

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 627 334**

51 Int. Cl.:

C12N 9/24 (2006.01)

A61K 38/47 (2006.01)

C07K 14/315 (2006.01)

G01N 33/573 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.09.2012 PCT/EP2012/067841**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.03.2013 WO13037824**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.09.2012 E 12756523 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.03.2017 EP 2756077**

54 Título: **Endoglucosidasa de streptococcus pyogenes y métodos para usarla**

30 Prioridad:

13.09.2011 GB 201115841

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

27.07.2017

73 Titular/es:

GENOVIS AB (100.0%)

P.O. Box 790

220 07 Lund, SE

72 Inventor/es:

COLLIN, MATTIAS;

ALLHORN, MARIA y

SJÖGREN, JONATHAN

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 627 334 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

Endoglucosidasa de *Streptococcus pyogenes* y métodos para usarla

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a métodos para hidrolizar el glucano de las glucoproteínas.

10 **Antecedentes de la invención**

10 La endoglucosidasa S (EndoS) se secreta por una serie de serotipos de *Streptococcus pyogenes* y tiene una actividad endoglucosidasa específica en las IgG nativas hidrolizando los glucanos conservados unidos al resto de asparagina 297 en las cadenas pesadas de IgG, Collin y Olsen, The EMBO Journal, 2001,20 3046-3055. El documento WO2009/033670 divulga que EndoS puede actuar sobre una IgG que ya está unida a FcγR y describe 15 métodos para usar EndoS para disociar complejos FcγR-IgG. El documento WO2009/033670 también divulga formas modificadas de EndoS que carecen de actividad endoglucosidasa y el uso de dichas formas modificadas como reactivos de unión a IgG. El documento WO2008/071418 divulga el uso de EndoS para tratar o prevenir enfermedades mediadas por anticuerpos IgG. EndoS es la primera enzima bacteriana conocida con una especificidad única por las IgG nativas. Por el contrario, las actividades de otras endoglucosidasas conocidas 20 requieren o están potenciadas por la desnaturalización del sustrato de glucoproteína.

Los anticuerpos, tales como las IgG, tienen muchas aplicaciones en investigación básica así como en diagnósticos y el desarrollo de fármacos. En algunas de estas aplicaciones, tales como la inmunohistoquímica, los inmunoensayos, la detección de tumores, la radioterapia, los estudios cristalográficos de sitios de unión de anticuerpo y el 25 inmunodireccionamiento, es más conveniente el uso de fragmentos Fab que de moléculas de IgG completas. Algunas de las ventajas de usar fragmentos Fab son que no se verán afectados por receptores de Fc sobre células o antígeno precipitado, muestran una inmunogenicidad reducida y son menos susceptibles a la fagocitosis y que los fragmentos Fab radiomarcados se eliminan más rápidamente de los tejidos que las moléculas IgG completas. Para otras aplicaciones, es deseable usar fragmentos Fc de IgG. En aplicaciones adicionales, puede ser deseable usar 30 versiones desglucosiladas de los anticuerpos u otras glucoproteínas.

La escisión de una IgG en fragmentos Fab y Fc se lleva a cabo normalmente usando enzimas proteolíticas, tales como pepsina o papaína. A menudo, estas enzimas escinden otras proteínas, de tal forma que la reacción de escisión tiene que llevarse a cabo en una fracción IgG purificada. Además, la pepsina y la papaína escinden a la IgG 35 normalmente en más de un sitio. Esto significa que los fragmentos obtenidos a menudo no se corresponden con fragmentos Fab o Fc e incluso en caso de que la escisión origine fragmentos Fab y Fc, estos son típicamente susceptibles a una escisión adicional en fragmentos más pequeños. El aislamiento de fragmentos Fc a partir de fragmentos Fab se lleva a cabo con mayor frecuencia usando columnas de separación por afinidad de proteína A o G, que utilizan las propiedades de unión a Fc de las proteínas A y G bacterianas.

40 En aplicaciones terapéuticas, son útiles muchas glucoproteínas diferentes. Los métodos para analizar la glucosilación de dichas proteínas tienen utilidad en la investigación y el desarrollo de las proteínas como agentes terapéuticos. También puede ser deseable proporcionar versiones desglucosiladas de estas proteínas.

45 **Sumario de la invención**

Los inventores han identificado una nueva endoglucosidasa del serotipo M49 de *Streptococcus pyogenes*, citada en el presente documento como EndoS49. EndoS49 se aisló de la cepa NZ131, una cepa nefritogénica y altamente transformable del serotipo M49. La cepa NZ131 es un aislado clínico de un caso de glomerulonefritis post-estreptocócica aguda en Nueva Zelanda. A nivel proteico, EndoS49 tiene menos de un 40% de identidad con EndoS 50 y es una proteína de 90 kDa, en comparación con los 108 kDa de EndoS. EndoS49 tiene actividad de desglucosilación frente a una variedad más amplia de proteínas que EndoS.

La enzima es una enzima de 90 kDa, que tiene un dominio catalítico de la familia 18 de glucósido hidrolasa. EndoS49 hidroliza al glucano en glucoproteínas humanas y en particular, a IgG1-4 y alfa-1-microglobulina. EndoS49 55 puede usarse en la hidrólisis de glucanos en glucoproteínas humanas, incluyendo IgG y alfa-1-microglobulina. Por lo tanto, EndoS49 puede usarse en el análisis de perfil de glucanos en los que se pone en contacto la enzima con una glucoproteína y se separan los productos producidos para el análisis de los glucanos y la proteína. También puede usarse EndoS49 para preparar proteínas desglucosiladas. Puede modificarse la enzima para reducir o eliminar la 60 actividad de endoglucosidasa.

La presente invención proporciona un método para desglucosilar completamente un anticuerpo IgG que comprende incubar el anticuerpo con un polipéptido que comprende

- 65 (a) la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1;
(b) una variante de la misma que tiene al menos un 95% de identidad respecto de la secuencia de aminoácidos

de SEQ ID NO: 1 a lo largo de al menos 810 aminoácidos contiguos de la SEQ ID NO: 1 y que tiene la actividad endoglucosidasa de un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1.

Breve descripción de las figuras

- 5 **Figura 1.** El alineamiento por ClustalW de EndoS49 y EndoS revela dos proteínas diferentes. Se alinearon EndoS49 y EndoS usando ClustalW en el programa informático MacVector. El motivo catalítico GH18 (D**D*D*E) está presente en la posición 179-186, siendo Glu186 en resto catalítico.
- 10 **Figura 2.** EndoS49 tiene actividad sobre glucoproteínas. A. Se incubó 1 µg de EndoS49, su mutante catalítico y las versiones truncadas con 3 µg de IgG humana en PBS durante una noche a 37°C y se analizaron en un gel SDS-PAGE y con transferencia de LCAlectina. B. Se incubó 1 µg de EndoS49 y EndoS49(E186L) con 3 µg de las subclases 1-4 de IgG humana y se analizó como en el caso anterior. C. Se incubó 1 µg EndoS49 y sus mutantes con 3 µg de alfa-1-microglobulina y se analizó en un gel de SDS-PAGE al 10 %.
- 15 **Figura 3.** EndoS49 se une a IgG. Se inmovilizaron 4, 2 y 1 µg de EndoS49 y sus mutantes en una membrana de PVDF y se incubaron con IgG humana y después con proteína G acoplada a HRP.
- Figura 4.** El contexto genómico de *ndoS49* y *ndoS*. Se llevó a cabo una comparación de los genes que rodean a *ndoS49* y *ndoS* en GAS de las cepas NZ131 (M49) y 5005 (M1) en MacVector.
- Figura 5.** Análisis filogenético de EndoS49 y otras endoglucosidasas bacterianas.
- 20 **Figura 6.** Gel de SDS-Page de Avastin y Erbitux después de su digestión con EndoS o EndoS49 seguido de digestión con IdeS.

Breve descripción de las secuencias

- 25 La SEQ ID NO: 1 es una secuencia de aminoácidos de un polipéptido de EndoS49 aislado de *S. pyogenes* M49 serotipo NZ131.
- La SEQ ID NO: 2 es una secuencia de aminoácidos de un polipéptido modificado de EndoS49 (E186L) obtenido a partir de la secuencia de la SEQ ID NO: 1.
- La SEQ ID NO: 3 es una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido de EndoS49
- 30 La SEQ ID NO: 4 es una secuencia de aminoácidos de IdeS aislado de *S. pyogenes* AP1.

Descripción detallada de la invención

Características generales de polipéptidos

- 35 Los términos proteína, péptido y polipéptido se usan de manera intercambiable en el presente documento. La sección siguiente se refiere a características generales de todos los polipéptidos divulgados en el presente documento y en particular, a variaciones, alteraciones, modificaciones o derivatizaciones de secuencias de aminoácidos que se incluyen en dichos polipéptidos. Se entenderá que dichas variaciones, alteraciones, modificaciones o derivatizaciones de los polipéptidos como se describen en el presente documento están sometidas
- 40 al requisito de que los polipéptidos mantengan cualquier actividad o característica necesaria adicional que pueda especificarse en secciones posteriores de la presente divulgación.

- Las variantes de polipéptidos pueden definirse mediante niveles particulares de identidad de aminoácidos que se describen con más detalle en secciones posteriores de la presente divulgación. La identidad de aminoácidos puede
- 45 calcularse usando cualquier algoritmo adecuado. Por ejemplo, pueden usarse los algoritmos PILEUP y BLAST para calcular la homología o alinear secuencias (tal como identificar secuencias equivalentes o correspondientes) (típicamente con sus parámetros por defecto), por ejemplo, tal como se describe en Altschul S. F. (1993) J Mol Evol 36:290-300; Altschul, S, F et al (1990) J Mol Biol 215:403-10. El programa informático para llevar a cabo análisis BLAST está disponible de manera pública a través del National Center for Biotechnology Information
- 50 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Este algoritmo implica identificar en primer lugar pares de secuencia de alta puntuación (HSP) identificando palabras cortas de una longitud W en la secuencia de búsqueda que coinciden o cumplen cierta puntuación umbral T de valor positivo cuando se alinean con una palabra de la misma longitud en una secuencia de la base de datos. T se cita como el umbral de puntuación de palabras vecinas (Altschul *et al*, anteriormente citado). Estas coincidencias de palabras vecinas iniciales actúan como semillas para iniciar
- 55 búsquedas para encontrar HSP que las contienen. Las coincidencias de palabra se extienden en ambas direcciones a lo largo de cada secuencia tanto como pueda aumentarse la puntuación de alineamiento acumulativo. Las extensiones para las coincidencias de palabra en cada dirección se detienen cuando: la puntuación de alineamiento acumulativa desciende en una cantidad X respecto de su máximo valor obtenido; la puntuación acumulativa se reduce hasta cero o menor, debido a la acumulación de uno o más alineamientos de resto con puntuación negativa; o se alcanza el extremo de cualquiera de las dos secuencias. Los parámetros W, T y X del algoritmo BLAST
- 60 determinan la sensibilidad y la velocidad del alineamiento. El programa BLAST usa como valores por defecto una longitud de palabra (W) de 11, la matriz de puntuación BLOSUM62 (véase Henikoff y Henikoff (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 10915-10919) alineamientos (B) de 50, expectativa (E) de 10, M=5, N=4, y una comparación de ambas hebras.

- 65 El algoritmo BLAST también lleva a cabo un análisis estadístico de la similitud entre dos secuencias; véase, por

ejemplo, Karlin y Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 5873-5787. Una medida de similitud proporcionada por el algoritmo BLAST es la probabilidad de suma más pequeña (P(N)), que proporciona una indicación acerca de la probabilidad con la que podría producirse una coincidencia entre dos secuencias de polinucleótidos o aminoácidos por efecto del azar. Por ejemplo, se considera que una secuencia es similar a otra secuencia en caso de que la probabilidad de la suma más pequeña en la comparación de la primera secuencia con la segunda secuencia sea menor de aproximadamente 1, preferentemente menos de aproximadamente 0,1, más preferentemente menos de aproximadamente 0,01 y lo más preferentemente, menos de aproximadamente 0,001. Como alternativa, el paquete UWGCG proporciona el programa BESTFIT, que puede usarse para calcular la homología (por ejemplo, usado con sus parámetros por defecto) (Devereux et al (1984) Nucleic Acids Research 12, 387-395).

Se entenderá que las variantes de los polipéptidos también incluyen variantes de sustitución. Las variantes de sustitución implican generalmente el reemplazo de uno o más aminoácidos por el mismo número de aminoácidos y efectuar sustituciones conservativas de aminoácidos. Por ejemplo, puede sustituirse un aminoácido con un aminoácido alternativo que tenga propiedades similares, por ejemplo, otro aminoácido básico, otro aminoácido ácido, otro aminoácido neutro, otro aminoácido cargado, otro aminoácido hidrófilo, otro aminoácido hidrófobo, otro aminoácido polar, otro aminoácido aromático u otro aminoácido alifático. Algunas propiedades de los 20 aminoácidos principales que pueden usarse para seleccionar sustituyentes adecuados son las siguientes:

Ala	alifático, hidrófobo, neutro	Met	hidrófobo, neutro
Cys	polar, hidrófobo, neutro	Asn	polar, hidrófilas, neutro
Asp	polar, hidrófilas, cargado (-)	Pro	hidrófobo, neutro
Glu	polar, hidrófilas, cargado (-)	Gln	polar, hidrófilas, neutro
Phe	aromático, hidrófobo, neutro	Arg	polar, hidrófilas, cargado (+)
Gly	alifático, neutro	Ser	polar, hidrófilas, neutro
His	aromático, polar, hidrófilas, cargado (+)	Thr	polar, hidrófilas, neutro
Ile	alifático, hidrófobo, neutro	Val	alifático, hidrófobo, neutro
Lys	polar, hidrófilas, cargado (+)	Trp	aromático, hidrófobo, neutro
Leu	alifático, hidrófobo, neutro	Tyr	aromático, polar, hidrófobo

Los polipéptidos divulgados en el presente documento pueden encontrarse en una forma sustancialmente aislada. Se entenderá que el polipéptido puede mezclarse con vehículos o diluyentes que no interferirán con el fin previsto del polipéptido y aún se considerarán sustancialmente aislados. Un polipéptido también puede encontrarse en forma sustancialmente purificada, en cuyo caso comprenderá generalmente el polipéptido en una preparación en la que más de un 50%, por ejemplo, más de un 80%, 90%, 95% o 99%, en peso del polipéptido en la preparación sea un polipéptido de la divulgación.

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

Los polipéptidos también pueden producirse usando D-aminoácidos. En dichos casos, los aminoácidos están enlazados en secuencia inversa en la orientación de C a N. Esto es convencional en la técnica para producir dichos polipéptidos.

Se conocen en la técnica una serie de modificaciones de la cadena lateral y pueden efectuarse en las cadenas laterales de los polipéptidos, a condición de que los polipéptidos mantengan cualquier actividad o característica adicional necesaria que pueda especificarse en el presente documento.

También se entenderá que los polipéptidos pueden estar modificados químicamente, por ejemplo, modificados postraduccionalmente. Por ejemplo, pueden estar glucosilados, fosforilados, o comprender restos de aminoácidos modificados. Pueden modificarse mediante la adición de una secuencia de señal para promover su inserción en la membrana celular.

Los polipéptidos también se pueden derivatizar o modificar para ayudar en su aislamiento o purificación. Por ejemplo, puede derivatizarse o modificarse un polipéptido mediante la adición de un ligando que es capaz de unirse directa y específicamente a un medio de separación. Como alternativa, el polipéptido se derivatiza o modifica mediante la adición de un miembro de un par de unión y el medio de separación comprende un reactivo que se derivatiza o modifica mediante la adición de otro miembro de un par de unión. Puede usarse cualquier par de unión

adecuado. En una realización preferida en donde se derivatiza o modifica el polipéptido mediante la adición de un miembro de un par de unión, el polipéptido está preferentemente marcado con histidina o marcado con biotina. Típicamente, la secuencia codificante de aminoácidos del marcador de histidina o biotina está incluida a nivel génico y las proteínas se expresan de manera recombinante en *E. coli*. La etiqueta de histidina o biotina está presente típicamente en un extremo del polipéptido, ya sea en el extremo N-terminal o el extremo C-terminal. El marcador de histidina consiste típicamente en seis restos de histidina, aunque puede ser de una longitud mayor, típicamente de hasta 7, 8, 9, 10 o 20 aminoácidos o más corto, por ejemplo, 5, 4, 3, 2 o 1 aminoácidos. Además, el marcador de histidina puede contener una o más sustituciones de aminoácidos, preferentemente sustituciones conservativas como se han definido anteriormente.

Polipéptidos de EndoS49 que tienen actividad endoglucosidasa

El polipéptido EndoS49 usado en el método de la invención comprende:

- (a) la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1; o
- (b) una variante de la misma que tiene al menos un 95% de identidad respecto de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:

1 a lo largo de al menos 810 aminoácidos contiguos de la SEQ ID NO: 1 y que tiene la actividad endoglucosidasa de un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1.

Preferentemente, el polipéptido comprende o consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 1. La SEQ ID NO: 1 es la secuencia de EndoS49 de *S. pyogenes*. El polipéptido de EndoS49 de la invención puede comprender adicionalmente o no una secuencia de señal.

Las variantes de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 contienen preferentemente los restos 179 a 186 de la SEQ ID NO: 1 y en particular, incluyen el motivo D**D*D*E. Estos aminoácidos constituyen un dominio catalítico de la familia 18 de glucósido hidrolasa. El ácido glutámico en la posición 186 es esencial para la actividad enzimática. Más preferentemente, por lo tanto, la variante de SEQ ID NO: 1 contiene ácido glutámico en la posición equivalente a la posición 186 de la SEQ ID NO: 1. La variante de SEQ ID NO: 1 puede contener los restos 179 a 186 de la SEQ ID NO: 1 que tiene una o más sustituciones conservativas, siempre que la variante contenga ácido glutámico en la posición equivalente a la posición 186 de la SEQ ID NO: 1.

Típicamente, los polipéptidos que muestran la actividad endoglucosidasa de EndoS49 tienen al menos un 95%, al menos un 97% o al menos un 99% de identidad, respecto de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1. La identidad de las variantes de SEQ ID NO: 1 puede medirse a lo largo de una región de al menos 810, al menos 820, al menos 930, al menos 940 o más aminoácidos contiguos de la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 1 o más preferentemente, a lo largo de la longitud completa de la SEQ ID NO: 1.

Los polipéptidos para su uso en la presente invención pueden aislarse de cualquier organismo adecuado que exprese un polipéptido de EndoS49 o una variante de un polipéptido EndoS49. Típicamente, el polipéptido de EndoS49 se aísla de cepas de *Streptococcus* adecuadas que expresan EndoS49, preferentemente cepas de *S. pyogenes*, y en particular, aquellas del serotipo M49.

El aislamiento y purificación de EndoS49 a partir de un cultivo de *S. pyogenes* expresora o de cultivos de otra células que expresan EndoS49 es típicamente basándose en la actividad endoglucosidasa. Preferentemente, el método de purificación implica una etapa de precipitación en sulfato de amonio y una etapa de cromatografía de intercambio iónico. De acuerdo con un método, se fracciona el medio de cultivo añadiendo cantidades crecientes de sulfato de amonio. Las cantidades de sulfato de amonio pueden ser del 10 al 80%. Preferentemente, se fracciona el medio de cultivo con sulfato de amonio al 50% y se precipita adicionalmente el sobrenadante resultante con sulfato de amonio al 70%. Los polipéptidos pueden someterse después a cromatografía de intercambio iónico, por ejemplo, mediante FPLC o una columna Mono Q. Puede ensayarse la actividad endoglucosidasa de las fracciones eluidas y pueden agruparse las fracciones con actividad máxima. Las fracciones pueden ensayarse por SDS PAGE. Las fracciones pueden almacenarse a -80°C.

Los polipéptidos para su uso en la invención también pueden prepararse como fragmentos de dichos polipéptidos aislados. Adicionalmente, los polipéptidos de EndoS49 pueden producirse también de manera sintética o por medios recombinantes. Por ejemplo, puede producirse un polipéptido de EndoS49 recombinante transfectando células de mamífero en cultivo con un vector de expresión que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido unido operablemente a secuencias de control adecuadas, cultivando las células, extrayendo el polipéptido de EndoS49 producido por las células y purificándolo.

Los polipéptidos de EndoS49 descritos en esta sección muestran actividad endoglucosidasa. Preferentemente, el polipéptido hidroliza IG o fragmentos Fc de IgG hidrolizando el glucano unido de un polipéptido de cadena pesada de IgG de longitud completa. Preferentemente, el polipéptido EndoS49 de la invención también tiene actividad endoglucosidasa y es capaz de hidrolizar el glucano de la alfa-1-microglobulina.

La actividad endoglucosidasa puede determinarse mediante un ensayo adecuado. Por ejemplo, puede incubarse un polipéptido de ensayo con glucoproteína, tal como IgG o alta-1-microglobulina a una temperatura adecuada, tal como 37°C. Los materiales de partida y los productos de reacción pueden analizarse por SDS PAGE. Típicamente, en caso de que el polipéptido tenga actividad endoglucosidasa de IgG, la masa molecular de la cadena pesada de IgG se reduce en de aproximadamente 3kDa a 4kDa. Otro ensayo para determinar si un polipéptido de ensayo tiene actividad endoglucosidasa de IgG es detectando la IgG glucosilada usando aglutinina lectina (LCA) de *Lens culinaris*, usando opcionalmente peroxidasa de rábano picante y sustrato de peroxidasa. Típicamente, se reduce la señal de carbohidrato en caso de que el polipéptido de ensayo tenga actividad endoglucosidasa de IgG. Otro ensayo para determinar si un polipéptido de ensayo tiene actividad endoglucosidasa de IgG es mediante incubación de un polipéptido de ensayo con fragmentos Fc de IgG purificados seguido de reducción de la muestra con ditiotreitól 10 mM y análisis por espectroscopia de masas (MALDI-TOF). También puede medirse la actividad endoglucosidasa para los polipéptidos EndoS49 usando alfa-1-microglobulina en lugar de IgG en los ensayos mencionados anteriormente.

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

El polipéptido EndoS49 es capaz de hidrolizar moléculas de glucoproteína presentes en una muestra tomada de un sujeto. Por lo tanto, cuando el sujeto es un ser humano, el polipéptido EndoS49 es capaz de hidrolizar los glucanos en glucoproteínas de un sujeto, tal como en las cadenas pesadas de IgG o alfa-1-microglobulina humanas. EndoS49 es capaz de hidrolizar IgG humanas de las cuatro subclases (IgG₁₋₄). En realizaciones preferidas, el polipéptido EndoS49 tiene la capacidad de hidrolizar IgG y alfa-1-microglobulina humanas.

Métodos que usan la actividad endoglucosidasa de EndoS49

25 Tal como se describe en el presente documento, EndoS49 tiene actividad endoglucosidasa y es capaz de hidrolizar el glucano de las glucoproteínas, incluyendo IgG y alfa-1-microglobulina. La presente invención proporciona, por lo tanto, métodos para desglucosilar glucoproteínas y en particular, la hidrólisis de glucano de las glucoproteínas y en particular, de IgG y alfa-1-microglobulina. Típicamente, dicho método incluye incubar una muestra que contiene glucoproteína con EndoS49 con una glucoproteína en condiciones que permiten la actividad endoglucosidasa. Las condiciones adecuadas incluyen el uso de EndoS49 a una concentración de al menos 1 µg/ml, 2 µg/ml, 4 µg/ml, 6 µg/ml, 8 µg/ml, 10 µg/ml, 12 µg/ml, 15 µg/ml o 20 µg/ml, preferentemente al menos 10 µg/ml. Las condiciones adecuadas también incluyen incubación de la muestra con EndoS49 durante al menos 20 minutos, 30 minutos, 40 minutos, 50 minutos, 60 minutos, 70 minutos, 80 minutos, 90 minutos o 120 minutos, preferentemente al menos 60 minutos. La incubación se produce preferentemente a temperatura ambiente, más preferentemente, a aproximadamente 20°C, 25°C, 30°C, 35°C, 40°C o 45°C, y lo más preferentemente a aproximadamente 37°C.

Estos métodos pueden usarse para proporcionar glucoproteínas desglucosiladas, que por sí mismas pueden ser útiles en investigación o terapia. Estos métodos también pueden usarse para caracterizar glucanos o glucoproteínas, por ejemplo, en el mapeo de glucanos o la elaboración de perfiles de glucanos. Dicho mapeo de glucanos y elaboración de perfiles de glucanos es particularmente útil para moléculas de anticuerpo, tales como moléculas IgG, por ejemplo, en el análisis de moléculas IgG monoclonales. Típicamente, los métodos implican incubar la proteína con EndoS49 para hidrolizar los glucanos de la proteína. Posteriormente, se separan los glucanos y la proteína o el polipéptido, por ejemplo, usando cualquier técnica adecuada, tal como HPLC o cromatografía en gel. Los restos separados pueden analizarse entonces usando cualquier método analítico conocido, tal como espectrometría de masas, HPLC, cromatografía en gel, electroforesis en gel, espectrometría, electroforesis capilar y otras técnicas de laboratorio convencionales para el análisis de glucanos y/o proteínas.

De acuerdo con métodos adicionales de la presente invención, los métodos también pueden comprender utilizar enzimas adicionales, tales como IdeS, de tal forma que los glucanos de la porción Fc del anticuerpo puedan analizarse con más detalles usando los métodos y las técnicas descritas en el presente documento.

Un ejemplo es analizar la fucosilación de una inmunoglobulina. El grado de fucosilación de los glucanos de Fc en una molécula IgG es importante para el potencial terapéutico de un candidato a fármaco de IgG. Las moléculas de IgG afucosiladas aumentan el efecto de ADCC (nn) de la molécula IgG terapéutica. Por lo tanto, de acuerdo con la presente invención, se proporciona un método para analizar la cantidad de fucosa en los glucanos de Fc de una IgG, usando EndoS49.

Típicamente, dicho método incluye incubar una glucoproteína, en este caso una inmunoglobulina, con EndoS49 en condiciones que permiten la actividad endoglucosidasa de EndoS49. Las condiciones adecuadas incluyen el uso de EndoS49 a una concentración de al menos 1 µg/ml, 2 µg/ml, 4 µg/ml, 6 µg/ml, 8 µg/ml, 10 µg/ml, 12 µg/ml, 15 µg/ml o 20 µg/ml, preferentemente al menos 10 µg/ml. Las condiciones adecuadas también incluyen incubación de la muestra con EndoS49 durante al menos 20 minutos, 30 minutos, 40 minutos, 50 minutos, 60 minutos, 70 minutos, 80 minutos, 90 minutos o 120 minutos, preferentemente al menos 60 minutos. La incubación se produce preferentemente a temperatura ambiente, más preferentemente, a aproximadamente 20°C, 25°C, 30°C, 35°C, 40°C o 45°C, y lo más preferentemente a aproximadamente 37°C. Puede añadirse IdeS después de la reacción con

EndoS49 o en la misma mezcla de reacción, para inducir la proteólisis, dividiendo la molécula de inmunoglobulina en F(ab')₂ y Fc. Los dos fragmentos se separan usando un método de separación antes de su inyección en un espectrómetro de masas. Después de la escisión de glucanos, el resto de GlcNAc y de Fuc de núcleo permanecen unidos a Asn en el sitio de glucosilación consenso de Fc/2. Ya que una inmunoglobulina afucosilada no está fucosilada en el núcleo, algunas Fc/2 contendrán únicamente un GlcNAc después de la digestión. La diferencia de masa característica (-146 Da) resultante de la ausencia de fucosa es fácilmente evidente en el espectro de masas deconvolucionado. Por lo tanto, el uso de EndoS49 facilita la estimación directa del grado de defucosilación de núcleo de la IgG.

Los siguientes ejemplos ilustran la invención:

Ejemplo 1

MATERIALES Y MÉTODOS

15 Cepas bacterianas y crecimiento

Se ha secuenciado el genoma de GAS de la cepa NZ131 del serotipo M49 y por lo tanto, esta cepa se seleccionó como cepa de referencia en este trabajo (McShan *et al.*, 2008) (Chaussee *et al.*, 1999). Se propagó GAS de la cepa NZ131 sobre sangre agar y las cepas de *Escherichia coli* Top10 (Invitrogen) y BL21 pLysS (Invitrogen) se propagaron sobre caldo de lisogenia (LB) agar. Para la selección en células *E. coli* Top10, se usó carbenicilina a 100 µg/ml y para *E. coli* BL21 pLysS, se usaron 100 µg/ml de carbenicilina y 34 µg/ml de cloranfenicol. Se llevaron a cabo cultivos de una noche de *E. coli* en LB a 37°C con aireación. La preparación de ADN genómico de GAS de la cepa NZ131 se llevó a cabo usando el kit de purificación de ADN Puregene (Qiagen). La transformación se llevó a cabo usando choque térmico a 42°C durante 30 s. Las preparaciones de plásmido a partir de *E. coli* se llevaron a cabo usando el kit I Plasmid Miniprep (E.Z.N.A). Todos los cebadores usados en este trabajo se listan en la tabla 2.

Expresión recombinante de EndoS49

La expresión de EndoS49 en *E. coli* se estableció por amplificación PCR del gen *ndoS49* de la cepa NZ131 de *Streptococcus* del grupo A, serotipo M49 con los cebadores *ndoS49-F-BamHI*, CTGTAAGGATCCAGGAGAA-GACTG, y *ndoS49-R-XhoI*, GAAACCTCGAGTCTTTGTAATCGTAGGACTT. El fragmento génico de *ndoS49* se digirió con las enzimas de restricción *BamHI* y *XhoI* y se ligó en el vector de expresión pGEX-5X-3 (Amersham Biosciences) usando ADN ligasa T4 (Fermentas) creando el plásmido pGEX-*ndoS49*. El vector de expresión se transformó en células químicamente competentes de *E. coli* Top10 y se cultivaron las células recombinantes en placas con 100 µg/ml de carbenicilina y se exploraron mediante PCR usando los cebadores *ndoS49-F-BamHI* y *ndoS49-R-XhoI*. Se aislaron los clones positivos y el plásmido pGEX-*ndoS49* se purificó y transformó en la cepa de expresión de *E. coli* BL21 pLysS como se ha descrito anteriormente.

Se cultivó durante la noche un clon recombinante a 37°C con antibióticos y se diluyó a 1:20 en medio LB con antibióticos y se cultivó durante 3 h. Se indujo la expresión de la proteína EndoS49 con 0,1 mM de IPTG durante 3 h. Se recogieron las células y se lisaron usando el reactivo de extracción de proteínas BugBuster (Novagen). Se purificó GST-EndoS49 recombinante en columna con glutatión sefarosa 4B (GE Healthcare) y se eluyó con glutatión reducido.

45 Mutagénesis de EndoS49

Se llevó a cabo mutagénesis de sitio dirigido del ácido glutámico 186(glu-186) a leucina (E186L) usando el kit de mutagénesis de sitio dirigido Quick-Change II (Stratagene) según las instrucciones del fabricante. El cebador de mutagénesis usado fue CTAGATATTGATATTCACGAATTTACGAAC en combinación con el antisentido de la secuencia anterior y el plásmido pGEX-*ndoS49* (mutación en subrayado). Esto generaron los plásmidos pGEX-*ndoS49*(E186L) y, después de la secuenciación, se expresó EndoS49(E186L) recombinante y se purificó como se ha descrito para EndoS49. Se construyeron versiones truncadas de EndoS49 amplificando partes del gen *ndoS49* de GAS NZ131 con el cebador *ndoS49*(trunc1-5) que contiene los sitios de restricción *BamHI* y *XhoI* (tabla 2). Los fragmentos se digirieron y ligaron en el vector pGEX como en el caso anterior y se transformó en *E. coli* Top10 y posteriormente a BL21 pLysS y se cultivaron con antibióticos. Las proteínas se produjeron como en el caso anterior y se purificaron las proteínas EndoS49(trunc1) de 80 kDa, EndoS49(trunc2) de 70 kDa, EndoS49(trunc3) de 60 kDa, EndoS49(trunc4) de 50 kDa, EndoS49(trunc5) de 42 kDa.

Ensayo de hidrólisis de glucano de glucoproteína

Se incubaron 1 µg de EndoS49 recombinante y sus mutantes con 3 µg de cada glucoproteína en 20 µl de PBS durante una noche a 37°C. La hidrólisis del glucano se analizó en un gel de SDS-PAGE al 10% y posteriormente se analizó con transferencia de LCAlectina como se ha descrito anteriormente (Collin y Olsen, 2001a).

Análisis de transferencia en ranura

Se inmovilizaron EndoS49 y sus mutantes sobre una membrana de PVDF activada con metanol a 4, 2, 1 µg en PBS por ranura usando equipamiento para transferencia en ranura de Millipore. Se bloqueó la membrana con leche desnatada al 5% (Difco) durante 1 h a temperatura ambiente. Se llevó a cabo el lavado consistentemente durante 3x10 minutos en PBST. La membrana se incubó con 10 µg de IgG humana (Sigma) en leche desnatada al 0,5% durante 1 h a 37°C y después se lavó. Se añadieron 5 µg de peroxidasa de rábano picante conjugada con proteína G (Invitrogen) a la membrana y se incubaron durante 1 h a 37°C. Después de lavar, se reveló la membrana con sustrato luminiscente Supersignal West Pico (Thermo Scientific).

Análisis bioinformático

Se tradujeron los genes *ndoS49* y *ndoS* en EndoS49 y EndoS y se compararon usando el algoritmo ClustalW en el programa informático MacVector (MacVector Inc.). Se construyó el árbol filogenético con MacVector usando secuencias de proteína del PubMed del NCBI con los siguientes números de referencia: EndoS (AF296340), EndoE (AAR20477), EndoH (NP_631673), EndoC (ADC53484), EndoF2 (P36912), EndoF3 (P36913) (Collin y Olsen, 2001b) (Collin y Fischetti, 2004) (Tarentino y Plummer, 1974) (Tarentino *et al.*, 1993).
Exploración PCR para *ndoS49*

Se designaron los cebadores que amplifican el gen *ndoS49* de GAS y se denominaron *ndoS49-F* (AAAACGCGGACCACTATATGC) y *ndoS49-R* (AAACGTTGTCCGAGGATTTG). Se propagaron 42 cepas de GAS sobre sangre agar y se cultivaron durante una noche a 37°C con CO₂ al 5%. Se recogieron colonias individuales y se lisaron en 20 µl de H₂O estéril a 99°C durante 10 minutos. Estos lisados se usaron como molde para una reacción PCR rigurosa para detectar *ndoS49* en las 42 cepas de GAS. Como control positivo, se diseñaron cebadores para la amplificación del gen *recA*, *recA-F* (AGCCCTTGATGATGCTTTG) y *recA-R* (AACAATTCTGGGTGATCGG). Como controles positivos, ambas reacciones PCR usaron ADN genómico de la cepa de GAS NZ131 (M49) y AP1 (M1) como molde.

RESULTADOS

El análisis ClustalW revela dos enzimas diferentes: EndoS49 y EndoS

Se tradujeron *in silico* los genes *ndoS49* y *ndoS* en proteínas y se compararon usando el algoritmo ClustalW. A nivel génico, la identidad es del 50% y a nivel de proteína del 37%. El análisis ClustalW reveló una secuencia de péptido de señal (prácticamente) idéntica y un dominio catalítico de glucósido hidrolasa de la familia 18 (DGLDIDIE) (figura 1). El análisis experimental de EndoS ha demostrado que los triptófanos son esenciales para la actividad hidrolizante de glucano (Allhorn *et al.*, 2008). Estos triptófanos también están conservados en EndoS49. EndoS49 recombinante muestra actividad hidrolizante de glucanos en glucoproteínas humanas

Se expresó con éxito de manera recombinante el EndoS49 de 90 kDa en *E. coli* BL21 y se purificó a partir de la fracción soluble usando el marcador GST. EndoS49(E186L), un mutante catalítico con el ácido glutámico del motivo GH18 (E186) sustituido por una leucina (L), se construyó y purificó del mismo modo. Para mapear la actividad de la proteína, se construyeron 5 versiones de las enzimas truncadas en el carboxilo terminal y se denominaron EndoS49 (trunc1) de 80 kDa, EndoS49(trunc2) de 70 kDa, EndoS49(trunc3) de 60 kDa, EndoS49(trunc4) de 50 kDa y EndoS49(trunc5) de 42 kDa. Esta colección de enzimas se utilizó para analizar la actividad hidrolizante de glucanos de EndoS49 en glucoproteínas humanas. En primer lugar, se incubaron las enzimas con IgG humana durante una noche y se analizaron en un gel de SDS-PAGE y con transferencia de LCA lectina, detectando las estructuras de manosa en el glucano de IgG. El gel reveló un cambio de 4 kDa de la cadena pesada de IgG tratada con EndoS49 y la transferencia de LCA lectina confirmó este cambio como una ausencia del glucano unido en N (figura 2A). EndoS49 (E186L) no mostró desplazamiento o cambio en la composición de glucanos, lo que sugiere que E186 desempeña un papel crucial en la actividad catalítica de EndoS49. En lo referente a las enzimas truncadas, EndoS49(trunc1-4) mostró actividad en el glucano de IgG pero EndoS49(trunc5), la más pequeña de las enzimas (42 kDa), no mostró actividad hidrolizante de glucano (figura 2A).

Se llevó a cabo un análisis adicional de la desglucosilación de la IgG por EndoS49 incubando IgG₁₋₄ con EndoS49 y EndoS49(E186L), durante una noche. Se analizaron las subclases de IgG como en el caso anterior y se demostró que EndoS49 tiene actividad en las cuatro subclases de IgG y en línea con el resultado anterior, el mutante catalítico no mostró actividad (figura 2B). La incubación de la colección de enzimas con alfa-1-microglobulina, una proteína sérica pesada glucosilada humana y el análisis en SDS-PAGE mostraron actividad de hidrólisis de glucano de EndoS49 en esta glucoproteína (figura 2C). Para dilucidar adicionalmente la especificidad de EndoS49, se incubó un modelo de sustrato que consistía en una N-acetil-beta-D-glucosamina acoplada al 4-metilumbeliferilo fluorescente con EndoS49 durante 1, 2, 3, 4 y 16 h y se midió la fluorescencia. La fluorescencia aumentará en caso de que se escinda el azúcar, pero no se observó un aumento de la intensidad de este tipo (datos no mostrados) lo que sugiere que EndoS49 tiene actividad únicamente en sustratos de glucoproteína.

Unión de EndoS49 a IgG

El hallazgo de que EndoS49 tiene actividad hidrolizante de glucanos en las IgG hizo creer a los presentes inventores que la enzima se une a IgG. Esto se evaluó con análisis de transferencia de ranura, donde EndoS49 y su mutante catalítico y las versiones truncadas se inmovilizaron sobre una membrana de PVDF y se incubaron con IgG y se detectó la unión con proteína G acoplada a peroxidasa de rábano picante (HRP). La transferencia de ranura muestra una unión aumentada a IgG por parte del mutante catalítico EndoS49 (E186L) (figura 3).

El gen *ndoS49* está presente en el serotipo M49 de GAS

Para dilucidar si *ndoS49* está presente en cualquier otro serotipo distinto de M49, se empleó una PCR rigurosa para analizar la presencia del gen *ndoS49* en una selección de cepas de GAS. Se usaron los cebadores *ndoS49-F* y *ndoS49-R* en una PCR en lisados de colonias de GAS junto con el control positivo que amplifica el gen *recA*, presente en todas las cepas de GAS. Se amplificó el gen *ndoS49* en todos los serotipos M49 de GAS seleccionados y también en el serotipo M60, mientras que ningún otro serotipo proporcionó un producto de la PCR (tabla 1).

En los genomas secuenciados de las cepas de GAS NZ131 (M49) y MGAS5005 (M1), se compararon los genes que rodean a *ndoS49* y a *ndoS*, revelando que los genes están ubicados en el mismo contexto genómico y que los genes circundantes se encuentran altamente conservados (figura 4). Se comparó EndoS49 de longitud completa con una selección de endoglucosidasas previamente descritas, EndoS, EndoC, EndoH, EndoE, EndoF2, EndoF3) y se reconstruyó un árbol filogenético (figura 5). Esto reveló que EndoS y EndoC están más estrechamente relacionados que EndoS y EndoS49 y que las endoglucosidasas de *Streptococcus* están estrechamente relacionadas en comparación con enzimas de otras bacterias.

Tabla 1. La presencia de *ndoS49* en una selección de serotipos de GAS

Cepa	Serotipo	<i>ndoS49</i>	<i>recA</i>
5448	M1	-	+
SF370	M1	-	+
ACN1	M1	-	+
ACN2	M2	-	+
ANC3	M3	-	+
20224	M3	-	+
ACN4	M4	-	+
ACN5	M5	-	+
Manfredo	M5	-	+
ACN6	M6	-	+
AP6	M6	-	+
ACN9	M9	-	+
ACN11	M11	-	+
ACN12	M12	-	+
ACN18	M18	-	+
ACN19	M19	-	+
ACN22	M22	-	+
ACN24	M24	-	+
ACN28	M28	-	+
NZ131	M49	+	+
3487-05	M49	+	+
AW1	M49	+	+
AW2	M49	+	+

Cepa	Serotipo	<i>ndoS49</i>	<i>recA</i>
AW3	M49	+	+
AW4	M49	+	+
AW6	M49	+	+
AW7	M49	+	+
AW8	M49	+	+
AW9	M49	+	+
AW10	M49	+	+
AW11	M49	+	+
AW12	M49	+	+
AW13	M49	+	+
ACN49	M49	+	+
AP49	M49	+	+
CS101	M49	+	+
AP53	M53	-	+
ALAB49	M53	-	+
ACN55	M55	-	+
ACN57	M57	-	+
ACN60	M60	+	+
AP74	M74	-	+

Tabla 2. Cebadores usados en el presente trabajo

Nombre del cebador	Secuencia (5'-3')
ndoS49-F-BamHI	CTGTAAGGATCCAGGAGAAGACTG
ndoS49-R-XhoI	GAAACCTCGAGTCTTTGTAATCGTAGGACTT
ndoS49(E186L)-F	CTAGATATTGATATTCTTCACGAATTTACGAAC
ndoS49(E186L)-R	GTTTCGTAAATTCGTGAAGAATATCAATATCTAG
ndoS49(trunc1)-R-XhoI	ATTTCTCGAGCTGAAGACGTCCTTTAGCCACG
ndoS49(trunc2)-R-XhoI	TAAACTCGAGCCCCATCAGAAACATCTACTAAG
ndoS49(trunc3)-R-XhoI	ATTTTCTCGAGGCATTATCAACATCATAATGACC
ndoS49(trunc4)-R-XhoI	TAAACTCGAGCCAGTCATGCCTACCATAACAAGCTCAGC
ndoS49(trunc5)-R-XhoI	ATTTCTCGAGCTGTCCAACCTGTTGAATG
ndoS49-F	AAAACGCGGACCACTATATGC
ndoS49-R	AAACGTTGTCCGAGGATTTG
recA-F	AGCCCTTGATGATGCTTTG
recA-R	AACAATTCTGGGTGATCGG

La secuencia de proteína de EndoS49

5

Secuencias de referencia del NCBI

Genoma de NZ131: NC_011375.1

Secuencia génica de *ndoS49*: NC_011375.1
 Secuencia de proteína de *EndoS49*: YP_002286383.1

Secuencia de proteína de *EndoS49*:

5

MDKHLVLRKRTLGCVCAATLMGAALATHHDSLNTVKAEEKTVQTG
 KTDQQVGAQLVQEIREGKRGPLYAGYFRTWHDRASTGIDGKQQHPENTMAEVPKEVDI
 LFFVFDHTASDSPFWSELKDSYVHKLHQQTALVQTIQVNEINGRTGLSKDYPDTPEG
 NKALAAAIKAFVTDTRGVDGLDIDIEHEFTNKRTPEEDARALNVFKEIAQLIGKNGSD
 KSKLLIMDTTSLVENNPIFKGIAEDLDYLLRQYYGSQGGAEVDTINSDWNQYQNYID
 ASQFMIGFSFFEESASKGNLWFDVNEYDPNNPEKGDIEGTRAKKYAEWQPSTGGLKA
 GIFSYAIDRDGVAHVPSYKNRTSTNLQRHEVDNISHTDYTVSRKLTLMTEDKRYDV
 IDQKDI PDPALREQIIQQVQYKGDRLERYNKTTLVLTGDKIQNLKGLEKLSKLQKLELR
 QLSNVKEITPELLPESMCKDAELVMVGMTGLEKLNLSGLNRQTLTDGIDVNSITHLTSF
 DISHNSLDLSEKSEDRKLLMTLMEQVSNHQKITVKNTAFENQPKGYYPQTYDTKEGH
 YDVDNAEHDILTDFVFGTVTKRNTFIGDEEAFAYKEGAVDGRQYVSKDYTYEAFRKY
 YKGYKVHLTASNLGETVTSKVTATTDETYLVDSVSDGEKVVHMKLNIGSGAIMMENLA
 KGAKVIGTSGDFEQAKKIFDGEKSDRFFTWGQTNWIAFDLGEINLAKEWRLFNAETNT
 EIKTDSSLNVAKGRLQILKDTTIDLEKMDIKNRKEYLSNDENWTDVAQMDDAKAIFNS
 KLSNVLSRYWRFVCGGASSYYPQYTELQILGQRLSNDVANTLKD

Ejemplo 2

- 10 Las moléculas monoclonales de Ig pueden mostrar variaciones menores en los glucanos de Fc y como consecuencia, los glucanos de Fc pueden parecer una agrupación no homogénea de glucanos de Fc. La gran mayoría de los glucanos son idénticos, pero una minoría puede mostrar una estructura o composición de carbohidratos variable. La variedad surge tanto del origen de la parte Fc, que puede ser humana, humanizada o de otra especie, como de la elección de la línea celular productora y de las condiciones de cultivo celular.
- 15 En este ejemplo, se desglucosilaron dos fármacos a base de IgG de sobra conocidos, Avastin y Erbitux, tanto con *EndoS* como con *EndoS49*. Las muestras se incubaron con *EndoS* o *EndoS49* tal como se expone en la tabla a continuación.

Carril	Muestra	Erbitux 100 µg	Avastin 100 µg	EndoS 0,1 mg/ml (µl)	EndoS49 0,1 mg/ml (µl)	ideS 1 µg
1	Patrón de PM	-	-	-	-	-
2		-	+	5	-	+
3		-	+	50	-	+
4		-	+	-	5	+
5		-	+	-	50	+
6		-	+	-	-	+
7		+	-	5	-	+
8		+	-	50	-	+
9		+	-	-	5	+
10		+	-	-	50	+
11		+	-	-	-	+
12	Patrón de PM	-	-	-	-	-

- 20 Los resultados se muestran en la figura 6. Se observó que *EndoS49* tiene el potencial de escindir una variedad mayor de glucanos que *EndoS*. Incluso si la incubación se dejó durante una noche para minimizar el efecto de diferencias potenciales en las actividades enzimáticas, la enzima *EndoS* no pudo desglucosilar completamente a los glucanos de Fc de Erbitux. Sin embargo, *EndoS49* muestra un perfil de desglucosilación completo y por lo tanto es la enzima más favorable a la hora de elaborar perfiles de glucanos de las inmunoglobulinas.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> GENOVIS AB
 5 <120> PROTEÍNA Y MÉTODO
 <130> N.114953A
 10 <150> 1115841,7
 <151> 13-09-2011
 <160> 19
 15 <170> PatentIn versión 3.5
 <210> 1
 <211> 843
 <212> PRT
 20 <213> *Streptococcus pyogenes*
 <400> 1

```

Met Asp Lys His Leu Leu Val Lys Arg Thr Leu Gly Cys Val Cys Ala
 1           5              10          15

Ala Thr Leu Met Gly Ala Ala Leu Ala Thr His His Asp Ser Leu Asn
          20              25          30

Thr Val Lys Ala Glu Glu Lys Thr Val Gln Thr Gly Lys Thr Asp Gln
          35              40          45

Gln Val Gly Ala Lys Leu Val Gln Glu Ile Arg Glu Gly Lys Arg Gly
 50              55              60

Pro Leu Tyr Ala Gly Tyr Phe Arg Thr Trp His Asp Arg Ala Ser Thr
65              70              75          80

Gly Ile Asp Gly Lys Gln Gln His Pro Glu Asn Thr Met Ala Glu Val
          85              90          95

Pro Lys Glu Val Asp Ile Leu Phe Val Phe His Asp His Thr Ala Ser
          100             105             110

Asp Ser Pro Phe Trp Ser Glu Leu Lys Asp Ser Tyr Val His Lys Leu
          115             120             125

His Gln Gln Gly Thr Ala Leu Val Gln Thr Ile Gly Val Asn Glu Leu
130             135             140

Asn Gly Arg Thr Gly Leu Ser Lys Asp Tyr Pro Asp Thr Pro Glu Gly
145             150             155             160

Asn Lys Ala Leu Ala Ala Ala Ile Val Lys Ala Phe Val Thr Asp Arg
    
```

ES 2 627 334 T3

				165					170					175		
Gly	Val	Asp	Gly	Leu	Asp	Ile	Asp	Ile	Glu	His	Glu	Phe	Thr	Asn	Lys	
			180					185					190			
Arg	Thr	Pro	Glu	Glu	Asp	Ala	Arg	Ala	Leu	Asn	Val	Phe	Lys	Glu	Ile	
		195					200					205				
Ala	Gln	Leu	Ile	Gly	Lys	Asn	Gly	Ser	Asp	Lys	Ser	Lys	Leu	Leu	Ile	
	210					215					220					
Met	Asp	Thr	Thr	Leu	Ser	Val	Glu	Asn	Asn	Pro	Ile	Phe	Lys	Gly	Ile	
225					230				235						240	
Ala	Glu	Asp	Leu	Asp	Tyr	Leu	Leu	Arg	Gln	Tyr	Tyr	Gly	Ser	Gln	Gly	
				245					250					255		
Gly	Glu	Ala	Glu	Val	Asp	Thr	Ile	Asn	Ser	Asp	Trp	Asn	Gln	Tyr	Gln	
			260					265					270			
Asn	Tyr	Ile	Asp	Ala	Ser	Gln	Phe	Met	Ile	Gly	Phe	Ser	Phe	Phe	Glu	
		275					280					285				
Glu	Ser	Ala	Ser	Lys	Gly	Asn	Leu	Trp	Phe	Asp	Val	Asn	Glu	Tyr	Asp	
	290					295					300					
Pro	Asn	Asn	Pro	Glu	Lys	Gly	Lys	Asp	Ile	Glu	Gly	Thr	Arg	Ala	Lys	
305					310					315					320	
Lys	Tyr	Ala	Glu	Trp	Gln	Pro	Ser	Thr	Gly	Gly	Leu	Lys	Ala	Gly	Ile	
				325					330					335		
Phe	Ser	Tyr	Ala	Ile	Asp	Arg	Asp	Gly	Val	Ala	His	Val	Pro	Ser	Thr	
			340					345					350			
Tyr	Lys	Asn	Arg	Thr	Ser	Thr	Asn	Leu	Gln	Arg	His	Glu	Val	Asp	Asn	
		355					360					365				
Ile	Ser	His	Thr	Asp	Tyr	Thr	Val	Ser	Arg	Lys	Leu	Lys	Thr	Leu	Met	
	370					375					380					
Thr	Glu	Asp	Lys	Arg	Tyr	Asp	Val	Ile	Asp	Gln	Lys	Asp	Ile	Pro	Asp	
385					390					395					400	
Pro	Ala	Leu	Arg	Glu	Gln	Ile	Ile	Gln	Gln	Val	Gly	Gln	Tyr	Lys	Gly	
				405					410					415		

ES 2 627 334 T3

Asp Leu Glu Arg Tyr Asn Lys Thr Leu Val Leu Thr Gly Asp Lys Ile
 420 425 430

Gln Asn Leu Lys Gly Leu Glu Lys Leu Ser Lys Leu Gln Lys Leu Glu
 435 440 445

Leu Arg Gln Leu Ser Asn Val Lys Glu Ile Thr Pro Glu Leu Leu Pro
 450 455 460

Glu Ser Met Lys Lys Asp Ala Glu Leu Val Met Val Gly Met Thr Gly
 465 470 475 480

Leu Glu Lys Leu Asn Leu Ser Gly Leu Asn Arg Gln Thr Leu Asp Gly
 485 490 495

Ile Asp Val Asn Ser Ile Thr His Leu Thr Ser Phe Asp Ile Ser His
 500 505 510

Asn Ser Leu Asp Leu Ser Glu Lys Ser Glu Asp Arg Lys Leu Leu Met
 515 520 525

Thr Leu Met Glu Gln Val Ser Asn His Gln Lys Ile Thr Val Lys Asn
 530 535 540

Thr Ala Phe Glu Asn Gln Lys Pro Lys Gly Tyr Tyr Pro Gln Thr Tyr
 545 550 555 560

Asp Thr Lys Glu Gly His Tyr Asp Val Asp Asn Ala Glu His Asp Ile
 565 570 575

Leu Thr Asp Phe Val Phe Gly Thr Val Thr Lys Arg Asn Thr Phe Ile
 580 585 590

Gly Asp Glu Glu Ala Phe Ala Ile Tyr Lys Glu Gly Ala Val Asp Gly
 595 600 605

Arg Gln Tyr Val Ser Lys Asp Tyr Thr Tyr Glu Ala Phe Arg Lys Asp
 610 615 620

Tyr Lys Gly Tyr Lys Val His Leu Thr Ala Ser Asn Leu Gly Glu Thr
 625 630 635 640

Val Thr Ser Lys Val Thr Ala Thr Thr Asp Glu Thr Tyr Leu Val Asp
 645 650 655

Val Ser Asp Gly Glu Lys Val Val His His Met Lys Leu Asn Ile Gly
 660 665 670

ES 2 627 334 T3

Ser Gly Ala Ile Met Met Glu Asn Leu Ala Lys Gly Ala Lys Val Ile
675 680 685

Gly Thr Ser Gly Asp Phe Glu Gln Ala Lys Lys Ile Phe Asp Gly Glu
690 695 700

Lys Ser Asp Arg Phe Phe Thr Trp Gly Gln Thr Asn Trp Ile Ala Phe
705 710 715 720

Asp Leu Gly Glu Ile Asn Leu Ala Lys Glu Trp Arg Leu Phe Asn Ala
725 730 735

Glu Thr Asn Thr Glu Ile Lys Thr Asp Ser Ser Leu Asn Val Ala Lys
740 745 750

Gly Arg Leu Gln Ile Leu Lys Asp Thr Thr Ile Asp Leu Glu Lys Met
755 760 765

Asp Ile Lys Asn Arg Lys Glu Tyr Leu Ser Asn Asp Glu Asn Trp Thr
770 775 780

Asp Val Ala Gln Met Asp Asp Ala Lys Ala Ile Phe Asn Ser Lys Leu
785 790 795 800

Ser Asn Val Leu Ser Arg Tyr Trp Arg Phe Cys Val Asp Gly Gly Ala
805 810 815

Ser Ser Tyr Tyr Pro Gln Tyr Thr Glu Leu Gln Ile Leu Gly Gln Arg
820 825 830

Leu Ser Asn Asp Val Ala Asn Thr Leu Lys Asp
835 840

<210> 2
<211> 843
5 <212> PRT
<213> *Streptococcus pyogenes*

<400> 2

Met Asp Lys His Leu Leu Val Lys Arg Thr Leu Gly Cys Val Cys Ala
1 5 10 15

Ala Thr Leu Met Gly Ala Ala Leu Ala Thr His His Asp Ser Leu Asn
20 25 30

Thr Val Lys Ala Glu Glu Lys Thr Val Gln Thr Gly Lys Thr Asp Gln
35 40 45

10

ES 2 627 334 T3

Gln Val Gly Ala Lys Leu Val Gln Glu Ile Arg Glu Gly Lys Arg Gly
50 55 60

Pro Leu Tyr Ala Gly Tyr Phe Arg Thr Trp His Asp Arg Ala Ser Thr
65 70 75 80

Gly Ile Asp Gly Lys Gln Gln His Pro Glu Asn Thr Met Ala Glu Val
85 90 95

Pro Lys Glu Val Asp Ile Leu Phe Val Phe His Asp His Thr Ala Ser
100 105 110

Asp Ser Pro Phe Trp Ser Glu Leu Lys Asp Ser Tyr Val His Lys Leu
115 120 125

His Gln Gln Gly Thr Ala Leu Val Gln Thr Ile Gly Val Asn Glu Leu
130 135 140

Asn Gly Arg Thr Gly Leu Ser Lys Asp Tyr Pro Asp Thr Pro Glu Gly
145 150 155 160

Asn Lys Ala Leu Ala Ala Ala Ile Val Lys Ala Phe Val Thr Asp Arg
165 170 175

Gly Val Asp Gly Leu Asp Ile Asp Ile Leu His Glu Phe Thr Asn Lys
180 185 190

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

Ala Gln Leu Ile Gly Lys Asn Gly Ser Asp Lys Ser Lys Leu Leu Ile
210 215 220

Met Asp Thr Thr Leu Ser Val Glu Asn Asn Pro Ile Phe Lys Gly Ile
225 230 235 240

Ala Glu Asp Leu Asp Tyr Leu Leu Arg Gln Tyr Tyr Gly Ser Gln Gly
245 250 255

Gly Glu Ala Glu Val Asp Thr Ile Asn Ser Asp Trp Asn Gln Tyr Gln
260 265 270

Asn Tyr Ile Asp Ala Ser Gln Phe Met Ile Gly Phe Ser Phe Phe Glu
275 280 285

Glu Ser Ala Ser Lys Gly Asn Leu Trp Phe Asp Val Asn Glu Tyr Asp
290 295 300

ES 2 627 334 T3

Pro Asn Asn Pro Glu Lys Gly Lys Asp Ile Glu Gly Thr Arg Ala Lys
305 310 315 320

Lys Tyr Ala Glu Trp Gln Pro Ser Thr Gly Gly Leu Lys Ala Gly Ile
325 330 335

Phe Ser Tyr Ala Ile Asp Arg Asp Gly Val Ala His Val Pro Ser Thr
340 345 350

Tyr Lys Asn Arg Thr Ser Thr Asn Leu Gln Arg His Glu Val Asp Asn
355 360 365

Ile Ser His Thr Asp Tyr Thr Val Ser Arg Lys Leu Lys Thr Leu Met
370 375 380

Thr Glu Asp Lys Arg Tyr Asp Val Ile Asp Gln Lys Asp Ile Pro Asp
385 390 395 400

Pro Ala Leu Arg Glu Gln Ile Ile Gln Gln Val Gly Gln Tyr Lys Gly
405 410 415

Asp Leu Glu Arg Tyr Asn Lys Thr Leu Val Leu Thr Gly Asp Lys Ile
420 425 430

Gln Asn Leu Lys Gly Leu Glu Lys Leu Ser Lys Leu Gln Lys Leu Glu
435 440 445

Leu Arg Gln Leu Ser Asn Val Lys Glu Ile Thr Pro Glu Leu Leu Pro
450 455 460

Glu Ser Met Lys Lys Asp Ala Glu Leu Val Met Val Gly Met Thr Gly
465 470 475 480

Leu Glu Lys Leu Asn Leu Ser Gly Leu Asn Arg Gln Thr Leu Asp Gly
485 490 495

Ile Asp Val Asn Ser Ile Thr His Leu Thr Ser Phe Asp Ile Ser His
500 505 510

Asn Ser Leu Asp Leu Ser Glu Lys Ser Glu Asp Arg Lys Leu Leu Met
515 520 525

Thr Leu Met Glu Gln Val Ser Asn His Gln Lys Ile Thr Val Lys Asn
530 535 540

Thr Ala Phe Glu Asn Gln Lys Pro Lys Gly Tyr Tyr Pro Gln Thr Tyr

ES 2 627 334 T3

Ser Asn Val Leu Ser Arg Tyr Trp Arg Phe Cys Val Asp Gly Gly Ala
805 810 815

Ser Ser Tyr Tyr Pro Gln Tyr Thr Glu Leu Gln Ile Leu Gly Gln Arg
820 825 830

Leu Ser Asn Asp Val Ala Asn Thr Leu Lys Asp
835 840

- <210> 3
- <211> 2532
- <212> ADN
- <213> *Streptococcus pyogenes*

- <400> 3

ES 2 627 334 T3

atggataaac	atgtggtggt	aaaaagaaca	ctaggggtgtg	tttgtgctgc	aacgttgatg	60
ggagctgcct	tagcgaccca	ccatgattca	ctcaatactg	taaaagcgga	ggagaagact	120
gttcaaacag	gaaagacaga	tcagcaggtt	ggtgctaaat	tggtacagga	aatccgtgaa	180
ggaaaacgcg	gaccactata	tgctggttat	tttaggacat	ggcatgatcg	tgcttcaaca	240
ggaatagatg	gtaaacagca	acatccagaa	aatactatgg	ctgaggtccc	aaaagaagtt	300
gatatcttat	ttgtttttca	tgaccataca	gcttcagata	gtccattttg	gtctgaatta	360
aaggacagtt	atgtccataa	attacatcaa	cagggaacgg	cacttgttca	gacaattggt	420
gttaacgaat	taaatggacg	tacaggttta	tctaaagatt	atcctgatac	tcttgagggg	480
aacaaagctt	tagcagcagc	cattgtcaag	gcatttgtaa	ctgatcgtgg	tgtcgatgga	540
ctagatattg	atattgagca	cgaatttacg	aacaaaagaa	cacctgaaga	agatgctcgt	600
gctctaaatg	tttttaaaga	gattgcgag	ttaataggt	aaaatggtag	tgataaatct	660
aaattgctca	tcatggacac	taccctaagt	gttgaaaata	atccaatatt	taaagggata	720
gcggaagatc	ttgattatct	tcttagacaa	tattatggtt	cacaaggtgg	agaagctgaa	780
gtggatacta	taaactctga	ttggaaccaa	tatcagaatt	atattgatgc	tagccagttc	840
atgattggat	tctccttttt	tgaagaatct	gcgtccaaag	ggaatttatg	gtttgatggt	900
aacgaatacg	accctaacaa	tcttgaaaaa	gggaaagata	ttgaaggaac	acgtgctaaa	960
aaatgatgag	agtggaaccc	tagtacaggt	ggtttaaaag	caggtatatt	ctcttatgct	1020
attgatcgtg	atggagtggc	tcatgttctt	tcaacatata	aaaataggac	tagtacaat	1080
ttacaacggc	atgaagtcga	taatattctca	catactgact	acaccgtatc	tcgaaaatta	1140
aaaacattga	tgaccgaaga	caaacgctat	gatgtcattg	atcaaaaaga	cattcctgac	1200
ccagcattaa	gagaacaaat	cattcaacaa	gttggacagt	ataaaggcga	tttggaacgt	1260
tataacaaga	cattggtgct	tacaggagat	aagattcaaa	atcttaaagg	actagaaaaa	1320
ttaagcaagt	tacaaaaatt	agagttgctc	cagctatcta	acgttaaaga	aattactcca	1380

ES 2 627 334 T3

gaacttttgc cggaaagcat gaaaaaagat gctgagcttg ttatggtagg catgactggt 1440
 ttagaaaaac taaaccttag tggctctaat cgtcaaactt tagacgggat agacgtgaat 1500
 agtattacgc atttgacatc atttgatatt tcacataata gtttggactt gtcggaaaag 1560
 agtgaagacc gtaaactatt aatgactttg atggagcagg tttcaaatca tcaaaaaata 1620
 acggtgaaaa atacggcttt tgaaaatcaa aaaccgaaag gttattatcc tcagacgtat 1680
 gataccaaaag aaggtcatta tgatgttgat aatgcagaac atgatatttt aactgatttt 1740
 gtttttggaa ctgttactaa acgtaatacc tttattggag acgaagaagc atttgctatc 1800
 tataaagaag gagctgtcga tggctgacaa tatgtgtcta aagactatac ttatgaagct 1860
 tttcgtaaag actataaagg ttacaagggt catttaactg cttctaactc aggagaaaca 1920
 gttacttcta aggtaactgc tactactgat gaaacttact tagtagatgt ttctgatggg 1980
 gaaaaagttg ttcaccacat gaaactcaat ataggatctg gtgccatcat gatggaaaat 2040
 ctggcaaaaag gggctaaagt gattggtaca tctggggact ttgagcaagc aaagaagatt 2100
 ttcgatggtg aaaagtcaga tagattcttc acttggggac aaactaactg gatagctttt 2160
 gatctaggag aaattaatct tgccaaggaa tggcgtttat ttaatgcaga gacaaatact 2220
 gaaataaaga cagatagtag cttaaactgt gctaaaggac gtcttcagat tttaaaagat 2280
 acaactattg atttagaaaa aatggacata aaaaatcgta aagagtatct gtcgaatgat 2340
 gaaaattgga ctgatgttgc tcagatggat gatgcaaaaag cgatatttaa tagtaaatta 2400
 tccaatgttt tatctcggta ttggcggttt tgtgtagatg gtggagctag ctcttattac 2460
 cctcaatata ccgaacttca aatcctcggg caacgtttat caaatgatgt cgctaatacg 2520
 ctgaaggatt ga 2532

<210> 4
 <211> 310
 <212> PRT
 <213> *Streptococcus pyogenes*
 <400> 4

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

5

10

ES 2 627 334 T3

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

ES 2 627 334 T3

<210> 5
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> Producto de escisión
 <400> 5
 10
 Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
 1 5
 <210> 6
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 15
 <220>
 <223> Cebador
 20
 <400> 6
 ctgtaaggat ccaggagaag actg 24
 <210> 7
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 25
 <220>
 <223> Cebador
 30
 <400> 7
 gaaacctcga gtctttgtaa tcgtaggact t 31
 35
 <210> 8
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 40
 <220>
 <223> Cebador
 <400> 8
 ctagatattg atattctca cgaattacg aac 33
 45
 <210> 9
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 50
 <220>
 <223> Cebador
 <400> 9
 gttcgtaaat tcgtgaagaa tatcaatc tag 33
 55
 <210> 10
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 60
 <220>
 <223> Cebador

ES 2 627 334 T3

<400> 10
 atttctcgag ctgaagacgt ccttagcca cg 32

5 <210> 11
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Cebador

<400> 11
 taaactcgag ccccatcaga aacatctact aag 33

15 <210> 12
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Cebador

<400> 12
 atttctcga ggcattatca acatcataat gacc 34

25 <210> 13
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Cebador

<400> 13
 taaactcgag ccagtcatgc ctaccataac aagctcagc 39

35 <210> 14
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Cebador

<400> 14
 atttctcgag ctgtccaact tgttgaatg 29

45 <210> 15
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> Cebador

<400> 15
 aaaacgcgga ccactatag c 21

55 <210> 16
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

60 <220>
 <223> Cebador

65 <220>
 <223> Cebador

ES 2 627 334 T3

<400> 16
aaacgttgc cgaggatttg 20

5 <210> 17
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Cebador

<400> 17
agcccttgat gatgcttg 19

15 <210> 18
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Cebador

<400> 18
aacaattctg ggtgatcgg 19

25 <210> 19
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> Motivo catalítico GH18 presente desde los restos 179 a 186 de la SEQ ID NO: 1

35 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2)..(3)
<223> Xaa se refiere a un aminoácido no conservado

40 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (5)..(5)
<223> Xaa se refiere a un aminoácido no conservado

45 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (7)..(7)
<223> Xaa se refiere a un aminoácido no conservado

50 <400> 19

Asp Xaa Xaa Asp Xaa Asp Xaa Glu
1 5

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para la desglucosilación completa de un anticuerpo IgG que comprende incubar el anticuerpo con un polipéptido que comprende
- 10 (a) la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1;
(b) una variante de la misma que tiene al menos un 95% de identidad respecto de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 a lo largo de al menos 810 aminoácidos contiguos de la SEQ ID NO: 1 y que tiene la actividad endoglucosidasa de un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1.
- 15 2. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, que además comprende evaluar el perfil de glucosilación del anticuerpo analizando los productos producidos por dicha incubación.
3. El método de acuerdo con la reivindicación 2, que comprende:
- 20 (a) poner en contacto el anticuerpo con dicho polipéptido para hidrolizar el glucano del anticuerpo;
(b) separar el glucano de la proteína desglucosilada;
(c) analizar el glucano y/o la proteína desglucosilada producida de este modo.
4. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el anticuerpo comprende un anticuerpo IgG monoclonal.

Figura 2.

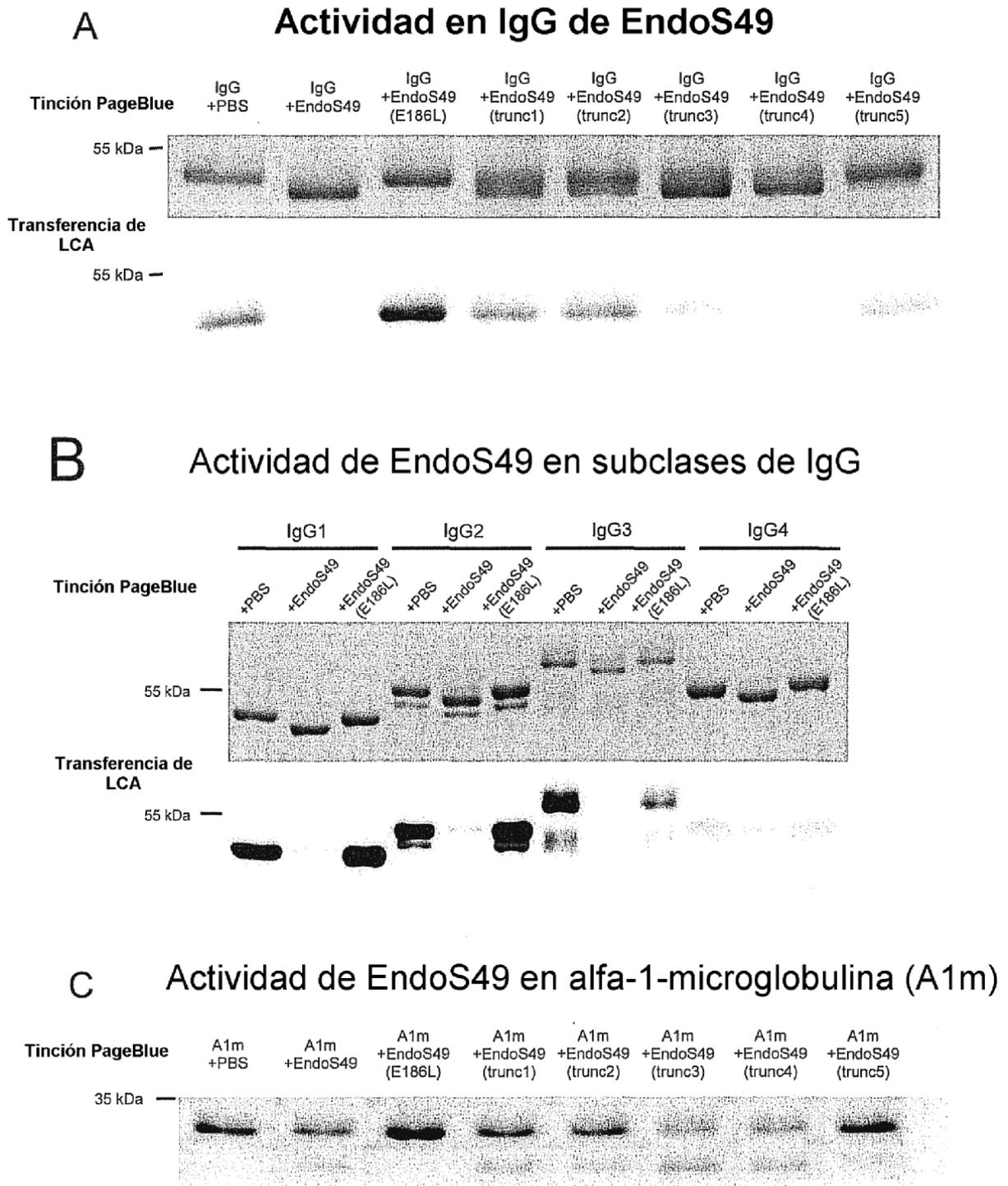


Figura 3.

Unión de EndoS49 a IgG

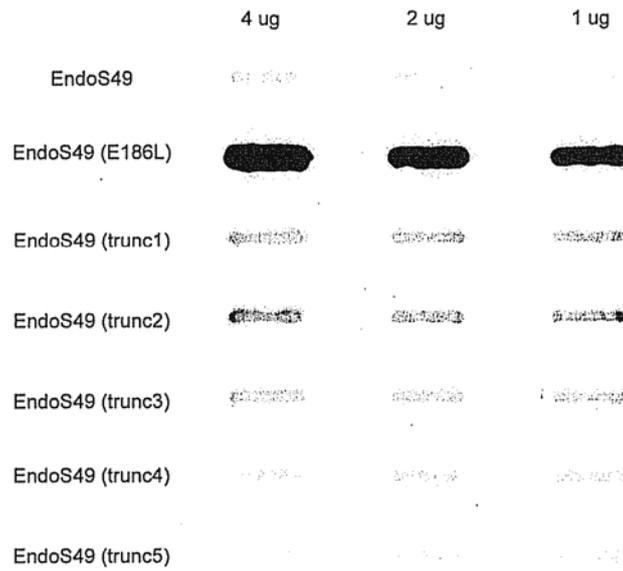


Figura 4.

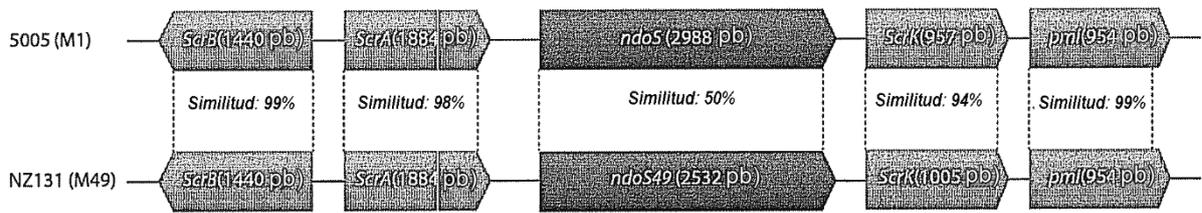


Figura 5. Árbol filogenético de las endoglucosidasas

Método: Unión de vecinos; Bootstrap (1000 rep); desempate = Sistemático
 Distancia: No corregida ("p")
 Huecos distribuidos proporcionalmente

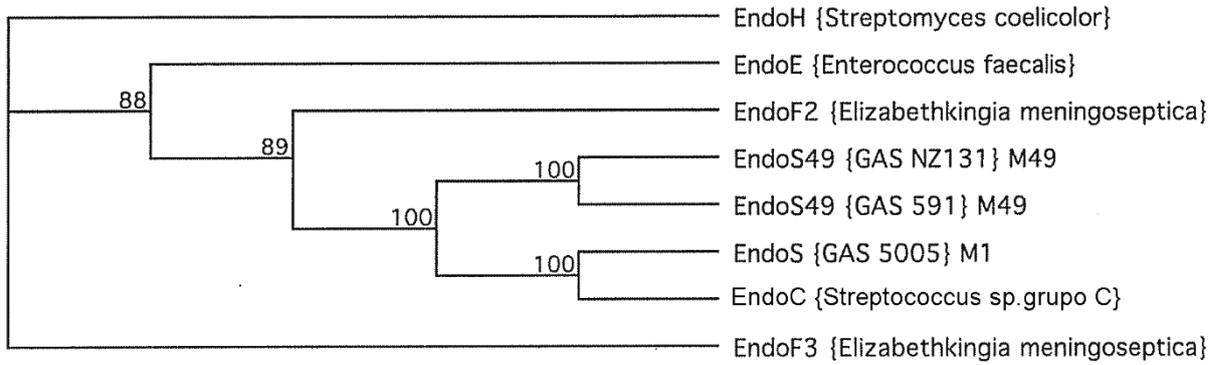


Figura 6.

