la técnica las marcas y los sistemas de detección adecuados. Los polipéptidos o anticuerpos pueden unirse a un soporte sólido y/o envasarse en kits en un recipiente adecuado junto con los reactivos, controles, instrucciones, etc. Los anticuerpos también pueden unirse a una etiqueta reveladora y por tanto pueden ser adecuados para su uso en métodos de formación de imágenes *in vivo*.

10 En un aspecto adicional, los presentes polipéptidos pueden proporcionar herramientas útiles para biotecnología. Por ejemplo, los polipéptidos se pueden utilizar para la escisión específica *in vitro* de IgG, en particular IgG humana. En dicho método el polipéptido puede incubarse con una muestra que contiene IgG en condiciones que permitan que se produzca la actividad específica de cisteína proteasa. Se puede verificar la escisión específica, y los productos de la invención se pueden aislar usando los métodos descritos anteriormente. Puede utilizarse en particular el método de la
15 invención para generar fragmentos Fc y Fab. Pueden utilizarse los polipéptidos para escindir IgG en una muestra, por ejemplo, en un método para eliminar IgG de una muestra. Dichos métodos se pueden utilizar para ayudar a eliminar la inmunoglobulina de una muestra, o para eliminar la IgG durante la purificación de otra inmunoglobulina.

20 Los polipéptidos modificados que no tienen actividad cisteína proteasa adicional se pueden utilizar para unirse y aislar o purificar IgG. Por ejemplo, dicho polipéptido puede unirse a un soporte sólido y una muestra que contiene IgG ponerse en contacto con el soporte en condiciones que permitan a IgG unirse con el polipéptido. Dicho método puede utilizarse también para eliminar la IgG de una muestra, el resto de la muestra, exenta de IgG, se recoge para el posterior uso o análisis. La IgG puede desorberse posteriormente del soporte sólido si se requiere.

25 Los polipéptidos pueden utilizarse también para detectar la IgG en una muestra. En general, dicho método de detección implica incubarse el polipéptido con la muestra en condiciones que permitan la unión y escisión específicas de la IgG. La presencia de IgG se puede verificar mediante la detección de los productos de escisión específicos de IgG como anteriormente.

30 Ejemplos

Materiales y métodos

35 Salvo que se indique otra cosa, los métodos utilizados son técnicas bioquímicas y técnicas de biología molecular convencionales. Los ejemplos de libros de texto de metodología adecuada incluyen Sambrook et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* (1989) y Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology* (1995), John Wiley and Sons, Inc.

Cepas bacterianas y condiciones de crecimiento

40 Las cepas de *S. pyogenes* utilizadas en este estudio se relacionan en la Tabla I.

Cepa	Serotipo M	Referencia o fuente	Escisión de IgG (en presencia de E64)	Producto de la PCR
SF370	1	(Suvorov y Ferretti, 1996; Ferretti <i>et al.</i> , 2001)	(+/-)	+
AP1	1	Colección de la OMS en Praga ^a	+	+
AL1	1	mutante <i>speB</i> de AP1 (Collin y Olsén, 2001a)	+	nd ^d
BMJ71	1	Mutante <i>mga</i> de AP1 (Kihlberg <i>et al.</i> , 1995)	+	nd
KTL3	1	Instituto finés de la salud	(+)	+
AP4	4	Colección de la OMS en Praga	-	+
M5	5	Secuenciación en progreso ^b	-	+
AP6	6	Colección de la OMS en Praga	-	+
AP12	12	Colección de la OMS en Praga	+	+
AP49	49	Colección de la OMS en Praga	-	+
AP53	53	Colección de la OMS en Praga	-	+
AP55	55	Colección de la OMS en Praga	+	+
AP57	57	Colección de la OMS en Praga	-	+

Los estreptococos se hicieron crecer rutinariamente en caldo Todd Hewitt (TH) (Difco) a 37 °C en CO₂ al 5 %. Las cepas BMJ71 y AL1 se hicieron crecer en presencia de 10 µg/ml de tetraciclina o 150 µg/ml de kanamicina, respectivamente. En algunos casos, las bacterias se hicieron crecer en presencia del inhibidor de la cisteína proteinasa *trans*-epoxysuccinil-L-leucilamido-(4-Guanidino) butano (E64) (Sigma).

5

Análisis SDS-PAGE y determinación de la secuencia del extremo N

Se precipitaron las proteínas de los medios de crecimiento de *S. pyogenes* con ácido tricloroacético (concentración final 5 %), se lavaron dos veces con 1 ml de acetona, y se resuspendieron en tampón de muestra. Las proteínas se separaron en SDS-PAGE al 12 % (todos los SDS-PAGE de este trabajo se llevaron a cabo en condiciones reductoras) y se tiñeron con azul de Coomassie. Para el análisis de la secuencia de aminoácidos del extremo N se separaron las proteínas en electroforesis SDS-PAGE al 10 % y se transfirieron a una membrana de PVDF utilizando tampón CAPS 10 mM, metanol al 10 %. Se visualizaron las proteínas en azul de Coomassie R-250 al 0,1 %, metanol al 50 %.

10

15

Tras desteñir en metanol al 50 %, se secaron las membranas, las bandas de proteínas se cortaron con un escalpelo y se almacenaron a -20 °C hasta la secuenciación. La secuenciación se llevó a cabo en Eurosequence Company (Groningen, Países Bajos).

20

Purificación de IdeS

Se purificó IdeS haciendo crecer bacterias a una DO₆₂₀ de ~ 0,4 y fraccionando el cultivo sobrenadante con sulfato de amonio al 50 %. Se descartó el precipitado resultante y se añadió sulfato de amonio al resto del sobrenadante hasta una concentración final del 70 %. El segundo precipitado se resuspendió en 1/100 del volumen inicial con Tris-HCl 20 mM, pH 8,0, y se dializó frente al mismo tampón. El material se fraccionó adicionalmente mediante FPLC en una columna Mono Q (Pharmacia). Las proteínas se eluyeron en un gradiente lineal de NaCl, y se encontró que un pico eluido en NaCl 0,1 M contenía la actividad de IdeS. Las fracciones correspondientes se recogieron, se analizaron mediante SDS-PAGE, y se almacenaron a -20 °C hasta su uso.

25

30

Ensayos de actividad de IdeS

Para los ensayos normalizados de actividad de IdeS, los cultivos bacterianos se hicieron crecer a DO₆₂₀ = 0,4. Las bacterias se aglomeraron mediante centrifugación y los sobrenadantes se esterizaron mediante filtración a través de una membrana de 0,22 µm (Millipore) antes del uso. Para los ensayos de actividad, 25 µl del sobrenadante se mezclaron con 5 µl de IgG (10 mg/ml, Sigma) y el volumen se ajustó con PBS a 100 µl. Para el cribado de la actividad de IdeS en diferentes cepas de *S. pyogenes*, se añadió E64 a una concentración final de 40 µM. Las mezclas se incubaron a 37 °C durante 30 min y las muestras se analizaron mediante SDS-PAGE al 12 %. Para los ensayos de escisión de diferentes clases de Ig, se incubó IdeS purificado (0,3 µg/ml) con 3 µg de Ig durante 2 h a 37 °C, y se analizó mediante análisis de SDS-PAGE al 12 %.

35

40

Análisis mediante PCR del ADN genómico para la identificación de *Ides*

Para analizar la presencia del gen *ideS* en diferentes aislados estreptocócicos, se preparó el ADN del molde de la PCR calentando a ebullición bacterias de *S. pyogenes* durante 5 min en agua estéril.

45

Se eliminaron los residuos celulares mediante centrifugación y se utilizó 1 µl del lisado hervido con los cebadores de la PCR Ide1 (5'-CGT TAC TTC CGT TTG GAT CCA AGG-3') e Ide2 (5'-GAA ATA GCT ACT TCT CGA GCG GAA TT-3'). Se analizaron los productos de la PCR mediante electroforesis en gel de agarosa (1 %).

50

Expresión recombinante de IdeS en *E. coli*

Para amplificación mediante PCR de *ideS*, se preparó el molde de ADN hirviendo bacterias *S. pyogenes* (cepa AP1) en agua estéril. Los residuos celulares se eliminaron mediante centrifugación y se usaron 5 µl del lisado hervido con los cebadores de la PCR Ide5X (5'-TCG GTA GAT CGT GGG ATC CTA GCA GAT AGT-3') creando un sitio de restricción *Bam*HI, e Ide3X (5'-CGG AAT TCT TAA TTG GTC TGA TTC CAA C-3'), creando un sitio de restricción *Eco*RI. Se generó un fragmento de PCR que cubría los pb 79-1020 del gen *ideS* intacto, escindido con enzimas de restricción, y clonado en los sitios correspondientes del plásmido pGEX-5X-3 (Amersham Pharmacia Biotech). El plásmido resultante se transformó en la cepa wBL21(DE3) pLysS de *Escherichia coli*, de acuerdo con los protocolos normalizados (Sambrook *et al.*, 1989). Se indujo la expresión de la proteína mediante la adición de 0,1 mM de isopropil-β-D-tiogalactopiranosido (IPTG) a una DO₆₂₀ de ~ 0,2. El crecimiento se continuó durante 3 h, y los lisados se prepararon mediante congelación de los aglomerados bacterianos a -70 °C, seguido por resuspensión en PBS. Se eliminaron los residuos celulares mediante centrifugación y 2 µl de sobrenadante se incubaron con 5 µl de IgG (10 mg/ml) en PBS, y se separaron mediante SDS-PAGE al 12 % para el análisis de IdeS expresada de manera recombinante.

55

60

65

Ensayos de inhibición de la proteinasa

Se incubó IdeS (0,3 µg/ml) parcialmente purificada con cualquiera de ácido yodoacético 20 mM, Z-LVG-CHN₂ (Björck *et al.*, 1989) a 0,4 mg/ml en DMSO al 1 %, o E64 (40 µM). Los tubos se mantuvieron en la oscuridad y se incubaron durante 30 min a temperatura ambiente. Como controles IdeS se mantuvo también en solución salina tamponada con fosfato (PBS) o en DMSO al 1 %, el disolvente de ZLVG-CHN₂. Después de 30 min, se añadieron 5 µl de 10 mg/ml de IgG (Sigma), y el volumen se ajustó a 100 µl con PBS. La incubación continuó durante 60 min a 37 °C. La reacción se detuvo mediante la adición de un tampón de muestra de SDS-PAGE y se analizaron las muestras en SDS-PAGE al 12 %.

Cultivo de células e infección de células eucariotas

Se cultivó la línea de células RAW 264.7 de tipo macrófago de murino en medio RPMI 1640 (Life Technologies), suplementado con FCS al 10 %, y antibióticos (100 unidades/ml-1 penicilina; 100 µg ml-1 de estreptomycin), en CO₂ al 5 % con 100 % de humedad relativa.

Para estudiar la muerte por fagocitosis, la cepa AP1 de *S. pyogenes* se hizo crecer durante la noche a 37 °C. Las bacterias AP1 se incubaron tanto con plasma inmune como no inmune, se lavaron y se trataron con IdeS o un tampón control, durante 2 h a 37 °C. Posteriormente, las bacterias se lavaron y se diluyeron en medio de cultivo celular exento de antibióticos antes de la infección. Las líneas celulares se lavaron cuidadosamente en medio de cultivo celular exento de antibióticos y se añadieron bacterias (0,1-1 bacterias/células) hasta que las células RAW264.7 fueron confluentes. Las infecciones se sincronizaron mediante centrifugación suave a 400 g durante 3 min mediante incubación a 37 °C. Diez minutos después de la infección, los cultivos celulares se lavaron cuidadosamente en medio exento de antibióticos para eliminar las bacterias no adherentes (tiempo 0 h). Las células del control se lisaron en tampón de lisis enfriado en hielo (Tween al 0,1 %), se diluyeron, y se diseminaron en placas TH. Se incubaron cultivos celulares en paralelo a 37 °C durante 1 h. Posteriormente, se eliminó el medio de crecimiento y las células se lisaron y se trataron como se ha descrito anteriormente. Para el análisis de la supervivencia bacteriana, el número de bacterias supervivientes después de 1 h se dividió por el número de bacterias adherentes a tiempo 0 h.

Resultados*S. pyogenes* secreta una enzima escisora de IgG distinta de SpeB, la cisteína proteinasa estreptocócica clásica

Se analizó la actividad proteolítica de las enzimas extracelulares de la cepa AP1 de *S. pyogenes*, haciendo crecer bacterias AP1 en medio de Todd Hewitt (TH) suplementado con plasma humano al 10 %. Tras el crecimiento en la fase estacionaria, las bacterias se eliminaron mediante centrifugación y el sobrenadante se sometió a SDS-PAGE (todos los SDS-PAGE en este trabajo se llevaron a cabo en condiciones reductoras). El modelo de banda se comparó con el modelo de las proteínas de plasma humano que no habían estado en contacto con las bacterias (no se muestran los datos). El sobrenadante bacteriano contenía una banda de proteína de aproximadamente 31 kDa, que estaba ausente en el plasma del control. Se determinó la secuencia del extremo N de esta proteína como GPSVFLFP, que corresponde a los aminoácidos 237-244 de la región bisagra de la IgG₁ humana (Figura 1). Un trabajo reciente ha mostrado que la cisteína proteasa estreptocócica, SpeB, escinde IgG en este sitio. Sin embargo, la mayoría de las cepas de *S. pyogenes*, incluyendo AP1, no expresa el gen *speB* en medio TH. Además, la actividad proteolítica de SpeB está bloqueada eficazmente por el inhibidor E64 específico de la cisteína proteinasa, pero E64 no inhibe la escisión de IgG cuando se añade al medio de crecimiento AP1, como se evidenció por la generación continuada del producto de escisión de IgG de 31 kDa (no se muestran los datos). Además, el medio de crecimiento de la cepa AL1 mutante isógena deficiente en SpeB contenía también la actividad de escisión de IgG. En su conjunto, estos datos demuestran que SpeB no es responsable de la escisión de IgG en el medio TH.

La cepa AP1 estreptocócica estudiada aquí expresa una C5a peptidasa asociada a superficie, y las proteínas de unión a IgGfC, H y M1. Los genes que codifican estas proteínas superficiales están controlados por el activador transcripcional *mga*, y BMJ71 es un mutante isógeno de AP1, que transporta una inserción Tn916 en el gen *mga*. El producto de escisión de IgG de 31 kDa se generó también en el medio de crecimiento de BMJ71, lo que muestra que la actividad proteolítica no está bajo el control de *mga*.

Purificación y características de la secuencia de IdeS, una novedosa proteinasa de *S. pyogenes*

Como se ha encontrado actividad proteolítica de IgG en el medio de crecimiento de la cepa AP1, los inventores fraccionaron proteínas del medio de cultivo tras el crecimiento bacteriano añadiendo cantidades crecientes de sulfato de amonio (10 a 80 %). Estos experimentos iniciales revelaron que los precipitados de sulfato de amonio del 60 al 70 % contenían la mayoría de la actividad de escisión de IgG. Para la purificación, el medio de crecimiento se fraccionó con sulfato de amonio al 50 %, se descartó el aglomerado resultante y la concentración de sulfato de amonio en el sobrenadante se ajustó al 70 %. Las proteínas aglomeradas en esta segunda precipitación se sometieron a cromatografía de intercambio iónico y las fracciones de los picos se sometieron a ensayo para determinar su actividad enzimática. La actividad máxima de escisión de IgG se eluyó a NaCl 0,1 M y las fracciones

correspondientes contenían una banda principal de aproximadamente 34 kDa como se observó mediante SDS-PAGE. Esta banda de proteína se escindió y se sometió al análisis de la secuencia del extremo N. La secuencia obtenida, DSFSANQEIRY, se utilizó para investigar la base de datos Streptococcal Genome Sequencing Project (SGSP). Se encontró una correspondencia perfecta en un marco de lectura abierto de 339 aminoácidos denominado SPy0861. La secuencia del extremo N obtenida corresponde a los aminoácidos 30-40 (Figura 2) y estaba precedida por una secuencia de señalización potencial de 29 aminoácidos como se había previsto mediante el algoritmo SignalP. La proteína no contiene una señal de unión a la pared celular (LPXTGX), una característica común de las proteínas ancladas a la pared celular de *S. pyogenes*, y el tamaño previsto de la proteína sin la secuencia de señalización potencial, es de 34,9 kDa, que concuerda con el tamaño de la proteína purificada estimado mediante SDS-PAGE. Además de la presunta secuencia de señalización, la proteína tiene un motivo RGD en los aminoácidos 214-216 (Figura 2). Este motivo es importante para el reconocimiento del ligando por las integrinas, y se ha demostrado que una variedad de patógenos bacterianos y víricos se unen a las integrinas de la célula hospedadora. La presunta secuencia de proteína de longitud compuesta se usó en una búsqueda de similitud contra la base de datos DDBJ/EMBL/GenBank usando un algoritmo BLASTp. Esta búsqueda no reveló similitudes con ninguna proteína procarionta y una pequeña similitud (24 % de identidad en una región de 204 restos aminoácidos) con el precursor M de la integrina alfa de MAC-1 humana (Arnaout *et al.*, 1988). Debido a la ausencia de cualquier función notificada anteriormente, y basándose en la actividad enzimática frente a la IgG humana, la proteína se denotó IdeS, para la enzima degradadora de la inmunoglobulina de *Streptococcus pyogenes* (por sus siglas en inglés).

Para confirmar adicionalmente que la proteína IdeS identificada tiene actividad de escisión de IgG, el gen *ideS* se clonó en el plásmido pGEX-5X-3 (Amersham Pharmacia Biotech) y se expresó en *Escherichia coli*. Los lisados parcialmente purificados se incubaron con IgG y se analizaron mediante SDS-PAGE. Los lisados procedentes de *E. coli* que transportaban el gen *ideS* generaron la banda derivada de IgG de 31 kDa, mientras que los extractos de las células que transportan solo un plásmido control no escinden IgG (no se muestran los datos).

IdeS es una novedosa cisteína proteinasa muy específica de IgG

Los inventores observaron que la secuencia de la proteína IdeS contenía un único resto cisteína en la posición 94 (Figura 2). A pesar de la ausencia de homología de la secuencia con otras cisteína proteinasas, IdeS tiene también un resto histidina a una distancia (His 224) de la cisteína que se encuentra a menudo en otras cisteína proteinasas, aunque la actividad enzimática no se inhibió con el inhibidor E64 de la cisteína proteinasa. El derivado peptídico Z-LVG-CHN₂, estructuralmente basado en el sitio reactivo inhibidor de la cistatina C y que transportaba un grupo diazometil cetona para inactivar el grupo sulfhidrilo de la cisteína catalítica, había mostrado anteriormente inhibir de forma irreversible la papaína y SpeB. Además, las cisteína proteinasas se inactivaron también con ácido yodoacético mediante una modificación irreversible del grupo sulfhidrilo catalítico. Los inventores investigaron, por tanto, si el tratamiento con estos inhibidores específicos afectaría la actividad enzimática de IdeS. El análisis de la IgG incubada solo con IdeS o con IdeS preincubada con inhibidores reveló que Z-LVG-CHN₂ y el ácido yodoacético inhibieron eficazmente la actividad de IdeS mientras que E64 no tuvo efecto sobre la enzima (no se muestran los datos). La actividad de IdeS, sus características de secuencia, y el perfil de inhibición, establecen IdeS como un nuevo miembro de la familia de la cisteína proteinasa.

Recientemente la cisteína proteinasa estreptocócica SpeB ha mostrado escindir las cadenas pesadas de todas las clases de inmunoglobulinas humanas; IgG, IgM, IgA, IgD, e IgE. Por el contrario, cuando la IgG, IgM, IgA, IgD, o IgE humanas se incubaron con IdeS purificada durante 2 h a 37 °C, solamente se degradó la IgG (no se muestran los datos). Los inventores analizaron también la actividad de IdeS frente a las diferentes subclases de IgG, y encontraron que todas eran susceptibles a la digestión con IdeS aunque, cuando se compararon con las otras subclases, IgG2 se digirió de forma menos eficaz (no se muestra). La elevada especificidad de IdeS se resalta adicionalmente por la observación de que solamente la banda derivada de IgG de 31 kDa y no los productos adicionales de la degradación se podían identificar tras la incubación de plasma humano con IdeS purificada. Aunque no se puede excluir que la enzima tenga otros sustratos, estos datos muestran que IdeS tiene un mayor grado de especificidad por IgG que cualquier proteinasa descrita anteriormente.

Distribución y expresión del gen *ideS* en cepas de *S. pyogenes*

Se investigó la distribución de *ideS* entre cepas de *S. pyogenes* mediante el análisis de la PCR usando cebadores diseñados para amplificar la región interna de codificación de *ideS*. Los inventores analizaron las preparaciones de ADN cromosómico 11 cepas de *S. pyogenes* de 9 serotipos M diferentes, y pudieron amplificar fragmentos de la PCR de tamaño idéntico al esperado para todas las cepas (Tabla I, no se muestran los datos). Sin embargo, cuando se analiza la escisión de IgG durante el crecimiento bacteriano en medio TH, solo cinco de las cepas sometidas a ensayo expresaron la actividad degradadora de IgG (AP1, KTL3, SF370, AP12, y AP55), y entre estas cepas KTL3 y SF370 mostraron una actividad débil. De esta manera, aunque el gen *ideS* parece estar presente en todos los aislados de *S. pyogenes*, la actividad enzimática expresada en las condiciones utilizadas aquí se restringe a algunas cepas y varía incluso en el mismo serotipo M (Tabla I). Los inventores investigaron también el modelo de secreción de la actividad de escisión de IgG durante el crecimiento de la cepa AP1 en el medio TH. Se tomaron muestras del medio de crecimiento en diferentes puntos temporales durante el crecimiento bacteriano, y se sometieron a ensayo para determinar la actividad enzimática frente a IgG. La actividad degradadora de IgG comenzó a aparecer en

muestras tomadas durante la fase temprana de crecimiento logarítmico, y la actividad aumentó durante el crecimiento logarítmico según se determinó a partir del grado de escisión de IgG. La actividad enzimática no aumentó adicionalmente en los sobrenadantes en fase estacionaria, pero parece ser persistente a un nivel constante (Figura 3).

5

La fagocitosis mediada por Fc y la muerte de *S. pyogenes* se inhibió mediante IdeS

La opsonización de los anticuerpos de IgG unidos a los antígenos superficiales de *S. pyogenes* expondrá sus regiones Fc a los receptores C1q y Fcγ del factor del complemento de células fagocíticas, y facilitará por tanto la fagocitosis y la muerte de las bacterias. Para someter a ensayo la hipótesis de que IdeS, mediante la escisión proteolítica de IgG, interferiría con estos mecanismos de defensa, se incubaron bacterias AP1 con plasma humano tanto inmune como no inmune. Tras la incubación, las bacterias se lavaron y se incubaron con IdeS, o con un tampón control, seguido por otra etapa de lavado para eliminar IdeS y los productos de degradación. A continuación se infectaron células RAW264.7 confluentes análogas a macrófagos con estas bacterias a ~0,1-1 bacterias/célula. Las infecciones se sincronizaron mediante centrifugación suave y las células se lisaron inmediatamente para determinar el número de ufc a tiempo cero. En infecciones paralelas, los cultivos de células se lavaron cuidadosamente para eliminar bacterias no adherentes y se continuaron las incubaciones durante 1 h, tras lo cual las células se lisaron y se determinó el número de ufc. Se determinaron las relaciones de las ufc a tiempo 1 h divididas por el número de ufc a tiempo cero como factores de supervivencia y se muestran en la Figura 3. Se seleccionó un tiempo de incubación relativamente corto para minimizar la fagocitosis independiente de IgG. Aunque las bacterias incubadas en plasma no inmune sobrevivieron al contacto con células análogas a macrófagos, el número de bacterias que se había expuesto a las inmunoglobulinas opsonizantes en plasma inmune quedó significativamente reducido ($p < 0,03$) en presencia de macrófagos. Sin embargo, este efecto desapareció cuando las bacterias que transportaban la IgG opsonizante se trataron con IdeS antes de la incubación con fagocitos (Figura 3).

25

Las bacterias AP1 expresan las proteínas superficiales que se unen a varias proteínas plasmáticas humanas abundantes. Como se ha notificado anteriormente, tras las absorciones de plasma, las bandas de proteínas principales eluidas de bacterias AP1 representan albúmina, fibrinógeno, y las cadenas pesada y ligera de IgG. Se obtuvo el mismo modelo de proteína tras la absorción de plasma no inmune o inmune, y en ambos casos IgG se escindió mediante IdeS, generando fragmentos de IgGFc que, en las condiciones reductoras utilizadas, originan la banda de 31 kDa (no se muestran los datos). Estos fragmentos de Fc se asocian a las proteínas de unión a IgGFc, interacciones que bloquean eficazmente su capacidad de unirse al factor de complementación C1q. Sin embargo, como se muestra en la Figura 3, IdeS protege las bacterias preincubadas con plasma que contiene anticuerpos específicos de IgG. Estos anticuerpos se unen a la superficie estreptocócica mediante sus regiones Fab de unión a antígeno, sugiriendo que la escisión de esta población de IgG mediante IdeS dará como resultado la eliminación de fragmentos Fc de la superficie bacteriana. Estos datos demuestran que la escisión de IgG mediante IdeS puede producirse en la superficie bacteriana y que la escisión de IgG mediante IdeS aumenta la capacidad de *S. pyogenes* para sortear las células fagocíticas.

30

La cisteína proteinasa estreptocócica SpeB está bien establecida como un determinante de la virulencia, y SpeB ha mostrado recientemente escindir la región bisagra de IgG y degradar las cadenas pesadas de todas las clases de inmunoglobulinas humanas. Por tanto, el descubrimiento de una cisteína proteinasa extracelular adicional en *S. pyogenes* fue inesperado. Sin embargo, al menos en condiciones de laboratorio, SpeB no se expresa hasta que *S. pyogenes* alcanza la fase de crecimiento estacionario, lo que cuestiona la posible función de SpeB como una enzima que escinde la IgG opsonizante. De esta manera, debe ser importante que dicha proteinasa esté presente continuamente durante la infección. La producción de IdeS comienza prácticamente durante el crecimiento logarítmico temprano y continúa en la fase de crecimiento estacionario tardío, lo que convierte a la enzima en más adecuada para eliminar la IgG opsonizante de la superficie bacteriana. Sin embargo, las acciones de IdeS y SpeB serían complementarias. De hecho, la identificación y caracterización de IdeS puede explicar algunas observaciones previas y misteriosas. IdeS no se ve afectada por el inhibidor de la cisteína proteasa E64, pero se inhibe con un derivado peptídico sintético (Z-LVG-CHN₂) estructuralmente basado en el centro de unión a la proteinasa de la cistatina C, un inhibidor de la cisteína proteinasa humana. Z-LVG-CHN₂ y E64 bloquean irreversiblemente la actividad proteolítica de SpeB, pero solo Z-LVG-CHN₂ inhibió el crecimiento estreptocócico *in vitro* e *in vivo*. Sin embargo, la observación de que IdeS queda inhibida con Z-LVG-CHN₂, pero no con E64, sugiere que el efecto anteriormente observado de Z-LVG-CHN₂ sobre el crecimiento y la virulencia de *S. pyogenes* serían debidos a la interferencia tanto con SpeB como con IdeS.

40

En infecciones invasivas graves por *S. pyogenes*, las cepas del serotipo M1 son las más comunes, y la cepa AP1 estudiada aquí y que expresa IdeS, es de este serotipo. Las cepas de los serotipos M12 y M55, que producen también IdeS proteolíticamente activa en las condiciones de crecimiento utilizadas, están estrechamente relacionadas filogenéticamente, y representan las cepas clínicamente relevantes frecuentemente relacionadas con la glomerulonefritis post-estreptocócica. Esta correlación sugiere un papel de IdeS durante las infecciones agudas y en secuelas asépticas tras las infecciones agudas por *S. pyogenes*.

50

65

IgG es la clase de Ig dominante e IgGFc tiene importantes funciones en la activación del complemento y el reclutamiento de células fagocíticas. Además, los receptores Fc γ se expresan en todas las células inmunológicamente activas. Parece que *S. pyogenes* ha evolucionado una enzima de escisión específica de IgG, y su especificidad subraya un papel potencial de IdeS en la prevención del contacto entre *S. pyogenes* y los fagocitos, escindiendo el IgG opsonizante de IgG en la región bisagra. Los anticuerpos de IgG opsonizante se unen a diversas estructuras superficiales de *S. pyogenes* mediante las regiones Fab. Sin embargo, la mayoría de cepas de *S. pyogenes* expresa proteínas superficiales de la familia de proteínas M con afinidad por IgGFc. La cepa AP1 estudiada aquí tiene dos de las mencionadas proteínas, las proteínas H y M1, que están estrechamente relacionadas estructuralmente. Grandes cantidades de estas proteínas de unión a IgGFc están presentes en la superficie bacteriana, y se unen a IgG con elevada afinidad. Como resultado, las bacterias AP1 rodeadas por plasma o exudado inflamatorio están cubiertas con IgG unida a estas proteínas mediante las proteínas de unión a IgGFc. Esta población de IgG estará presente en grandes cantidades en comparación con la IgG específica de antígeno unida a la superficie bacteriana mediante Fab. Sin embargo, los datos aquí notificados demuestran que IdeS no solo escinde los anticuerpos opsonizantes, sino también la IgG unida a la superficie mediante Fc.

Resultados de estudios adicionales

1) Especificidad por el sustrato

IdeS presenta elevada especificidad por el sustrato y se ha encontrado hasta el momento que solamente escinde IgG. Los inventores han examinado si IdeS podría tener sustratos adicionales, por ejemplo, proteínas plasmáticas eucariotas. Se ha llevado a cabo una extensa búsqueda de sustratos adicionales y de inhibidores de origen natural.

i) Restricciones de especies

Se ha encontrado que IdeS escinde la IgG humana, de conejo y de cabra, pero no la IgG de murino, aunque las secuencias de aminoácidos primarios en el sitio de escisión se conservan entre las especies.

ii) Escisión u otras proteínas humanas

No se pudieron detectar productos de escisión cuando se incubó IdeS con plasma humano completo o con fibrinógeno, fibronectina, albúmina, transferrina, lactoferrina, laminina, H-kininógeno, α 1-antitripsina, aprotinina, cistatina D o cistatina C.

No se pudieron observar productos de escisión cuando cistatina C procedente bien de pollo, rata, o de ratón se incubó con IdeS.

iii) Actividad hacia péptidos naturales y sintéticos

La incubación de IdeS con el péptido antimicrobiano LL-37 o un péptido sintético homólogo a los aminoácidos 234 a 241 de la IgG humana no revela ninguna degradación de los péptidos. Ninguno de ellos era el péptido sintético Z-LVG-CHN₂, que inhibe la actividad de IdeS, escindida por IdeS en exceso.

De esta manera, hasta la fecha, el único sustrato conocido de IdeS es la IgG. Sin embargo, los inventores han descubierto que un fragmento Fc generado por la escisión con papaína, que incluye 12 aminoácidos de la región bisagra, se escindió mediante IdeS, lo que sugiere que el sitio de reconocimiento de IdeS en la IgG humana está localizado en la región Cy2 de la molécula. La región de la interfase Cy2-Cy3 de IgG se ha descartado como sitio de unión de IdeS, ya que las proteínas estreptocócicas H y G, que se unen ambas en esta región, no pueden inhibir la actividad de IdeS.

2) Anticuerpos neutralizantes contra la actividad enzimática de IdeS

Se llevó a cabo un extenso análisis de los títulos de anticuerpo contra IdeS en 80 donantes de sangre sanos y 70 pacientes que padecían de infecciones invasivas por *S. pyogenes*.

Todos los donantes de sangre mostraron niveles de anticuerpos detectables frente a IdeS, resaltando que IdeS se expresó *in vivo* durante las infecciones estreptocócicas. Los pacientes con infecciones invasivas de *S. pyogenes* mostraron niveles de anticuerpos en fase aguda significativamente mayores frente a IdeS (el índice promedio de ELISA aumenta desde 0,64 en donantes sanos a 1,24 en los sueros de los pacientes; $p < 0,05$). Algunas muestras de suero de pacientes que se recuperaron de infecciones estreptocócicas (faringitis y septicemia) mostraron títulos de anticuerpos aumentados frente a IdeS en comparación con los títulos en fase aguda. Los anticuerpos en la mayoría de los sueros de convalecientes analizados, pero no en todos, tenían la capacidad de bloquear la actividad enzimática de IdeS. Este hallazgo es una indicación muy fuerte de la importancia de la actividad enzimática *in vivo*.

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> HANSA MEDICAL AB
- 5 <120> PROTEÍNA
- <130> N84279 SER
- <160> 10
- 10 <170> PatentIn versión 3.0
- <210> 1
- <211> 310
- 15 <212> PRT
- <213> *S. pyogenes*
- <400> 1

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

20

ES 2 559 274 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Trp Asn Gln Thr Asn
 305 310

5 <210> 2
 <211> 339
 <212> PRT
 <213> *S. pyogenes*
 <400> 2

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

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

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

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

10

ES 2 559 274 T3

Gly Glu Asp Val Phe His Ala Pro Tyr Val Ala Asn Gln Gly Trp Tyr
 65 70 75 80
 Asp Ile Thr Lys Thr Phe Asn Gly Lys Asp Asp Leu Leu Cys Gly Ala
 85 90 95
 Ala Thr Ala Gly Asn Met Leu His Trp Trp Phe Asp Gln Asn Lys Asp
 100 105 110
 Gln Ile Lys Arg Tyr Leu Glu Glu His Pro Glu Lys Gln Lys Ile Asn
 115 120 125
 Phe Asn Gly Glu Gln Met Phe Asp Val Lys Glu Ala Ile Asp Thr Lys
 130 135 140
 Asn His Gln Leu Asp Ser Lys Leu Phe Glu Tyr Phe Lys Glu Lys Ala
 145 150 155 160
 Phe Pro Tyr Leu Ser Thr Lys His Leu Gly Val Phe Pro Asp His Val
 165 170 175
 Ile Asp Met Phe Ile Asn Gly Tyr Arg Leu Ser Leu Thr Asn His Gly
 180 185 190
 Pro Thr Pro Val Lys Glu Gly Ser Lys Asp Pro Arg Gly Gly Ile Phe
 195 200 205
 Asp Ala Val Phe Thr Arg Gly Asp Gln Ser Lys Leu Leu Thr Ser Arg
 210 215 220
 His Asp Phe Lys Glu Lys Asn Leu Lys Glu Ile Ser Asp Leu Ile Lys
 225 230 235 240
 Lys Glu Leu Thr Glu Gly Lys Ala Leu Gly Leu Ser His Thr Tyr Ala
 245 250 255
 Asn Val Arg Ile Asn His Val Ile Asn Leu Trp Gly Ala Asp Phe Asp
 260 265 270
 Ser Asn Gly Asn Leu Lys Ala Ile Tyr Val Thr Asp Ser Asp Ser Asn
 275 280 285
 Ala Ser Ile Gly Met Lys Lys Tyr Phe Val Gly Val Asn Ser Ala Gly
 290 295 300
 Lys Val Ala Ile Ser Ala Lys Glu Ile Lys Glu Asp Asn Ile Gly Ala
 305 310 315 320
 Gln Val Leu Gly Leu Phe Thr Leu Ser Thr Gly Gln Asp Ser Trp Asn

325

330

335

Gln Thr Asn

5 <210> 3
 <211> 1020
 <212> ADN
 <213> *S. pyogenes*
 <400> 3

atgagaaaa	gatgctattc	aacttcagct	gcagtattgg	cagcagtgac	tttatttggt	60
ctatcggtag	atcgtgggtg	tatagcagat	agtttttctg	ctaatcaaga	gattagatat	120
tcggaagtaa	caccttatca	cgttacttcc	gtttgacca	aaggagttac	tcctccagca	180
aacttcactc	aaggtgaaga	tgtttttcac	gctccttatg	ttgctaacca	aggatggtat	240
gatattacca	aaacattcaa	tggaaaagac	gatcttcttt	gcggggctgc	cacagcaggg	300
aatatgcttc	actggtgggt	cgatcaaaaac	aaagaccaa	ttaaactgta	tttgaagag	360
catccagaaa	agcaaaaaat	aaacttcaat	ggcgaacaga	tgtttgacgt	aaaagaagct	420
atcgacacta	aaaaccacca	gctagatagt	aaattatttg	aatattttaa	agaaaaagct	480
ttcccttate	tatctactaa	acacctagga	gttttcctg	atcatgtaat	tgatagttc	540
attaacggct	accgccttag	tctaactaac	cacggtccaa	cgccagtaaa	agaaggtagt	600
aaagatcccc	gaggtgggtat	ttttgacgcc	gtatttacia	gaggtgatca	aagtaagcta	660
ttgacaagtc	gtcatgattt	taaagaaaa	aatctcaaag	aatcagtgta	tctcattaag	720
aaagagttaa	ccgaaggcaa	ggctctaggc	ctatcacaca	cctacgctaa	cgtacgcctc	780
aaccatgtta	taaacctgtg	gggagctgac	tttgattcta	acgggaacct	taaagctatt	840
tatgtaacag	actctgatag	taatgcatct	attggatga	agaataactt	tgttgggtgt	900
aattccgctg	gaaaagtagc	tatttctgct	aaagaaataa	aagaagataa	tattggtgct	960
caagtactag	ggttatttac	actttcaaca	gggcaagata	gttggaatca	gaccaattaa	1020

10
 <210> 4
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<400> 4
 cgttacttcc gtttggatcc aagg 24

20
 <210> 5
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

25
 <400> 5
 gaaatagcta ctctcgagc ggaatt 26

30
 <210> 6
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

35
 <400> 6
 tcggtagatc gtgggatcct agcagatagt 30

<210> 7
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

40
 <400> 7

ES 2 559 274 T3

cggaattctt aattggtctg attccaac 28

<210> 8

<211> 8

5 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 8

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
1 5

10

<210> 9

<211> 11

15 <212> PRT

<213> *S. pyogenes*

<400> 9

Asp Ser Phe Ser Ala Asn Gln Glu Ile Arg Tyr
1 5 10

20

<210> 10

<211> 6

25 <212> PRT

<213> Bacteria

<220>

<221> Xaa

<222> (1)..(6)

30 <223> CUALQUIER AMINOÁCIDO

<400> 10

Leu Pro Xaa Thr Gly Xaa
1 5

35

REIVINDICACIONES

1. Un método para identificar una sustancia que activa o inhibe la actividad cisteína proteasa de IgG de un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 1 que comprende:

- 5 (i) poner en contacto un polipéptido que consiste en:
- (a) la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 1;
 - (b) una de sus variantes que tiene al menos un 80 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 1 y que tiene la actividad cisteína proteasa de IgG; o
 - (c) un fragmento peptídico más corto de (a) que tiene la actividad cisteína proteasa de IgG

e IgG con una sustancia en condiciones que permitirían la actividad cisteína proteasa de IgG en ausencia de la sustancia; y

- 15 (ii) determinar por tanto si la sustancia activa o inhibe dicha actividad,

donde dicha sustancia es una biblioteca combinatoria, una molécula orgánica, un péptido, un péptido mimético, una biblioteca de expresión de fagos o un anticuerpo.

20 2. Un método de acuerdo con la reivindicación 1 donde el método es para identificar una sustancia que inhibe la actividad cisteína proteasa de IgG del polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 1.

3. Un método de acuerdo con la reivindicación 2 que comprende además formular una sustancia identificada de esta manera con un transportador farmacéuticamente aceptable.

25 4. Un método para generar fragmentos Fc o Fab de IgG que comprende poner en contacto la IgG con un polipéptido que consiste en:

- 30 (a) la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 1;
- (b) una de sus variantes que tiene al menos un 80 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 1 y que tiene la actividad cisteína proteasa de IgG; o
 - (c) un fragmento peptídico más corto que (a) que tiene la actividad cisteína proteasa de IgG.

35 5. Un método para detectar la IgG en una muestra, que comprende:

- (i) poner en contacto la muestra con un polipéptido que consiste en:
- (a) la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 1;
 - (b) una de sus variantes que tiene al menos un 80 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 1 y que tiene la actividad cisteína proteasa de IgG; o
 - (c) un fragmento peptídico más corto que (a) que tiene la actividad cisteína proteasa de IgG,

40 en condiciones que permitan la actividad cisteína proteasa específica de la IgG del polipéptido; y

(iii) vigilar la presencia de fragmentos de escisión específicos de IgG;

45 donde la presencia de fragmentos de escisión específicos es indicadora de la presencia de IgG en la muestra.

6. Un método de acuerdo con la reivindicación 4 o 5 donde la IgG es IgG humana.



FIGURA 1

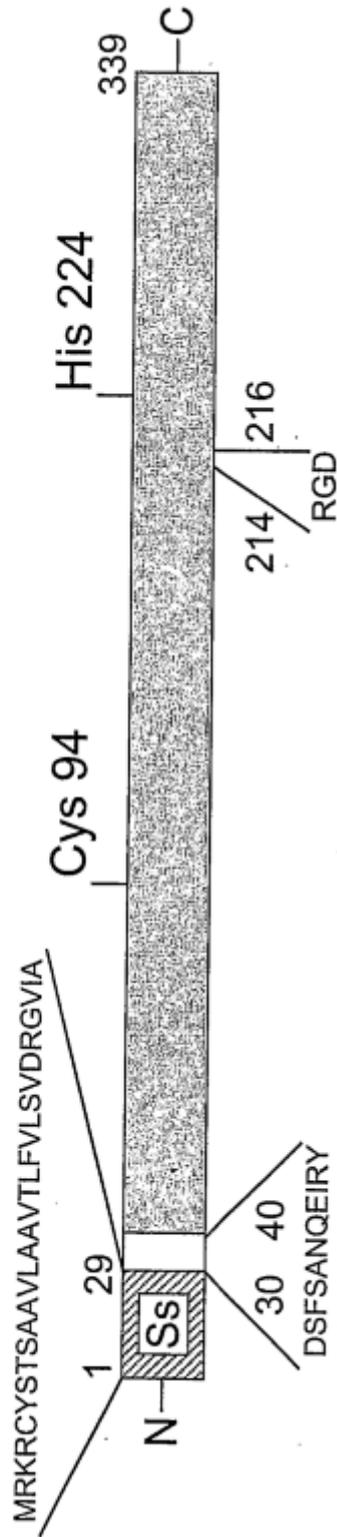


FIGURA 2

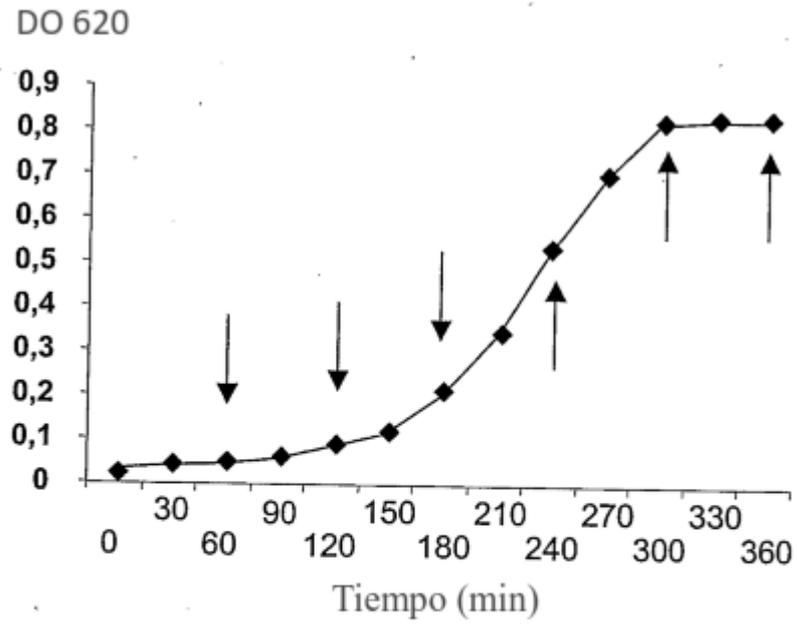


FIGURA 3

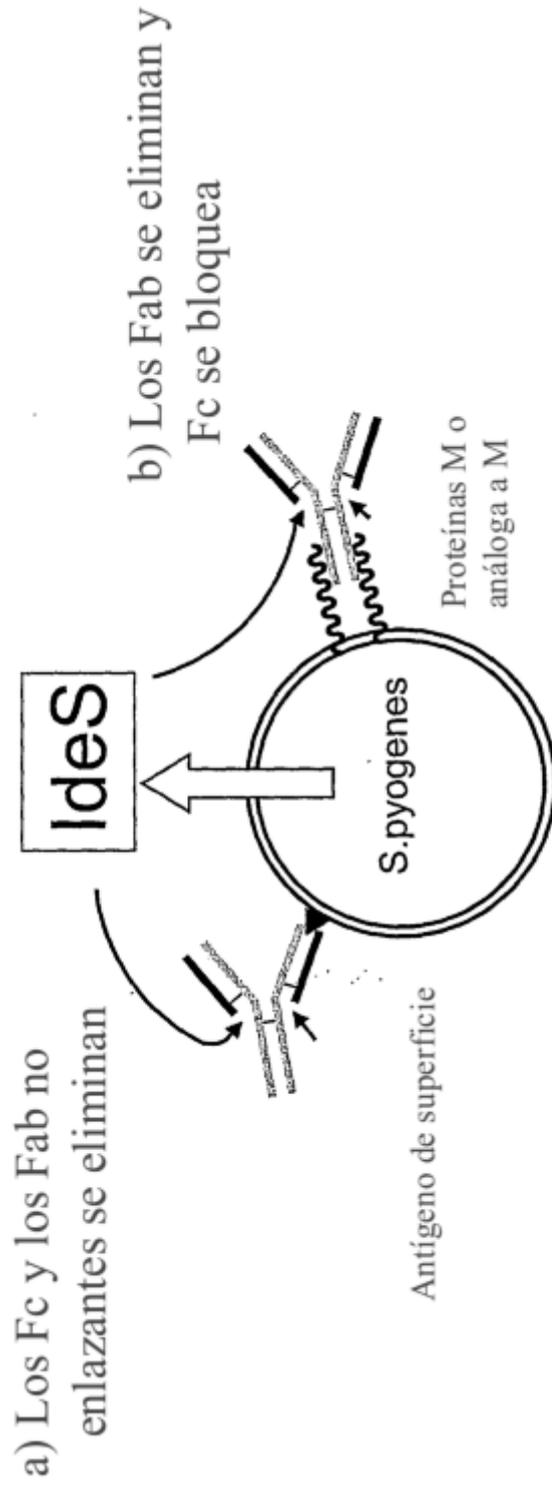


FIGURA 4