

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 728 290**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/395** (2006.01)

**C12N 9/24** (2006.01)

**C07K 16/32** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.01.2013 PCT/GB2013/050164**

87 Fecha y número de publicación internacional: **01.08.2013 WO13110946**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.01.2013 E 13701871 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.03.2019 EP 2806892**

54 Título: **Uso terapéutico combinado de anticuerpos y endoglucosidasas**

30 Prioridad:

**26.01.2012 GB 201201314**

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

**23.10.2019**

73 Titular/es:

**IMMAGO BIOSYSTEMS LTD (100.0%)  
Teme Place, Teme Road  
Cheltenham GL52 6UE, GB**

72 Inventor/es:

**CRISPIN, MATTHEW DAVID MAX y  
SCANLAN, CHRISTOPHER NEIL**

74 Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

ES 2 728 290 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Uso terapéutico combinado de anticuerpos y endoglucosidasas

- 5 La invención se refiere a composiciones para su uso en métodos de tratamiento de enfermedades, en donde los métodos aumentan la potencia de los anticuerpos terapéuticos.

10 Históricamente, el objetivo original del uso de anticuerpos, particularmente anticuerpos monoclonales, para el tratamiento de enfermedades como el cáncer era como "balas mágicas" para buscar y destruir las células cancerosas en el cuerpo.

15 Se pueden utilizar anticuerpos para reclutar el sistema inmunitario para dianas particulares dentro del cuerpo. Los anticuerpos reclutan el sistema inmunitario celular a través de la interacción del dominio del fragmento de anticuerpo cristalizante (Fc) con los receptores Fc (FcR) expresados en la superficie de las células inmunitarias. La interacción entre el dominio Fc de un anticuerpo terapéutico y un FcR es importante en una gama de terapias de anticuerpos en desarrollo que incluyen: anticuerpos anticancerígenos, anticuerpos antiinflamatorios, anticuerpos antipatógenos y anticuerpos para el tratamiento de la autoinmunidad.

20 En dichas terapias, los anticuerpos son específicos para los antígenos diana a través de la especificidad de los dominios Fab. Estos anticuerpos suelen ser de la clase de inmunoglobulina G (IgG): IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. Estos anticuerpos se unen a los FcR humanos: FcγRI, RγIIa, RγIIb, RγIIIa y FcγRn, y al receptor Fc del complemento C1q. La eficacia del reclutamiento del sistema inmunitario celular mediante las moléculas de IgG está influenciada por la afinidad del Fc a los FcR. Por lo tanto, se han desarrollado variantes de Fc de IgG que exhiben unión modulada a FcR. Estas variantes de Fc de IgG tienen cambios introducidos en el componente de proteína y/o carbohidrato del dominio Fc para cambiar la afinidad a uno o más FcR y pueden mostrar afinidad reducida o incrementada a uno o más FcR. Esta modulación en la afinidad del receptor permite el reclutamiento de un intervalo particular de componentes inmunitarios celulares y humorales con un perfil proinflamatorio o antiinflamatorio particular. Se han descubierto muchos antígenos que se expresan de forma selectiva o única en determinados tipos de cáncer, pero en general los intentos de utilizar anticuerpos no modificados para destruir las células cancerosas solo han tenido un éxito moderado. El problema al utilizar anticuerpos "simples" no marcados ha sido que las células cancerosas, como otras células hospedadoras, están protegidas contra la lisis mediada por el complemento, mediante la expresión de inhibidores de la fijación del complemento (tal como el factor de aceleración de la descomposición, DAF (de sus siglas en inglés)) en la superficie celular. Asimismo, la concentración o abundancia de antígenos del cáncer en la superficie de las células es a veces muy baja, e insuficiente para soportar la destrucción mediante mecanismos efectores dirigidos por anticuerpos, como la ADCC y la fijación del complemento.

35 Como resultado de estos problemas de baja abundancia del antígenos de cáncer en la superficie de las células, se han desarrollado productos de anticuerpos monoclonales para destruir las células cancerosas que reconocen los antígenos específicos de tejidos o linajes que abundan en las células cancerosas, pero también están presentes en las células hospedadoras, que comprometen la ventaja de "especificidad" de los anticuerpos específicos contra el cáncer dirigidos a antígenos específicos del cáncer. Los ejemplos incluyen Rituxan (anti-CD20) para el linfoma no Hodgkin (el CD20 también se expresa en linfocitos B normales), así como Yermoy para el melanoma metastásico (que reconoce CTLA4, también expresado en linfocitos T normales).

45 Debido a estos problemas encontrados al desarrollar el concepto original de "bala mágica" (de anticuerpos no marcados capaces de destruir selectivamente solo células cancerosas), se han desarrollado estrategias adicionales que explotan la especificidad que se puede obtener con los anticuerpos monoclonales para los factores de crecimiento (por ejemplo, VEGF, que es reconocido por Avastin) o receptores del factor de crecimiento (por ejemplo, Her2, que es reconocido por Herceptin) que son importantes para el crecimiento de células cancerosas. Sin embargo, en el caso de VEGF, cumple funciones fisiológicas importantes que también son neutralizadas por Avastin, eliminando hasta cierto punto la ventaja teórica de los anticuerpos que reconocen los antígenos específicos del cáncer y destruyen las células que los contienen, sin destruir las células sanas.

55 Además del tratamiento del cáncer, los anticuerpos monoclonales se pueden utilizar para el tratamiento de infecciones víricas, por lo que los antígenos de las células hospedadoras presentados de forma anormal o elevada y/o los antígenos codificados por el virus son atacados por el monoclonal. La eliminación del patógeno ocurre a través de mecanismos dependientes de FcR similares. Por ejemplo, el bavituximab se dirige a la presentación anormal de la fosfatidilserina en la capa externa de la membrana plasmática de las células infectadas.

60 Se han adoptado una serie de otros enfoques para mejorar las propiedades de los anticuerpos.

Un enfoque es entrecruzar directamente un antígeno con un FcR utilizando un anticuerpo biespecífico. Se han descrito enfoques similares utilizando formatos libres de Fc: por ejemplo, fragmentos Fv de presentación múltiple que reúnen dos proteínas diana juntas.

65 Como se ha mencionado anteriormente, un enfoque cada vez más habitual para aumentar la actividad citotóxica es

conjugar toxinas directamente con el Fc o a la molécula similar al anticuerpo.

Un método para la mejora de la unión de Fc de IgG a FcγR ha sido la fabricación de IgG con regiones Fc mutadas. Las mutaciones, notablemente en la punta de los dominios Cγ2 que forman la superficie de unión al receptor o aquellas proximales a la superficie de unión al receptor, pueden llevar a un aumento de las interacciones con los FcR. Por ejemplo, Shields *et al.*, introdujeron mutaciones en el Fc y generaron la unión al receptor Fc alterado (Shields et al, J Biol Chem. 2 de marzo de 2001;276(9):6591-604).

Un método adicional para la mejora de la unión de Fc de IgG a FcγRIIIa ha sido la fabricación de Fc de IgG que carece de fucosa alfa 1-6 en la *N*-acetilglucosamina (GlcNAc) unida a Asn297 (denominada fucosa "central"). La presencia de fucosa en esa posición disminuye la afinidad con FcγRIIIa mediante el choque con el polisacárido de FcγRIIIa en Asn162. La eliminación de la fucosa elimina este choque estérico y aumenta la afinidad con FcγRIIIa.

Si bien los anticuerpos diseñados por ingeniería genética para mostrar una unión mejorada a FcR logran cierta mejora en el reclutamiento de células inmunitarias celulares, estos métodos están limitados intrínsecamente por la disponibilidad de los receptores no unidos. En condiciones fisiológicas, la mayoría de los FcγR celulares activadores se unen a Fc como resultado de una concentración de anticuerpo sérico en un exceso significativo de la constante de disociación para las interacciones Fc:FcR (Preithner, S., Elm, S., Lippold, S., Locher, M., Wolf, A., da Silva, A. J., Baeuerle, P. A. & Prang, N. S. (2006). *Mol Immunol* 43, 1183-93; Bruhns, P., Iannascoli, B., England, P., Mancardi, D. A., Fernandez, N., Jorieux, S. & Daeron, M. (2009). *Blood* 113, 3716-25.). La activación de los FcγR celulares depende, por lo tanto, del desplazamiento de un anticuerpo irrelevante (IgG en suero en masa) antes de la unión de IgG presentada por complejos inmunitarios o antígenos polivalentes.

El diseño por ingeniería genética de uno o ambos componentes de hidrato de carbono o proteína del Fc puede ayudar a superar el efecto competitivo de la IgG en suero para antígenos expresados en niveles altos en la superficie celular, y los epítomos de baja afinidad o baja copia en células infectadas o cancerosas están protegidos en gran medida contra de la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) mediante IgG en suero.

Nandakumar et al (2008) *Trends in Immunology* 29:4 p173-178 se refiere a la escisión terapéutica de IgG y nuevas vías para tratar la inflamación.

El documento WO2008/071418 A2 se refiere al uso de un polipéptido EndoS.

El documento WO2009/033670 A2 se refiere a métodos y kits para la disociación de complejos Fcγ-receptor-IgG y a métodos y kits para el aislamiento de IgG y Fc y fragmentos Fab de IgG.

Todavía existe la necesidad, sin embargo, de desarrollar nuevos métodos para mejorar o favorecer la interacción entre el dominio Fc de anticuerpos terapéuticos y los FcγR.

Si bien actualmente existen enzimas que son capaces de modificar la IgG y reducir su unión a FcR, estas enzimas tienen la desventaja de que conducen a una unión disminuida de todos los anticuerpos a los FcγR (ambos anticuerpos séricos en masa y, además, cualquier anticuerpo terapéutico introducido si también están presentes en el suero). Por lo tanto, si bien estas enzimas pueden ser útiles en los casos en que el anticuerpo sérico es en sí mismo responsable de la patología, no mejoran o favorecen la interacción entre los anticuerpos terapéuticos introducidos y los FcγR (porque la enzima afectaría a dichos anticuerpos terapéuticos de la misma manera que la IgG en suero). Por lo tanto, hasta la fecha, estas enzimas modificadoras de IgG solo se han utilizado terapéuticamente para el tratamiento de trastornos autoinmunitarios provocados por un autoanticuerpo de suero endógeno (Albert H, Collin M, Dudziak D, Ravetch JV, Nimmerjahn F. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 30 de septiembre de 2008;105(39):15005-9.).

Ahora se ha desarrollado un nuevo enfoque para mejorar el poder destructor de los anticuerpos que se pueden aplicar a antígenos específicos de tumores que se expresan de forma selectiva en células cancerosas y otras células. También se puede aplicar a estrategias de anticuerpos para neutralizar los factores de crecimiento esenciales al mejorar la eliminación mediada por el receptor Fc de dichos factores de crecimiento.

En particular, los inventores ahora han reconocido que, para lograr la eliminación enzimática selectiva de la IgG en suero pero no de cualquier anticuerpo terapéutico coadministrado, las dos poblaciones de anticuerpos necesitarían exhibir sensibilidades diferenciales a la enzima o la enzima y los anticuerpos terapéuticos hay que mantenerlos separados espacial o temporalmente.

La presente invención muestra cómo la sensibilidad diferencial a los agentes modificadores de IgG, y las enzimas en particular, se puede lograr para permitir la eliminación de anticuerpos séricos pero no de IgG modificada por ingeniería genética.

Se ha demostrado que la unión de la IgG sérica en masa a los FcR se puede reducir al mismo tiempo que mejora la unión funcional a los FcR de un anticuerpo terapéutico que puede introducirse de forma exógena. Este control se puede lograr mediante la introducción de un agente que sea capaz de reducir o eliminar las propiedades de unión a

FcR de la IgG sérica, junto con un anticuerpo terapéutico que sea resistente a dicha actividad del agente. Específicamente, esto se aplica a la administración de un agente degradante de Fc con un anticuerpo terapéutico con un Fc diseñado por ingeniería genética o elegido para ser resistente al agente degradante de Fc.

5 También se demuestra que la inhibición de la unión de FcR por los agentes que reducen o eliminan la unión de Fc en suero mejorará la unión de FcR de un anticuerpo terapéutico resistente a dicho agente. En particular, se muestra en el presente documento que la desglucosilación de la IgG sérica competitiva tiene un efecto relativamente modesto sobre la afinidad aparente de la IgG sérica por FcγR. Se esperaría que esto correspondiera a un aumento equivalentemente moderado en la afinidad por un anticuerpo no afectado. Sin embargo, los datos de los inventores  
10 muestran que una disminución de aproximadamente 10 veces en la afinidad de FcγR en suero conduce sorprendentemente a un aumento de aproximadamente 1000 veces en la eficacia del anticuerpo monoclonal. Se cree que tal mejora en la unión de FcR conducirá a un reclutamiento mejorado de las funciones inmunitarias celulares dirigidas por los anticuerpos terapéuticos. Estas funciones inmunitarias celulares pueden ser proinflamatorias o antiinflamatorias según la variante de Fc en particular.

15 Por consiguiente, la presente invención proporciona un agente que reduce la unión al receptor Fc mediante degradación enzimática de anticuerpos séricos endógenos para su uso en un método para tratar una enfermedad, en donde el agente es una endoglucosidasa, una proteasa o una proteína N-glucanasa y el método aumenta la potencia terapéutica de un anticuerpo, en donde el modo de acción de dicho anticuerpo se basa en la interacción Fc:FcR, y en donde el método comprende las etapas:

- (a) administrar dicho agente a un sujeto; y posteriormente,
- (b) después de un intervalo de tiempo establecido, administrar dicho anticuerpo al sujeto.

25 En el presente documento se desvela una composición que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz del agente y el anticuerpo.

En el presente documento también se desvela una composición farmacéutica que comprende además un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.

30 Preferentemente, el (i) agente que reduce la unión al receptor Fc mediante degradación enzimática de anticuerpos séricos endógenos y (ii) el anticuerpo, preferentemente que es resistente al agente, se utilizan en un método para tratar el cáncer, una infección y/o la autoinmunidad. Preferentemente, el (i) agente que reduce la unión al receptor Fc mediante degradación enzimática de anticuerpos séricos endógenos y (ii) el anticuerpo, preferentemente que es  
35 resistente al agente, se utiliza en un método para tratar el cáncer.

La invención permite utilizar dosis más bajas del anticuerpo terapéutico y/o reducir los efectos secundarios del anticuerpo terapéutico.

40 El intervalo de tiempo establecido proporciona tiempo para que el agente actúe sobre los anticuerpos séricos endógenos dentro del sujeto para reducir la unión al receptor Fc. Preferentemente, la cantidad de agente administrado y el intervalo de tiempo son suficientes para reducir la unión al receptor Fc por anticuerpos séricos endógenos en el sujeto por debajo del 50 % de los niveles iniciales de unión al receptor Fc (es decir, por debajo del 50 % de los niveles  
45 unión al receptor Fc por anticuerpos séricos endógenos antes del tratamiento con el agente). Más preferentemente, la cantidad de agente administrado y el intervalo de tiempo es suficiente para reducir los niveles de unión al receptor Fc de los anticuerpos séricos en el sujeto por debajo del 40 %, 30 %, 20 % o 10 % de los niveles iniciales en ese paciente. El agente puede administrarse en un solo punto de tiempo o durante un tiempo establecido.

El intervalo de tiempo podría, por ejemplo, ser 1-2, 1-5, 1-10 o 1-20 días. La cantidad de agente puede ser de 0,1 mg/Kg, 1 mg/Kg o 10 mg/Kg. Por ejemplo, se pueden utilizar 1-50 mg de EndoS, preferentemente 10-20 mg de EndoS, más preferentemente aproximadamente 20 mg de EndoS. EndoS tiene una semivida de menos de 12 horas *in vivo*. En los casos en que el agente es EndoS, el intervalo de tiempo puede ser, por lo tanto, de 1-5, más preferentemente de 3-4 días.

55 En otras realizaciones más, el método comprende las etapas:

- (a) tratar la sangre del sujeto *ex vivo* con el agente;
- (b) devolver la sangre al sujeto; y posteriormente
- (c) administrar dicho anticuerpo al sujeto.

60 El agente que reduce la unión al receptor Fc de los anticuerpos séricos endógenos es un agente que interrumpe la interacción Fc:FcR mediante la degradación enzimática de los anticuerpos séricos.

65 El agente es una proteasa, una endoglucosidasa o una proteína N-glucanasa. Preferentemente, el agente escinde los anticuerpos séricos en la región Fc evitando o reduciendo la unión al receptor Fc.

Preferentemente, el agente es una endoglucosidasa. Preferentemente, la endoglucosidasa es específica para los tipos de polisacáridos encontrados en el Fc de la IgG de suero natural. Preferentemente, la endoglucosidasa es endoglucosidasa S, F3 o Ebeta. Preferentemente, la endoglucosidasa es endoglucosidasa S (EndoS). Preferentemente, la endoglucosidasa es endoglucosidasa F3. Preferentemente, la endoglucosidasa es endoglucosidasa Ebeta.

En una realización preferida, el agente es la endoglucosidasa, EndoS. Los inventores han encontrado sorprendentemente que EndoS es capaz de mejorar la unión de FcγR y, por lo tanto, puede actuar como un agente inmunoactivador para eliminar selectivamente la unión de FcγR al anticuerpo sérico en masa y no la unión de FcγR a un anticuerpo terapéutico de interés que está diseñado por ingeniería para ser resistente a EndoS.

El agente que reduce la unión al receptor Fc mediante degradación enzimática de anticuerpos séricos endógenos puede ser una proteasa. Preferentemente la proteasa es IdeS.

El anticuerpo terapéutico puede ser un anticuerpo monoclonal humano, o anticuerpo recombinante, o uno o más fragmentos del mismo. Si el anticuerpo es un anticuerpo recombinante puede ser humanizado. Como alternativa, el anticuerpo terapéutico puede ser un anticuerpo policlonal. El anticuerpo terapéutico debe ser uno que comprenda un dominio Fc.

El dominio Fc del anticuerpo terapéutico resistente a la actividad del agente puede comprender una o más glucoformas resistentes a la actividad del agente. La glucoforma puede ser una glucoforma de tipo oligomanosa. Preferentemente, la glucoforma de tipo oligomanosa comprende Man<sub>5</sub>GlcNAc<sub>2</sub>, Man<sub>8</sub>GlcNAc<sub>2</sub> o Man<sub>9</sub>GlcNAc<sub>2</sub> en el dominio Fc. Preferentemente, la glucoforma de tipo oligomanosa es una mezcla de polisacáridos de tipo oligomanosa. Preferentemente, la glucoforma de tipo oligomanosa es un polisacárido de tipo oligomanosa o polisacárido de tipo oligomanosa 'de tipo levadura' que contiene entre 5 y 20 restos de manosa en cada uno de los polisacáridos del dominio Fc. Más preferentemente, el polisacárido de tipo oligomanosa o el polisacárido de tipo oligomanosa de tipo levadura contiene 5 manosas, o 6 manosas, o 7 manosas, u 8 manosas, o 9 manosas, o 10 manosas, u 11 manosas, o 12 manosas, o 13 manosas, o 14 manosas, o 15 manosas, o 16 manosas, o 17 manosas, o 18 manosas, o 19 manosas o 20 manosas en cada uno de los polisacáridos del dominio Fc. Preferentemente, el polisacárido de tipo oligomanosa o el polisacárido de tipo oligomanosa de tipo levadura contiene al menos 5 restos de manosa en cada uno de los polisacáridos del dominio Fc. Más preferentemente, el polisacárido de tipo oligomanosa o el polisacárido de tipo oligomanosa de tipo levadura no contienen más de 15 restos de manosa en cada uno de los polisacáridos del dominio Fc. Preferentemente, el polisacárido de tipo oligomanosa o el polisacárido de tipo oligomanosa 'de tipo levadura' contiene solo dos restos de GlcNAc y tres o más restos de manosa en cada uno de los polisacáridos del dominio Fc.

La glucoforma puede contener alternativamente una "N-acetilglucosamina bisectada" (GlcNAc bisectada). Preferentemente, la N-acetilglucosamina bisectada es N-acetilglucosamina b1-4 unida a un resto de beta-manosa. Más preferentemente, la glucoforma contiene al menos un resto de beta-N-acetilglucosamina 1-4 unido a un resto de beta-manosa en cada uno de los polisacáridos del dominio Fc. Preferentemente, la glucoforma contiene dos resto de beta-N-acetilglucosamina 1-4 unido a un resto de beta-manosa en cada uno de los polisacáridos del dominio Fc.

La glucoforma puede contener ácido siálico. Más preferentemente, la glucoforma contiene ácido alfa 2-6-siálico unido a galactosa. Preferentemente, la glucoforma contiene uno o dos restos de ácido siálico unidos a cada uno de los dos polisacáridos del dominio Fc.

La glucoforma puede ser de tipo híbrido. Preferentemente, el tipo híbrido es Man<sub>5</sub>GlcNAc<sub>2</sub> modificado con restos de tipo complejo adicionales en el brazo 3 del núcleo de trimanosilo. Preferentemente, la glucoforma de tipo híbrido contiene N-acetilglucosamina b1-4 unida a un resto de beta-manosa (GlcNAc bisectada).

En una realización alternativa, el anticuerpo puede diseñarse para ser aglucosilado, es decir, no hay grupos polisacáridos en los dominios Fc, mientras que aún es competente para la unión al receptor Fc como se describe en (Sazinsky et al. PNAS 23 de diciembre 2008:105(51):20167-20172).

Preferentemente, un anticuerpo terapéutico resistente a la actividad endoglucosidasa del agente comprende una o más glucoformas resistentes a la actividad endoglucosidasa del agente. La glucoforma puede ser una glucoforma de tipo oligomanosa. Preferentemente, la glucoforma de tipo oligomanosa comprende Man<sub>5</sub>GlcNAc<sub>2</sub>, Man<sub>8</sub>GlcNAc<sub>2</sub> o Man<sub>9</sub>GlcNAc<sub>2</sub> en el dominio Fc. La glucoforma puede ser alternativamente una "N-acetilglucosamina bisectada". La glucoforma puede contener ácido siálico. La glucoforma puede contener ácido siálico alfa 2-6 unida a galactosa.

Un anticuerpo terapéutico resistente a la actividad endoglucosidasa de EndoS puede comprender una o más glucoformas resistentes a la actividad endoglucosidasa de EndoS. Preferentemente, la glucoforma es una glucoforma de tipo oligomanosa. Preferentemente, la glucoforma de tipo oligomanosa comprende Man<sub>5</sub>GlcNAc<sub>2</sub>, Man<sub>8</sub>GlcNAc<sub>2</sub> o Man<sub>9</sub>GlcNAc<sub>2</sub> en el dominio Fc. La glucoforma puede contener alternativamente una "N-acetilglucosamina bisectada". La glucoforma puede contener ácido siálico. La glucoforma puede contener ácido siálico alfa 2-6 unida a galactosa.

Preferentemente, un anticuerpo terapéutico resistente a la actividad endoglucosidasa de EndoF3 comprende una o más glucoformas resistentes a la actividad endoglucosidasa de EndoF3. Preferentemente, la glucoforma es una glucoforma de tipo oligomanosa. Preferentemente, la glucoforma de tipo oligomanosa es  $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ ,  $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$  o  $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ . La glucoforma puede ser alternativamente una "N-acetilglucosamina bisectada". La glucoforma puede  
5 contener ácido siálico. La glucoforma puede contener ácido siálico alfa 2-6 unida a galactosa.

En otras realizaciones de la invención, el anticuerpo terapéutico es uno que no es resistente al agente como se define en el presente documento, por ejemplo, el anticuerpo terapéutico no es resistente a (es decir, es sensible a) un agente (por ejemplo, EndoS o IdeS) que reduce la unión al receptor Fc de los anticuerpos séricos endógenos.  
10

En una realización preferida, EndoS, que reduce la unión al receptor Fc de anticuerpos séricos endógenos y un anticuerpo terapéutico, preferentemente un anticuerpo terapéutico que es resistente a la actividad endoglucosidasa de EndoS, se utiliza para tratar el cáncer.

En otra realización preferida, EndoS, que reduce la unión al receptor Fc de anticuerpos séricos endógenos y una glucoforma de un anticuerpo terapéutico resistente a la actividad endoglucosidasa de EndoS, se utiliza para tratar el cáncer, una infección y/o la autoinmunidad. Preferentemente, EndoS, que reduce la unión al receptor Fc de anticuerpos séricos endógenos y una glucoforma de un anticuerpo resistente a la actividad endoglucosidasa de EndoS, se utiliza para tratar el cáncer.  
15 20

En el presente documento se desvela un producto que contiene EndoS que reduce la unión al receptor Fc de los anticuerpos séricos endógenos y un anticuerpo terapéutico, preferentemente un anticuerpo terapéutico que es resistente a la actividad endoglucosidasa de EndoS, como una preparación combinada para su uso simultáneo, separado o secuencial en un método para tratar el cáncer, una infección y/o la autoinmunidad. Preferentemente, la preparación combinada es para su uso en un método para tratar el cáncer.  
25

En el presente documento también se desvela un producto que contiene EndoS que reduce la unión al receptor Fc de anticuerpos séricos endógenos y una glucoforma de un anticuerpo terapéutico resistente a la actividad endoglucosidasa de EndoS como una preparación combinada para uso simultáneo, separado o secuencial en un método para tratar el cáncer, una infección y/o la autoinmunidad. Preferentemente, la preparación combinada es para su uso en el tratamiento del cáncer.  
30

En algunas realizaciones, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en Leucemia linfoblástica aguda, Leucemia mielóide aguda, Carcinoma adrenocortical, Cánceres relacionados con SIDA, Linfoma relacionado con SIDA, Cáncer de ano, Cáncer de apéndice, Astrocitoma, cerebelar o cerebral de la infancia, Carcinoma de células basales, Cáncer del conducto biliar, extrahepático, Cáncer de vejiga, Cáncer óseo, Osteosarcoma/histiocitoma fibroso maligno, Glioma del tronco encefálico, Cáncer de cerebro, Tumor cerebral, astrocitoma cerebeloso, Tumor cerebral, astrocitoma cerebral/glioma maligno, Tumor cerebral, ependimoma, Tumor cerebral, meduloblastoma, Tumor cerebral, tumores neuroectodérmicos primitivos supratentoriales, Tumor cerebral, glioma de la vía óptica e hipotalámico, Cáncer de mama, Adenomas bronquiales/carcinoides, Linfoma de Burkitt, Tumores carcinoides, Tumores carcinoides, gastrointestinal, Carcinoma de sitio primario desconocido, Linfoma del sistema nervioso central, Astrocitoma cerebeloso, Astrocitoma cerebral/Glioma maligno, Cáncer de cuello uterino, Leucemia linfocítica crónica, Leucemia mielógena crónica, Trastornos mieloproliferativos crónicos, Cáncer de colon, Linfoma cutáneo de linfocitos T, Tumor desmoplásico de células redondas pequeñas, Cáncer endometrial, Ependimoma, Cáncer de esófago, Sarcoma de Ewing en la familia de tumores Ewing, Tumor de células germinales extracraneales, infantil, Tumor de células germinales extragonadales, Cáncer del conducto biliar extrahepático, Cáncer ocular, Melanoma intraocular, Cáncer ocular, Retinoblastoma, Cáncer de vesícula biliar, Cáncer gástrico (estómago), Tumor carcinoide gastrointestinal, Tumor del estroma gastrointestinal (GIST), Tumor de células germinales: extracraneal, extragonadal u ovárico, Tumor trofoblástico gestacional, Glioma del tronco encefálico, Glioma, Astrocitoma cerebral infantil, Glioma, de Vía óptica e Hipotalámica Infantil, Carcinoide gástrico, Tricoleucemia, Cáncer de cabeza y cuello, Cáncer cardíaco, Cáncer hepatocelular (hígado), Linfoma de Hodgkin, Cáncer hipofaríngeo, Glioma hipotalámico y de la vía óptica, Melanoma intraocular, Carcinoma de células de islote (páncreas), sarcoma de Kaposi, Cáncer renal (cáncer de células renales), Cáncer de laringe, Leucemias, Leucemia, linfoblástica aguda (también llamada leucemia linfocítica aguda), Leucemia, mielóide aguda (también llamada leucemia mielógena aguda), Leucemia, linfocítica crónica (también llamada leucemia linfocítica crónica), Leucemia, mielógena crónica (también llamada leucemia mielóide crónica), Leucemia, células pilosas, Cáncer de labio y de la cavidad oral, Liposarcoma, Cáncer de hígado (Primario), Cáncer de pulmón, Cáncer de pulmón no microcítico, microcítico, Linfomas, Linfoma, relacionado con SIDA, Linfoma, de Burkitt, Linfoma, cutáneo de linfocitos T, Linfoma, de Hodgkin, Linfomas, No-Hodgkinianos (una antigua clasificación de todos los linfomas excepto los de Hodgkin), Linfoma, Sistema nervioso central primario, Macroglobulinemia, de Waldenström, Histiocitoma fibroso maligno de hueso/osteosarcoma, Meduloblastoma, Melanoma, Melanoma, Intraocular (ojo), Carcinoma de células de Merkel, Mesotelioma, Maligno del Adulto, Mesotelioma, Cáncer de cuello escamoso metastásico con tumor primario oculto, Cáncer de boca, Síndrome de neoplasia endocrina múltiple, mieloma múltiple/neoplasia de células plasmáticas, Micosis fungoides, Síndromes mielodisplásicos, Enfermedades Mielodisplásicas/Mieloproliferativas, Leucemia mielógena, crónica, leucemia mielóide, aguda de adulto, leucemia mielóide, aguda infantil, Mieloma, Múltiple (cáncer de Médula Ósea), Trastornos mieloproliferativos, Cáncer de la cavidad nasal y del seno paranasal, Carcinoma nasofaríngeo, Neuroblastoma, Linfoma no de Hodgkin, Cáncer no  
35 40 45 50 55 60 65

microcítico de pulmón, Cáncer oral, Cáncer orofaríngeo, Osteosarcoma/histiocitoma fibroso maligno de hueso, Cáncer de ovarios, Cáncer epitelial de ovarios (Tumor epitelial superficial-estromal), Tumor de células germinales ováricas, Tumor ovárico de bajo potencial maligno, Cáncer de páncreas, Cáncer de páncreas, Célula de los islotes, Cáncer del seno paranasal y de la cavidad nasal, Cáncer paratiroideo, Cáncer de pene, Cáncer faríngeo, Feocromocitoma, 5  
Astrocitoma pineal, Germinoma pineal, Pineoblastoma y tumores neuroectodérmicos primitivos supratentoriales, Adenoma pituitario, Neoplasia de células plasmáticas/Mieloma múltiple, Blastoma pleuropulmonar, Linfoma primario del sistema nervioso central, Cáncer de próstata, Cáncer de recto, Carcinoma de células renales (cáncer de riñón), de la pelvis renal y el uréter, cáncer de células de transición, Retinoblastoma, Rbdomiosarcoma, Cáncer de las glándulas salivales, Sarcoma, Familia de tumores de Ewing, Sarcoma de Kaposi, Sarcoma, tejidos blandos, Sarcoma, uterino, 10  
Síndrome de Sézary, Cáncer de piel (no melanoma), Cáncer de piel (melanoma), Carcinoma de piel, células de Merkel, Cáncer microcítico de pulmón, Cáncer del intestino delgado, Sarcoma de tejidos blandos, Carcinoma de células escamosas, Cáncer escamoso de cuello con primario oculto, metastásico, Cáncer de estómago, Tumores neuroectodérmicos primitivos supratentoriales, Linfoma de linfocitos T, cutáneo - véase Micosis fungoides y síndrome de Sézary, Cáncer de testículos, Cáncer de garganta, Timoma, Timoma y Carcinoma tímico, Cáncer de tiroides, 15  
Cáncer de tiroides, Cáncer de células transicionales de la pelvis renal y el uréter, Tumor trofoblástico, Cáncer de células transicionales de la pelvis renal y el uréter, Cáncer uretral, Cáncer de útero, endometrial, Sarcoma uterino, Cáncer de vagina, Glioma de la vía óptica e hipotalámico, Cáncer de vulva, Macroglobulinemia de Waldenström y tumor de Wilms (cáncer de riñón).

20 Preferentemente, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de vejiga, cáncer de pulmón, cáncer de mama, melanoma, cáncer de colon, cáncer rectal, linfoma no de Hodgkin, cáncer de endometrio, cáncer de páncreas, cáncer de riñón (células renales), cáncer de próstata, leucemia, cáncer de esófago o tiroides, preferentemente cáncer de mama.

25 En el presente documento también se desvela una composición farmacéutica para su uso en un método para tratar el cáncer, una infección y/o la autoinmunidad que comprende:

- (a) una cantidad terapéuticamente eficaz de EndoS que reduce la unión al receptor Fc de anticuerpos séricos endógenos; y
- 30 (b) una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo terapéutico, preferentemente un anticuerpo terapéutico que es resistente a la actividad endoglucosidasa de EndoS; y
- (c) un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.

35 En el presente documento también se desvela una composición farmacéutica para su uso en un método para tratar el cáncer, una infección y/o la autoinmunidad que comprende:

- (a) una cantidad terapéuticamente eficaz de EndoS que reduce la unión al receptor Fc de anticuerpos séricos endógenos; y
- 40 (b) una cantidad terapéuticamente eficaz de una glucoforma de tipo oligomanosa de un anticuerpo terapéutico resistente a la actividad endoglucosidasa de EndoS; y
- (c) un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.

45 Tal como se utiliza en el presente documento, el término "sujeto" se refiere preferentemente a un mamífero, muy preferentemente a un ser humano.

A menos que se defina de otro modo en el presente documento, los términos y frases científicos y técnicos utilizados en relación con la presente invención tendrán los significados habitualmente entendidos por los expertos en la materia. Además, a no ser que el contexto requiera otra cosa, los términos en singular incluirán el plural, y los términos en plural incluirán el singular. En general, las nomenclaturas utilizadas en relación con las técnicas de bioquímica, 50  
enzimología, biología molecular y celular, microbiología, genética y química e hibridación de proteínas y ácidos nucleicos descritas en el presente documento son aquellas bien conocidas y se utilizan habitualmente en la técnica. Los métodos y las técnicas de la presente invención, en general, se realizan de acuerdo con métodos convencionales bien conocidos en la técnica y como se describe en diversas referencias generales y más específicas que se citan y analizan a lo largo de la presente memoria descriptiva, a menos que se indique lo contrario. Véase, por ejemplo, 55  
Sambrook et al. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y. (1989); Ausubel *et al.*, *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates (1992, and Supplements to 2002); Harlow y Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y. (1990); Taylor y Drickamer, *Introduction to Glycobiology*, Oxford Univ. Press (2003); Worthington *Enzyme Manual*, Worthington Biochemical Corp., Freehold, N.J.; *Handbook of Biochemistry: Section A Proteins, Vol I*, 60  
CRC Press (1976); *Handbook of Biochemistry: Section A Proteins, Vol II*, CRC Press (1976); *Essentials of Glycobiology*, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1999); *Immunobiology*, Janeway et al., 6ª edición, 2004, Garland Publishing, Nueva York).

Los siguientes términos, salvo que se indique lo contrario, se entenderán como que tienen los siguientes significados: Tal como se utiliza en el presente documento, "un agente que reduce la unión al receptor Fc de los anticuerpos séricos 65  
endógenos" se refiere preferentemente a un agente que aumenta la constante de unión de equilibrio para la interacción IgG:FcyR en un factor de al menos dos. Preferentemente, el agente aumenta la constante de unión de equilibrio para

la interacción IgG:FcyR en un factor de al menos dos, o al menos 3, o al menos 4, o al menos 5, o al menos 6, o al menos 7 o al menos 8. Más preferentemente, el agente aumenta la constante de unión de equilibrio para la interacción IgG:FcyR en un factor de al menos ocho. Un aumento en la constante de unión de equilibrio representa una disminución en la unión entre IgG y un FcyR (por ejemplo, entre IgG y FcyRIIA).

Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "anticuerpos séricos endógenos" se refiere a las inmunoglobulinas gamma (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4) que están presentes en el tejido humano que se ha producido a partir de linfocitos B de un individuo o aquellas inmunoglobulinas gamma que ya están presentes antes de la administración de la terapia actual. En algunas realizaciones, la expresión "anticuerpos séricos endógenos" se refiere a anticuerpos séricos endógenos glucosilados.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término 'FcyR' se refiere a los receptores de inmunoglobulina gamma Fc que están presentes en las células humanas. En los seres humanos, FcyR se refiere a una, algunas o toda la familia de receptores que comprenden FcyRI (CD64), FcyRIIA (CD32), FcyRIIB (CD32), FcyRIIIA (CD16a) y FcyRIIIB (CD16b). Tal como se utiliza en el presente documento, el término 'FcyR' incluye polimorfismos de origen natural de FcyRI (CD64), FcyRIIA (CD32), FcyRIIB (CD32), FcyRIIIA (CD16a) y FcyRIIIB (CD16b).

Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "anticuerpos de glucoforma de tipo oligomanosa" se refiere a los anticuerpos que contienen polisacáridos unidos a N en sus regiones Fc, que se componen solo de restos de GlcNAc y restos de manosa.

Tal como se utiliza en el presente documento, los términos "*N*-polisacárido" y "polisacárido" se utilizan de manera intercambiable y se refieren a un oligosacárido unido a *N*, por ejemplo, uno que está o estuvo unido por un resto de *N*-acetilglucosamina unido al nitrógeno amida de un resto de asparagina en una proteína. El término "glucoforma" se refiere a una glucoproteína que contiene uno o más tipos de estructuras de polisacárido en el dominio Fc. Los azúcares predominantes que se encuentran en las glucoproteínas son la glucosa, galactosa, manosa, fucosa, *N*-acetilgalactosamina (GalNAc), *N*-acetilglucosamina (GlcNAc) y ácido siálico (por ejemplo, ácido *N*-acetilneuráminico (NANA)). El procesamiento de los grupos de azúcar se produce cotranslacionalmente en el lumen del RE y continúa en el aparato de Golgi para las glucoproteínas unidas a *N*.

Los *N*-polisacáridos tienen un núcleo de pentasacárido habitual de Man<sub>3</sub>GlcNAc<sub>2</sub> ('Man' se refiere a manosa; 'Glc' se refiere a glucosa y 'NAc' se refiere a *N*-acetil; GlcNAc se refiere a *N*-acetilglucosamina). Los *N*-polisacáridos difieren con respecto al número de ramificaciones (antenas) que comprenden azúcares periféricos (por ejemplo, GlcNAc, galactosa, fucosa y ácido siálico) que se agregan a la estructura central de Man<sub>3</sub>GlcNAc<sub>2</sub> ('Man<sub>3</sub>'), que también se conoce como el 'núcleo de trimanosa', el 'núcleo pentasacárido' o el 'núcleo de paucimanosa'. Los *N*-polisacáridos se clasifican de acuerdo con sus constituyentes ramificados (por ejemplo, tipo alta manosa, tipo complejo o tipo híbrido). El término "alta manosa" y "de tipo oligomanosa" se utilizan indistintamente. Un *N*-polisacárido tipo 'alta manosa' tiene cinco o más restos de manosa. Un tipo de *N*-polisacárido "complejo" normalmente tiene al menos una GlcNAc unida al brazo de 1, 3 manosa y al menos una GlcNAc unida al brazo de 1, 6 manosa de un núcleo de "trimanosa". Los *N*-polisacáridos de tipo complejo también pueden tener restos de galactosa ('Gal') o *N*-acetilgalactosamina ('GalNAc') que se modifican opcionalmente con ácido siálico o derivados (por ejemplo, 'NANA' o 'NeuNAc' donde 'Neu' se refiere al ácido neuráminico y 'NAc' se refiere a *N*-acetil). Los *N*-polisacáridos complejos también pueden tener sustituciones dentro de la misma cadena que comprenden, pero no se limitan a, GlcNAc 'bisectadas' y núcleo de fucosa ('fuc'). Los *N*-polisacáridos complejos también pueden tener múltiples antenas en el 'núcleo de trimanosa', a menudo denominados como 'polisacáridos de múltiples antenas'. Un *N*-polisacárido de tipo 'híbrido' tiene al menos una GlcNAc en el extremo del brazo de 1,3 manosa del núcleo de trimanosa y dos o más manosas en el brazo de 1,6 manosa del núcleo de trimanosa. Los *N*-polisacáridos de tipo híbrido también pueden tener sustituciones dentro de la misma cadena que comprenden, pero no se limitan a, GlcNAc 'bisectadas' y núcleo de fucosa ('fuc'). Los *N*-polisacáridos complejos también pueden tener múltiples antenas en el 'núcleo de trimanosa', a menudo denominados como "polisacáridos de múltiples antenas". Las moléculas de glucoproteínas con una cadena polipeptídica habitual pero que tienen diferentes polisacáridos se denominan "glucoformas" (Introduction to Glycobiology por ME Taylor y K Drickamer (OUP, 2011). ISBN 978-0-19-956911-3.). Los términos polisacáridos "tipo oligomanosa", "tipo híbrido" y "tipo complejo" están establecidos y se refieren a las principales categorías de estructuras de polisacárido y también se pueden utilizar para describir glucoformas que contienen esas categorías de polisacáridos (Molecular and Cellular Glycobiology editado por Minoru Fukada y Ole Hindsgaul (OUP, 2000) ISBN 0 19 963807 1. Functional and Molecular Glycobiology por SA Brooks, MV Dwek y U Schumacher (BIOS Scientific Publishers Ltd, 2002) ISBN 1 85996 022 7. Introduction to Glycobiology por ME Taylor y K Drickamer (OUP, 2011). ISBN 978-0-19-956911-3.)

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "*N*-acetilglucosamina bisectada" (GlcNAc bisectada) se refiere a un resto de β-GlcNAc unido a la β-manosa del núcleo de trimanosilo. La GlcNAc bisectada se puede unir enzimáticamente al núcleo de trimanosilo mediante una enzima (1,4-*N*-acetilglucosaminiltransferasa III (GnTIII)). Las células CHO normalmente no expresan GnTIII (Stanley et al. J. Biol. Chem. 261:13370-13378 (1984)), pero pueden diseñarse para hacerlo (Umana et al. Nature Biotech 17:176-180 (1999)).

Las abreviaturas utilizadas en el presente documento son de uso habitual en la técnica, véase, por ejemplo, abreviaturas de azúcares, arriba. Otras abreviaturas habituales incluyen 'PNGasa' o 'glucanasa' que se refieren al

péptido *N*-glucosidasa F (EC 3.2.2.18). Otras abreviaturas habituales incluyen "glucosidasa", que puede referirse a una endoglucosidasa o una exoglucosidasa.

5 EndoS es una endoglucosidasa secretada por el patógeno humano *Streptococcus pyogenes*. EndoS hidroliza específicamente el polisacárido unido a asparagina en IgG entre los dos restos de GlcNAc del núcleo. El polipéptido EndoS es preferentemente EndoS de *S. pyogenes*, o una variante o fragmento de EndoS de *S. pyogenes* que retiene la actividad endoglucosidasa de IgG. La variante puede ser un polipéptido EndoS de otro organismo, tal como otra bacteria. La bacteria es preferentemente un *Streptococcus*, tal como *Streptococcus equi*, *Streptococcus zooepidemicus*, o preferentemente, *Streptococcus pyogenes*. Como alternativa, la variante puede ser de  
10 *Corynebacterium pseudotuberculosis*, por ejemplo, la proteína CP40; *Enterococcus faecalis*, por ejemplo, la proteína EndoE; o *Elizabethkingia meningoseptica* (antes *Flavobacterium meningosepticum*), por ejemplo, la EndoF<sub>2</sub> de *Elizabethkingia meningoseptic* y CP40 de *Corynebacterium pseudotuberculosis*.

15 En una realización, el polipéptido EndoS puede comprender:

- (a) la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1;
- (b) una variante de la misma que tiene al menos el 50 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 y que tiene actividad endoglucosidasa de IgG; o
- (c) un fragmento de (a) o (b) que tiene actividad endoglucosidasa de IgG.

20 Preferentemente, el polipéptido EndoS comprende, o consiste en, la secuencia de la SEQ ID NO: 1. La SEQ ID NO: 1 es la secuencia de la forma madura de EndoS, sin la secuencia de señal y corresponde a los aminoácidos 37 a 995 de la SEQ ID NO: 2.

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

- (a) la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2;
- (b) una variante de la misma que tiene al menos el 50 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 y que tiene actividad endoglucosidasa de IgG; o
- (c) un fragmento de (a) o (b) que tiene actividad endoglucosidasa de IgG.

El polipéptido EndoS puede consistir en la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 2.

35 Los polipéptidos variantes son aquellos para los que la secuencia de aminoácidos varía de la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 2, pero que conservan el mismo carácter esencial o funcionalidad básica que EndoS. Por lo tanto, los polipéptidos variantes pueden mostrar actividad endoglucosidasa de IgG. Normalmente, los polipéptidos con más de aproximadamente el 50 %, 55 %, 60 % o 65 % de identidad, preferentemente al menos el 70 %, al menos el 75 %, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 % y de forma particularmente preferida al menos el 95 %, al menos el 97 % o al menos el 99 % de identidad, con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2 se consideran variantes de la proteína. Dichas variantes pueden incluir variantes alélicas y la eliminación, modificación o adición de aminoácidos individuales o grupos de aminoácidos dentro de la secuencia proteica, siempre que el péptido mantenga la funcionalidad básica de EndoS. La identidad de las variantes de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2 se puede medir en una región de al menos 100, al menos 250, al menos 500, al menos 750, al menos 800, al menos 850, al menos 900, al menos 950, al menos 955 o más aminoácidos contiguos de la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2, o más preferentemente en toda la longitud de la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 2.

50 Las variantes de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 contienen preferentemente los restos 191 a 199 de la SEQ ID NO: 1, es decir, Leu-191, Asp-192, Gly -193, Leu-194, Asp-195, Val-196, Asp-197, Val-198, Glu-199, de la SEQ ID NO: 1 (que corresponde a los restos 227 a 235 de la SEQ ID NO: 2, es decir, Leu-227, Asp-228, Gly -229, Leu-230, Asp-231, Val-232, Asp-233, Val-234 y Glu-235 de la SEQ ID NO:2). Estos aminoácidos constituyen un sitio activo de la familia 18 de quitinasa perfecto, que termina con ácido glutámico. El ácido glutámico en el sitio activo de las quitinasas es esencial para la actividad enzimática. Más preferentemente, por lo tanto, la variante de SEQ ID NO: 1 contiene Glu-199 de la SEQ ID NO: 1 y la variante de SEQ ID NO: 2 contiene Glu-235 de la SEQ ID NO: 2.

55 El fragmento del polipéptido EndoS utilizado en la invención tiene normalmente al menos 10, por ejemplo, al menos 20, 30, 40 o 50 aminoácidos más de longitud, hasta 100, 200, 250, 300, 500, 750, 800, 850, 900, 950 o 955 aminoácidos de longitud, siempre y cuando retenga la actividad endoglucosidasa de IgG de EndoS.

60 La actividad endoglucosidasa se puede determinar por medio de un ensayo adecuado. Por ejemplo, un polipéptido de prueba puede incubarse con IgG a una temperatura adecuada, tal como a 37 °C. Los materiales de partida y los productos de reacción pueden luego analizarse mediante SDS PAGE. Normalmente, la masa molecular de la cadena pesada de IgG se reduce en aproximadamente 3 kDa si el polipéptido de prueba tiene actividad endoglucosidasa de IgG. Otro ensayo para determinar si un polipéptido de prueba tiene actividad endoglucosidasa de IgG es mediante la detección de IgG glucosilada utilizando lectina de aglutinina (LCA) de *Lens culinaris*, opcionalmente utilizando peróxido de rábano picante y sustrato de peroxidación. Normalmente, la señal de carbohidratos se reduce si el polipéptido de prueba tiene actividad endoglucosidasa de IgG. Otro ensayo para determinar si un polipéptido de prueba tiene

actividad endoglucosidasa de IgG es mediante la incubación de un polipéptido de prueba con fragmentos Fc de IgG purificados, seguido de la reducción de la muestra con ditioneitol 10 mM y análisis de espectroscopía de masas (MALDI-TOF). Normalmente, la masa de Fc de IgG monomérica se reduce en 1417 +14 Da si el polipéptido de prueba tiene actividad endoglucosidasa de IgG. Otro ensayo para determinar si un polipéptido de prueba tiene actividad endoglucosidasa de IgG es incubar el polipéptido de prueba con IgG y analizar los fragmentos liberados de polisacáridos. Estos fragmentos carecen de los restos de GlcNAc terminales reductores y de cualquier posible fucosa unida a esos restos de GlcNAc. Estas estructuras de carbohidratos liberados se pueden detectar mediante espectrometría de masas (véase, por ejemplo, Harvey DJ, et al., J Am Soc Mass Spectrom. marzo de 2011;22(3):568-81.) o se puede detectar mediante marcaje de fluorescencia seguido de HPLC equipado con un detector de fluorescencia (véase, por ejemplo, Guile GR, et al., Anal Biochem. 5 de septiembre de 1996;240(2):210-26.).

La endo-beta-N-acetilglucosaminidasa F3 (Endo F3) es una endoglucosidasa originalmente aislada de *Flavobacterium meningosepticum* (Plummer TH Jr, Tarentino AL. Glycobiology. Junio de 1991;1(3):257-63). Endo F3 escinde oligosacáridos biantenarios fucosilados o triantenarios ligados a asparagina o libres, así como estructuras mediante de triamnosil quitobiosa. Se escinde entre los dos restos de N-acetilglucosamina en el núcleo de diacetilquitobiosa del oligosacárido, generando una molécula de azúcar truncada con un resto de N-acetilglucosamina restante en la asparagina.

EndoF3 no tiene, o ninguna actividad significativa para los polisacáridos de tipo oligomanosa. La endoglucosidasa Ebeta es el dominio beta de EndoE de *Enterococcus faecalis* que es similar a las glucosil hidrolasas de la familia 20. (Collin M, Fischetti VA. J Biol Chem. 21 de mayo de 2004; 279(21):22558-70.)

La enzima degradadora de inmunoglobulina G (IdeS) es una cisteína proteasa extracelular producida por el patógeno humano *S. pyogenes* (von Pawel-Rammingen et al. EMBO J. 2 de abril de 2002; 21(7): 1607-1615.). IdeS cataliza una única escisión proteolítica en la bisagra inferior de la IgG humana (US7666582). IdeS también escinde algunas subclases de IgG en varios animales y convierte eficazmente la IgG en fragmentos Fc y Fab.

Un ensayo para determinar la sensibilidad o resistencia de IgG a IdeS o cualquier otra proteasa es incubar IgG con la proteasa de prueba y analizar la mezcla de incubación mediante SDS-PAGE. La escisión de la IgG con la proteasa de prueba será evidente por una reducción en el peso molecular aparente de la cadena pesada. La IgG escindida debe exhibir al menos la mitad de la unión a uno o más receptores Fc.

La proteína N-glucanasa hidroliza el enlace amida entre GlcNAc y el resto Asn. Un ejemplo de una proteína N-glucanasa es la proteína N-glucanasa F (PNGasa F).

Tal como se utiliza en el presente documento, los términos "anticuerpo", "inmunoglobulina", "Ig" y "molécula de Ig" se utilizan de manera intercambiable. Cada molécula de anticuerpo tiene una estructura única que le permite unirse a su antígeno específico, pero todos los anticuerpos/inmunoglobulinas tienen la misma estructura general que se describe en el presente documento. Se sabe que la unidad estructural del anticuerpo básico comprende un tetrámero de subunidades. Cada tetrámero tiene dos pares idénticos de cadenas polipeptídicas, cada par tiene una cadena "ligera" (aproximadamente 25 kDa) y una "pesada" (aproximadamente 50-70 kDa). La parte amino-terminal de cada cadena incluye una región variable de aproximadamente 100 a 110 o más aminoácidos principalmente responsables del reconocimiento del antígeno. La porción carboxi-terminal de cada cadena define una región constante responsable principalmente de la función efectora. Las cadenas ligeras se clasifican en kappa o lambda. Las cadenas pesadas se clasifican en gamma, mu, alfa, delta o épsilon y definen el isotipo del anticuerpo como IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, respectivamente. Las cadenas ligeras y pesadas se subdividen en regiones variables y regiones constantes (véase en general, Fundamental Immunology (Paul, W., ed., 2ª ed. Raven Press, N. Y., 1989), cap. 7 (incorporado por referencia en su totalidad a todos los efectos). Las regiones variables de cada par de cadenas ligera/pesada forman el sitio de unión del anticuerpo. Por lo tanto, un anticuerpo inalterado tiene dos sitios de unión. Excepto en los anticuerpos bifuncionales o biespecíficos, los dos sitios de unión son los mismos. Todas las cadenas exhiben la misma estructura general de regiones marco relativamente conservadas (FR) unidas por tres regiones hipervariables, también llamadas regiones determinantes de complementariedad o CDR. Las CDR de las dos cadenas de cada par están alineadas por las regiones marco, permitiendo la unión a un epítipo específico. Los términos incluyen formas de origen natural, así como fragmentos y derivados. Se incluyen dentro del alcance del término las clases de Ig, concretamente, IgG, IgA, IgE, IgM e IgD. También se incluyen dentro del alcance de los términos los subtipos de IgG, concretamente, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. El término se utiliza en el sentido más amplio e incluye anticuerpos monoclonales únicos (incluidos los anticuerpos agonistas y antagonistas), así como composiciones de anticuerpos que se unirán a múltiples epítopos o antígenos. Los términos cubren específicamente anticuerpos monoclonales (incluidos anticuerpos monoclonales de longitud completa, anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos) y fragmentos de anticuerpos, siempre que contengan o estén modificados para contener al menos la parte del dominio C<sub>H</sub>2 de la región constante de inmunoglobulina de la cadena pesada que comprende un sitio de glucosilación unido a N del dominio C<sub>H</sub>2, o una variante de los mismos. Se incluyen dentro de los términos moléculas que comprenden la región Fc, tales como inmuno adhesinas (solicitud de patente de EE.UU. N.º 2004/0136986), fusiones de Fc y moléculas similares a anticuerpos. Como alternativa, estos términos pueden referirse a un fragmento de anticuerpo de al menos la región Fab que al menos contiene un sitio de glucosilación unido a N.

El anticuerpo puede, por ejemplo, ser un anticuerpo monoclonal o un anticuerpo policlonal.

El término fragmento "Fc" se refiere a la región C-terminal 'del fragmento cristalizado' del anticuerpo que contiene los dominios C<sub>H2</sub> y C<sub>H3</sub>. El término fragmento "Fab" se refiere a la región de 'unión a antígeno del fragmento' del anticuerpo que contiene los dominios V<sub>H</sub>, C<sub>H1</sub>, V<sub>L</sub> y C<sub>L</sub>. Tal como se utiliza en el presente documento, el término fragmento "Fc" también incluye la región de la bisagra inferior entre las cisteínas de los enlaces disulfuro entre cadenas y el dominio C<sub>γ2</sub>.

La expresión "anticuerpo monoclonal" (AcM) tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos salvo por las posibles mutaciones que tienen lugar de manera natural que pueden estar presentes en pequeñas cantidades. Los anticuerpos monoclonales son muy específicos, dirigiéndose contra un único sitio antigénico.

Asimismo, al contrario de las preparaciones de anticuerpos convencionales (policlonales), que normalmente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítomos), cada AcM se dirige contra un único determinante del antígeno. Además de su especificidad, los anticuerpos monoclonales son ventajosos porque se pueden sintetizar mediante un cultivo de hibridomas, no contaminados por otras inmunoglobulinas. El término "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo como obtenido de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, y no debe interpretarse que necesite la producción del anticuerpo mediante cualquier método particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales para su uso de acuerdo con la presente invención pueden realizarse por el método de hibridoma descrito en primer lugar por Kohler et al., (1975) *Nature*, 256:495 o pueden prepararse mediante métodos de ADN recombinante (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. N.º 4.816.567 de Cabilly et al.).

Los anticuerpos en el presente documento incluyen anticuerpos híbridos y recombinantes producidos mediante el empalme de un dominio variable (que incluye hipervariable) de un anticuerpo con un dominio constante (por ejemplo, anticuerpos "humanizados"), o una cadena ligera con una cadena pesada, o una cadena de una especie con una cadena de otra especie, o fusiones con proteínas heterólogas, independientemente de las especies de origen o clase de inmunoglobulina o designación de subclase, (Véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. N.º 4.816.567 de Cabilly et al.; Mage y Lamoyi, en *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, pág. 79-97 (Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1987).) Los anticuerpos en el presente documento incluyen específicamente anticuerpos "quiméricos" (inmunoglobulinas) en los que una parte de la cadena pesada y/o ligera es idéntica u homóloga a las secuencias correspondientes en los anticuerpos procedentes de una primera especie o pertenecientes a una clase o subclase de anticuerpo particular, mientras que el grupo de la(s) cadena(s) es idéntico u homólogo a las secuencias correspondientes en los anticuerpos procedentes de una especie diferente o pertenecientes a una clase o subclase de anticuerpos diferente, así como fragmentos de dichos anticuerpos, siempre que contengan o se modifiquen para contener al menos una C<sub>H2</sub>.

Las formas "humanizadas" de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) son inmunoglobulinas quiméricas específicas, cadenas de inmunoglobulina o fragmentos de las mismas (tales como F<sub>v</sub>, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> u otras subsecuencias de unión a antígeno de los anticuerpos) que contienen secuencias procedentes de inmunoglobulinas no humanas. Un fragmento F<sub>v</sub> de un anticuerpo es la unidad más pequeña del anticuerpo que retiene las características de unión y la especificidad de la molécula completa. El fragmento F<sub>v</sub> es un heterodímero no covalentemente asociado de los dominios variables de la cadena pesada y la cadena ligera del anticuerpo. El fragmento F(ab)<sub>2</sub> es un fragmento que contiene ambos brazos de fragmentos Fab unidos por los puentes disulfuro.

Las formas más habituales de anticuerpos humanizados son las inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que los restos de una región determinante de complementariedad (CDR) del receptor se sustituyen con restos de una CDR de una especie no humana (anticuerpo donador) tal como ratón, rata o conejo que tiene la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los restos marco de F<sub>v</sub> de la inmunoglobulina humana están sustituidos por los correspondientes restos no humanos.

Asimismo, los anticuerpos humanizados pueden comprender restos que no se encuentran en el anticuerpo receptor ni en las CDR o secuencias marco importadas. Estas modificaciones se efectúan para refinar y maximizar adicionalmente el funcionamiento del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente la totalidad de al menos uno, y normalmente dos, dominios variables, en los que todos o sustancialmente todas las regiones de CDR corresponden a los de una inmunoglobulina no humana o todas o sustancialmente todas las regiones CDR son las de una secuencia consenso de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado comprenderá también opcionalmente al menos una parte de una región constante de la inmunoglobulina (Fc), normalmente de una inmunoglobulina humana. Para más detalles véase Jones et al, 1986, *Nature* 321:522-524; Reichmann et al, 1988, *Nature* 332:323-327, y Presta, 1992, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596.

Los "fragmentos" dentro del alcance de los términos anticuerpo o inmunoglobulina incluyen los producidos mediante digestión con varias proteasas, los producidos mediante escisión química y/o disociación química y los producidos de forma recombinante, siempre que el fragmento siga siendo capaz de unirse específicamente a una molécula diana. Entre dichos fragmentos se encuentran los fragmentos Fc, Fab, Fab', F<sub>v</sub>, F(ab')<sub>2</sub> y F<sub>v</sub> de cadena única (scF<sub>v</sub>).

Las dianas de interés para anticuerpos terapéuticos para su uso en el método de la invención incluyen CD2, CD3, CD19, CD20, CD22, CD25, CD30, CD33, CD40, CD52, CD56, CD64, CD70, CD74, CD79, CD80, CD86, CD105, CD138, CD174, CD205, CD227, CD326, CD340, MUC16, GPNMB, PSMA, Cripto, ED-B, TMEFF2, EphA2, EphB2, FAP, av integrina, Mesotelina, EGFR, TAG-72, GD2, CA1X, 5T4,  $\alpha$ 4 $\beta$ 7 integrina, Her2. Otras dianas son citocinas, como las interleucinas IL-1 a IL-13, factores  $\alpha$  y  $\beta$  de necrosis tumoral, interferones  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ , factor beta de crecimiento tumoral (TGF- $\beta$ ), factor estimulador de las colonias (CSF) y factor estimulador de las colonias de granulocitos monocitos (GM-CSF). Véase *Human Cytokines: Handbook for Basic & Clinical Research* (Aggrawal *et al.* eds., Blackwell Scientific, Boston, MA 1991). Otras dianas son hormonas, enzimas y mensajeros intracelulares e intercelulares, tales como, adenil ciclasa, guanil ciclasa y fosfolipasa C. Otras dianas de interés son antígenos de leucocitos, tales como CD20 y CD33. Los fármacos también pueden ser dianas de interés. Las moléculas diana pueden ser humanas, mamíferas o bacterianas. Otras dianas son antígenos, tales como proteínas, glucoproteínas y hidratos de carbono de patógenos microbianos, tanto víricos como bacterianos, y tumores. Otras dianas se describen en el documento U.S. 4.366.241.

Ejemplos de anticuerpos adecuados incluyen Abagovomab, Abciximab, Actoxumab, Adalimumab, Adecatumumab, Afelimomab, Afutuzumab, Alacizumab pegol, ALD518, Alemtuzumab, Alirocumab, Altumomab pentetato, Amatuximab, Anatomomab mafenatox, Anrukizumab, Apolizumab, Arcitumomab, Aselizumab, Atinumab, Atlizumab (= tocilizumab), Atorolimomab, Bapineuzumab, Basiliximab, Baviximab, Bectumomab, Belimumab, Benralizumab, Bertilimumab, Besilesomab, Bevacizumab, Bezlotoxumab, Biciromab, Bimagrumb, Bivatuzumab mertansina, Blinatumomab, Blosozumab, Brentuximab vedotina, Briakinumab, Brodalumab, Canakinumab, Cantuzumab mertansina, Cantuzumab ravtansina, Caplacizumab, Capromab pendetida, Carlumab, Catumaxomab, CC49, Cedelizumab, Certolizumab pegol, Cetuximab, Ch.14.18, Citatuzumab bogatox, Cixutumumab, Clazakizumab, Clenoliximab, Clivatuzumab tetraxetan, Conatumumab, Concizumab, Crenezumab, CR6261, Dacetuzumab, Daclizumab, Dalotuzumab, Daratumumab, Demcizumab, Denosumab, Detumomab, Dorlimomab aritox, Drozitumab, Duligotumab, Dupilumab, Dusigitumab, Ecomeximab, Eculizumab, Edobacomab, Edrecolomab, Efalizumab, Efungumab, Elotuzumab, Elsilimumab, Enavatuzumab, Enlimomab pegol, Enokizumab, Enoticumab, Ensituximab, Epitumomab cituxetan, Epratuzumab, Erlizumab, Ertumaxomab, Etaracizumab, Etrolizumab, Evolocumab, Exbivirumab, Fanolesomab, Faralimumab, Farletuzumab, Fasinumab, FBTA05, Felvizumab, Fezakinumab, Ficlatazumab, Figitumumab, Flanvotumab, Fontolizumab, Foralumab, Foravirumab, Fresolimomab, Fulranumab, Futuximab, Galiximab, Ganitumab, Gantenerumab, Gavilimumab, Gemtuzumab ozogamicina, Gevokizumab, Girentuximab, Glembatumumab vedotin, Golimumab, Gomiliximab, GS6624, Ibalizumab, Ibritumomab tiuxetan, Icrucumab, Igovomab, Imciromab, Imgatuzumab, Inclacumab, Indatuximab ravtansina, Infliximab, Intetumumab, Inolimomab, Inotuzumab ozogamicina, Ipilimumab, Iratumumab, Itolizumab, Ixekizumab, Keliximab, Labetuzumab, Lampalizumab, Lebrikizumab, Lemalesomab, Lerdelimomab, Lexatumumab, Libivirumab, Ligelizumab, Lintuzumab, Lirilumab, Lodelcizumab, Lorvotuzumab mertansina, Lucatumumab, Lumiliximab, Mapatumumab, Maslimomab, Mavrilimumab, Matuzumab, Mepolizumab, Metelimomab, Milatuzumab, Minretumomab, Mitumomab, Mogamulizumab, Morolimomab, Motavizumab, Moxetumomab pasudotox, Muromonab-CD3, Nacolomab tafenatox, Namilumab, Naptumomab estafenatox, Narnatumab, Natalizumab, Nebacumab, Necitumumab, Nerelimumab, Nesvacumab, Nimotuzumab, Nivolumab, Nofetumomab merpentan, Ocaratuzumab, Ocrelizumab, Odulimumab, Ofatumumab, Olaratumab, Olokizumab, Omalizumab, Onartuzumab, Oportuzumab monatox, Oregovomab, Orticumab, Otelixizumab, Oxelumab, Ozanezumab, Ozoralizumab, Pagibaximab, Palivizumab, Panitumumab, Panobacumab, Parsatumumab, Pascolizumab, Pateclizumab, Patritumab, Pentumomab, Perakizumab, Pertuzumab, Pexelizumab, Pidilizumab, Pinatuzumab vedotin, Pintumomab, Placulumab, Polatuzumab vedotina, Ponezumab, Priliximab, Pritoxaximab, Pritumumab, PRO 140, Quilizumab, Racotumomab, Radretumab, Rafivirumab, Ramucirumab, Ranibizumab, Raxibacumab, Regavirumab, Reslizumab, Rilotumumab, Rituximab, Robatumumab, Roledumab, Romosozumab, Rontalizumab, Rovelizumab, Ruplizumab, Samalizumab, Sarilumab, Satumomab pendetida, Secukinumab, Seribantumab, Setoxaximab, Sevirumab, Sibrotuzumab, Sifalimumab, Siltuximab, Simtuzumab, Siplizumab, Sirukumab, Solanezumab, Solitomab, Sonepcizumab, Sontuzumab, Stamulumab, Sulesomab, Suvizumab, Tabalumab, Tacatuzumab tetraxetan, Tadocizumab, Talizumab, Tanezumab, Taplitumomab paptox, Tefibazumab, Telimumab aritox, Tenatumomab, Teneliximab, Teplizumab, Teprotumumab, TGN1412, Ticilimumab (= tremelimumab), Tildrakizumab, Tigatuzumab, TNX-650, Tocilizumab (= atlizumab), Toralizumab, Tositumomab, Tralokinumab, Trastuzumab, TRBS07, Tregalizumab, Tremelimumab, Tucotuzumab celmoleucina, Tuvirumab, Ublituximab, Urelumab, Urtoxazumab, Ustekinumab, Vapaliximab, Vatelizumab, Vedolizumab, Veltuzumab, Vepalimumab, Vesencumab, Visilizumab, Volociximab, Vorsetuzumab mafodotina, Votumumab, Zalutumumab, Zanolimumab, Zatuximab, Ziralimumab y Zolimumab aritox.

Los anticuerpos terapéuticos preferidos que se pueden modificar para volverse resistentes a un agente que reduce la unión al receptor Fc de los anticuerpos séricos endógenos incluyen Natalizumab, Vedolizumab, Belimumab, Atacicept, Alefacept, Otelixizumab, Teplizumab, Rituximab, Ofatumumab, Ocrelizumab, Epratuzumab, Alemtuzumab, Abatacept, Eculizumab, Omalizumab, Canakinumab, Meplizumab, Reslizumab, Tocilizumab, Ustekinumab, Briakinumab, Etanercept, Infliximab, Adalimumab, Certolizumab pegol, Golimumab, Trastuzumab, Gemtuzumab, Ozogamicin, Ibritumomab, Tiuxetan, Tositumomab, Cetuximab, Bevacizumab, Panitumumab, Denosumab, Ipilimumab, Brentuximab y Vedotin.

Los receptores inmunitarios Fc discutidos en el presente documento, pueden incluir: FcyRI, FcyRIIa, FcyRIIb, FcyRIIIa, FcyRIIIb y FcRn (receptor neonatal). El término FcyRI puede referirse a cualquier subtipo de FcyRI a menos que se

especifique lo contrario. El término FcyRII puede referirse a cualquier receptor de FcyRII a menos que se especifique lo contrario. El término FcyRm se refiere a cualquier subtipo de FcyRIH a menos que se especifique lo contrario.

Los "derivados" dentro del alcance del término incluyen anticuerpos (o fragmentos de los mismos) que se han modificado en secuencia, pero que siguen siendo capaces de unirse específicamente a una molécula diana, incluyendo: anticuerpos quiméricos y humanizados interespecies; fusiones de anticuerpos; complejos heteroméricos de anticuerpos y fusiones de anticuerpos, tales como diacuerpos (anticuerpos biespecíficos), diacuerpos de cadena única e intracuerpos (véase, por ejemplo, *Intracellular Antibodies: Research and Disease Applications*, (Marasco, ed., Springer-Verlag New York, Inc., 1998).

El término "péptido", como se utiliza en el presente documento, se refiere a un polipéptido corto, por ejemplo, uno que normalmente tiene menos de aproximadamente 50 aminoácidos de longitud y más normalmente menos de aproximadamente 30 aminoácidos de longitud. El término como se utiliza en el presente documento abarca análogos y miméticos que imitan la función biológica y estructural.

El término "polipéptido" abarca tanto proteínas de origen natural como de origen no natural, y fragmentos, mutantes, derivados y análogos de las mismas. Un polipéptido puede ser monomérico o polimérico. Además, un polipéptido puede comprender varios dominios diferentes, cada uno de los cuales tiene una o más actividades distintas.

La expresión "proteína aislada" o "polipéptido aislado" es una proteína o polipéptido que, en virtud de su origen o fuente de derivación, (1) no está asociada con componentes asociados de manera natural que la acompañan en su estado nativo, (2) existe en una pureza que no se encuentra en la naturaleza, donde la pureza se puede adjudicar con respecto a la presencia de otro material celular (por ejemplo, está libre de otras proteínas de la misma especie) (3) se expresa mediante una célula de una especie diferente, o (4) no ocurre en la naturaleza (por ejemplo, es un fragmento de un polipéptido que se encuentra en la naturaleza o incluye análogos o derivados de aminoácidos que no se encuentran en la naturaleza o enlaces distintos de los enlaces peptídicos estándar). Por lo tanto, un polipéptido que se sintetiza químicamente o se sintetiza en un sistema celular diferente de la célula de la que se origina naturalmente se "aislará" de sus componentes asociados de forma natural. Un polipéptido o proteína también puede quedar sustancialmente libre de componentes asociados de forma natural mediante aislamiento, utilizando técnicas de purificación de proteínas bien conocidas en la materia. Como se define en el presente documento, 'aislado' no necesariamente requiere que la proteína, polipéptido, péptido u oligopéptido así descrito se haya eliminado físicamente de su entorno nativo.

La expresión "fragmento de polipéptido", como se utiliza en el presente documento, se refiere a un polipéptido que tiene una eliminación, por ejemplo, una eliminación amino-terminal y/o carboxi-terminal en comparación con un polipéptido de longitud completa. En una realización preferida, el fragmento de polipéptido es una secuencia contigua en la que la secuencia de aminoácidos del fragmento es idéntica a las posiciones correspondientes en la secuencia de origen natural. Los fragmentos normalmente tienen al menos 5, 6, 7, 8, 9 o 10 aminoácidos de longitud, preferentemente al menos 12, 14, 16 o 18 aminoácidos de longitud, más preferentemente al menos 20 aminoácidos de longitud, más preferentemente al menos 25, 30, 35, 40 o 45 aminoácidos, incluso más preferentemente al menos 50 o 60 aminoácidos de longitud, e incluso más preferentemente al menos 70 aminoácidos de longitud.

Una proteína tiene "homología" o es "homóloga" a una segunda proteína si la secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína tiene una secuencia similar a la secuencia de ácido nucleico que codifica la segunda proteína. Como alternativa, una proteína tiene homología con una segunda proteína si las dos proteínas tienen secuencias de aminoácidos 'similares'. (por lo tanto, la expresión "proteínas homólogas" se define para significar que las dos proteínas tienen secuencias de aminoácidos similares). En una realización preferida, una proteína homóloga es una que exhibe al menos el 65 % de homología de secuencia con la proteína de tipo silvestre, de manera más preferida al menos el 70 % de homología de secuencia. Incluso más preferidas son proteínas homólogas que exhiben al menos el 75 %, 80 %, 85 % o 90 % de homología de secuencia con la proteína de tipo silvestre. En una realización aún más preferida, una proteína homóloga exhibe al menos el 95 %, 98 %, 99 % o 99,9 % de identidad de secuencia. Tal como se utiliza en el presente documento, la homología entre dos regiones de secuencia de aminoácidos (especialmente con respecto a similitudes estructurales predichas) se interpreta como que implica similitud en la función.

Los anticuerpos de glucoforma de tipo oligomanosa se pueden producir mediante sistemas de expresión bien establecidos. Algunas ilustraciones de los enfoques incluyen la producción de una mezcla heterogénea de polisacáridos de tipo oligomanosa utilizando sistemas de expresión de levadura, como *Pichia pastoris*, en un intervalo de polisacáridos de tipo oligomanosa pero normalmente Man<sub>8-12</sub>GlcNAc<sub>2</sub> pero pueden ser más grandes o más pequeños. Por ejemplo, una línea celular de *P. Pastoris* para expresar anticuerpos que contienen Man<sub>5</sub>GlcNAc<sub>2</sub> ha sido informada por Potgieter TI, et al. *J Biotechnol.* 23 de febrero de 2009; 139(4):318-25. Epub 27 de diciembre de 2008". Otro ejemplo de la expresión de anticuerpos en levaduras es descrito por Horwitz AH, et al. Chang CP, Better M, Hellstrom KE, Robinson RR en *Proc Natl Acad Sci U S A.* Noviembre de 1988;85(22):8678-82." Los anticuerpos producidos de esta manera exhiben ADCC mejorada, consistente con la falta de fucosa (Horwitz AH, et al. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Noviembre de 1988; 85(22):8678-82). Otro método implica la expresión en una línea celular de mamífero en presencia de un inhibidor de la alfa 1,2-manosidasa, tal como la kifunensina (Elbein, Tropea et al. 1990; Chang, Crispin et al. 2007; Kanda, Yamada et al. 2007; Zhou, Shankara et al. 2008; van Berkel, Gerritsen et al. 2010) donde la concentración es suficiente para dar una inhibición parcial, por ejemplo, 1-5 microM en el sistema HEK 293T

(Chang, Crispin et al. 2007).

Las glucoformas homogéneas de los anticuerpos de tipo oligomanosa, como la forma Man<sub>9</sub>GlcNAc<sub>2</sub>, se pueden obtener mediante la expresión en una línea celular de mamífero en presencia de un inhibidor de la alfa 1,2-manosidasa, como la kifunensina (Elbein AD, et al. J Biol Chem. 15 de septiembre de 1990;265(26):15599-605; Chang VT, et al., Structure. marzo de 2007;15(3):267-73) donde la concentración es suficiente para dar una glucoforma más homogénea, por ejemplo, > 5 e idealmente > 10 microM en el sistema de expresión HEK 293T. La kifunensina también se puede utilizar para generar glucoformas de tipo oligomanosa de anticuerpos secretados por líneas celulares de hibridoma o líneas celulares eucariotas transfectadas de forma estable o transfectadas de forma transitoria. Un método alternativo implica la expresión en una línea celular de levadura donde la genética de la vía se ha alterado para no procesar el polisacárido más allá de Man<sub>9</sub>GlcNAc<sub>2</sub>, por ejemplo, el tipo de líneas celulares de *Pichia* desarrolladas por GlycoFi (ahora Merck) (Li H, et al., Nat Biotechnol. febrero de 2006;24(2):210-5. Epub 22 de enero de 2006).

La glucoforma Man<sub>5</sub>GlcNAc<sub>2</sub> homogénea se puede producir a través de la expresión en una línea celular de mamífero deficiente en la GlcNAc transferasa I (GnT I), por ejemplo, CHO Lec1 o CHO Lec3.2.8. (Patnaik SK, Stanley P. Methods Enzymol. 2006;416:159-82. Review.), células HEB 293S deficientes en GnT I (Reeves, P. J., N. Callewaert, et al. (2002). Proc Natl Acad Sci U S A 99(21): 13419-13424) o, alternativamente, por los sistemas de expresión de levadura modificada como se indica anteriormente (Potgieter TI, et al., J Biotechnol. 23 de febrero de 2009;139(4):318-25. Epub 27 de diciembre de 2008).

La glucoforma Man<sub>8</sub>GlcNAc<sub>2</sub> se puede producir utilizando la glucoforma Man<sub>9</sub>GlcNAc<sub>2</sub> como se indicó anteriormente pero con procesamiento por manosidasa I en el RE, por ejemplo, digestión posterior a la expresión (Dunlop DC, Bonomelli C, Mansab F, Vasiljevic S, Doores KJ, Wormald MR, Palma AS, Feizi T, Harvey DJ, Dwek RA, Crispin M, Scanlan CN. Glycobiology. Julio de 2010;20(7):812-23. Epub 24 de febrero de 2010). En otro método, la glucoforma Man<sub>8</sub>GlcNAc<sub>2</sub> se puede producir utilizando los sistemas de expresión de levadura diseñados como se mencionó anteriormente. Otros sistemas hospedadores de expresión encontrados en la técnica para la producción de glucoproteínas incluyen: células CHO (Documento WO9922764A1 de Raju y documento WO03/035835A1 de Presta); células de hibridoma (Trebak et al., 1999, J. Immunol. Methods, 230:59-70); células de insectos (Hsu et al., 1997, JBC, 272:9062-970); y células vegetales (Gerngross et al., documento WO04/07499A2). Las glucoformas de IgG resistentes a la endoglucosidasa se pueden producir de forma recombinante mediante líneas celulares eucariotas que contienen las actividades de glucosidasa y glucosiltransferasa. Las líneas celulares eucariotas se pueden diseñar por ingeniería genética para tener actividades específicas de glucosidasa y glucosiltransferasa que generan una glucoforma o glucoformas particulares. Por ejemplo, *Pichia pastoris* ha sido diseñada para contener glucosiltransferasas humanas. Las líneas celulares de *Pichia pastoris* obtenidas mediante ingeniería genética secretan glucoproteínas que contienen polisacáridos que no se encuentran en las glucoproteínas de las líneas celulares nativas de *Pichia pastoris*, pero secretan glucoproteínas similares a las glucoproteínas de los mamíferos. Se pueden generar líneas celulares u organismos mutantes similares en otros sistemas de expresión eucariotas, tales como líneas celulares de moscas, plantas y mamíferos. Usando dichas líneas celulares u organismos diseñados por ingeniería genética, se pueden generar glucoproteínas resistentes a la endoglucosidasa. Usando dichas líneas celulares u organismos diseñados por ingeniería genética, se pueden generar glucoproteínas que contienen polisacáridos triantenarios o tetraantenarios o pentaantenarios, por ejemplo, en levaduras: Hamilton SR, Gerngross TU. Curr Opin Biotechnol. Octubre de 2007;18(5):387-92. Epub 24 de octubre de 2007. Los métodos adicionales para sintetizar glucoformas incluyen el uso de glucosiltransferasas y/o glucosidasas para cambiar la composición de polisacáridos de glucoproteínas secretadas.

Se pueden producir glucoformas de tipo híbrido utilizando sistemas de expresiones eucariotas deficientes en la actividad de Golgi  $\alpha$ -manosidasa II. Las líneas celulares pueden ser modificadas genéticamente para ser deficientes en la actividad de Golgi  $\alpha$ -manosidasa II. Por ejemplo, la línea celular Lec36 basada en la línea celular 293T de riñón embrionario humano se ha generado mediante resistencia a la lectina (Crispin M et al 2009, Journal of Biological Chemistry, 284, 21684-21695). Las glucoproteínas expresadas en las células Lec36 contienen glucosilación de tipo híbrido. Como alternativa, se pueden construir células de levadura diseñadas por ingeniería que contengan glucosidasa y glucosiltransferasas de mamífero pero que carezcan de la actividad de Golgi  $\alpha$ -manosidasa II. Los métodos adicionales para expresar glucoproteínas que contienen polisacáridos de tipo híbrido incluyen el uso de inhibidores de Golgi  $\alpha$ -manosidasa II como la swainsonina (Tulsiani DR, Harris TM, Touster O. J Biol Chem. 25 de julio de 1982;257(14):7936-9; Crispin M et al 2009, Journal of Biological Chemistry, 284, 21684-21695).

Los sistemas de expresión de plantas también se pueden diseñar por ingeniería para producir glucoformas definidas o un intervalo de glucoformas de glucoproteínas. Las estrategias para modular la glucosilación en los sistemas de expresión de plantas incluyen la orientación al RE, así como la inactivación y/o inserción génica de la glucosiltransferasa y/o glucosidasa (Gomord V, Fitchette AC, Menu-Bouaouiche L, Saint-Jore-Dupas C, Plasson C, Michaud D, Faye L. Plant Biotechnol J. Junio de 2010;8(5):564-87).

Las glucoformas que contienen "N-acetilglucosamina bisectada" en donde la glucoforma contiene beta-N-acetilglucosamina 1-4 unida a un resto de beta-manosa se pueden generar mediante expresión en un sistema de expresión eucariota que es capaz de producir polisacáridos de tipo complejo o tipo híbrido y expresan GlcNAc transferasa III (también conocida como GnTIII y UDP-N-acetilglucosamina:  $\beta$ -D manosido  $\beta$ (1,4)-N-acetilglucosaminiltransferasa) (por ejemplo, el documento US 7897842).

Mientras que EndoS se puede utilizar para desactivar anticuerpos séricos de la competencia, el anticuerpo terapéutico diseñado por ingeniería también se puede desactivar utilizando una endoglucosidasa activa para esa glucoforma del anticuerpo. Por ejemplo, el uso de glucoformas de anticuerpos de tipo oligomanosa permite que el anticuerpo terapéutico se desactive con Endo H o Endo F1. Esto permite la desactivación del anticuerpo terapéutico para controlar el tiempo de actividad en el cuerpo o desactivarlo en caso de reacciones adversas del paciente.

Tal como se utiliza en el presente documento, una composición de glucoproteínas "carece" o "está falto" de un resto de azúcar particular, como la fucosa o galactosa, cuando no está presente una cantidad detectable de dicho resto de azúcar en las estructuras de N-polisacárido en ningún momento. Por ejemplo, en realizaciones preferidas de la presente invención, las composiciones de glucoproteínas se producen mediante organismos eucariotas inferiores, tal como se ha definido anteriormente, incluyendo levadura (por ejemplo, *Pichia sp.*; *Saccharomyces sp.*; *Kluyveromyces sp.*; *Aspergillus sp.*), y "carecerán de fucosa", porque las células de estos organismos no tienen las enzimas necesarias para producir estructuras de N-polisacáridos fucosiladas. Por lo tanto, la expresión "esencialmente libre de fucosa" abarca la expresión "que carece de fucosa". Sin embargo, una composición puede estar "esencialmente libre de fucosa" incluso si la composición contenía estructuras de N-polisacárido fucosiladas una vez o contiene cantidades limitadas pero detectables de estructuras de N-polisacárido fucosiladas como se describió anteriormente.

La interacción de los anticuerpos y los complejos anticuerpo-antígeno con las células del sistema inmunitario y la variedad de respuestas, incluida la citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos (ADCC) y la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), el aclaramiento de inmunocomplejos (fagocitosis), la producción de anticuerpos mediante linfocitos B y la semivida en suero de IgG se definen respectivamente en lo siguiente: Daeron et al, 1997, Annu. Rev. Immunol. 15: 203-234; Ward y Ghetie, 1995, Therapeutic Immunol. 2:77-94; Cox y Greenberg, 2001, Semin. Immunol. 13: 339-345; Heyman, 2003, Immunol. Lett. 88:157-161; y Ravetch, 1997, Curr. Opin. Immunol. 9:121-125.

Los anticuerpos se pueden incorporar en composiciones farmacéuticas que comprenden el anticuerpo como un agente terapéutico activo y una variedad de componentes farmacéuticamente aceptables. Véase Remington's Pharmaceutical Science (15ª ed., Mack Publishing Company, Easton, Pensilvania, 1980). La forma preferida depende del modo pretendido de administración y de la aplicación terapéutica. Las composiciones pueden incluir, dependiendo de la formulación deseada, vehículos o diluyentes no tóxicos, farmacéuticamente aceptables, que se definen como vehículos habitualmente utilizados para formular composiciones farmacéuticas para administración en animales o seres humanos. El diluyente se selecciona para no afectar la actividad biológica de la combinación. Ejemplos de dichos diluyentes son agua destilada, solución salina fisiológica tamponada con fosfato, solución de Ringer, solución de dextrosa y solución de Hank. Además, la composición o formulación farmacéutica también puede incluir otros vehículos, adyuvantes o estabilizantes no tóxicos, no terapéuticos, no inmunogénicos y similares.

El vehículo farmacéutico puede ser un líquido y la composición farmacéutica estaría en forma de una solución. Los vehículos líquidos se utilizan en la preparación de soluciones, suspensiones, emulsiones, jarabes, elixires y composiciones presurizadas. El ingrediente activo se puede disolver o suspender en un vehículo líquido farmacéuticamente aceptable, como el agua, un disolvente orgánico, una mezcla de ambos o aceites o grasas farmacéuticamente aceptables. El vehículo líquido puede contener otros aditivos farmacéuticos adecuados tales como solubilizantes, emulsionantes, tampones, conservantes, edulcorantes, agentes aromatizantes, agentes de suspensión, agentes espesantes, colores, reguladores de la viscosidad, estabilizantes u osmorreguladores. Los ejemplos adecuados de vehículos líquidos para administración oral y parenteral incluyen agua (que contiene parcialmente aditivos, por ejemplo, derivados de celulosa, preferentemente solución de carboximetilcelulosa de sodio), alcoholes (incluidos alcoholes monohídricos y alcoholes polihídricos, por ejemplo, glicoles) y sus derivados, y aceites (por ejemplo, aceite de coco fraccionado y aceite de arachis). Para administración parenteral, el vehículo también puede ser un éster aceitoso tal como oleato de etilo y miristato de isopropilo. Los vehículos líquidos estériles son útiles en composiciones en forma líquida estéril para administración parenteral.

Las composiciones farmacéuticas para administración parenteral son estériles, sustancialmente isotónicas, no contienen pirógenos y se preparan de acuerdo con las Buenas Prácticas de Fabricación (GMP) de la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) o un organismo similar. Los anticuerpos se pueden administrar como dosis inyectables de una solución o suspensión de la sustancia en un diluyente fisiológicamente aceptable con un vehículo farmacéutico que puede ser un líquido estéril como el agua, aceites, solución salina, glicerol o etanol. Adicionalmente, sustancias auxiliares, tales como agentes humectantes o emulsionantes, tensioactivos, sustancias tamponantes del pH, y similares, pueden estar presentes en las composiciones. Otros componentes de las composiciones farmacéuticas son los de origen petrolífero, animal, vegetal o sintético, por ejemplo, aceite de cacahuete, aceite de soja y aceite mineral. En general, los glicoles tales como propilenglicol o polietilenglicol son vehículos líquidos preferidos, particularmente para soluciones inyectables. Los anticuerpos se pueden administrar en forma de una inyección de depósito o preparación de implante que se puede formular de tal manera que permita una liberación sostenida del ingrediente activo. Normalmente, las composiciones se preparan como inyectables, bien como soluciones líquidas o bien como suspensiones; también se pueden preparar formas sólidas adecuadas para solución o suspensión en vehículos líquidos antes de la inyección. La preparación también se puede emulsionar o encapsular en liposomas o micropartículas como polilactida, poliglicolida o copolímero para un mayor efecto adyuvante, como se discutió anteriormente (véase Langer, Science 249, 1527(1990) y Hanes, Advanced Drug Delivery Reviews 28, 97-

119 (1997).

El agente y el anticuerpo terapéutico pueden administrarse mediante cualquier vía adecuada. Preferentemente, ambos se administran por vía intravenosa (i.v.).

5 Ahora se describirán realizaciones preferidas de la presente invención, meramente a modo de ejemplo, con referencia a los siguientes dibujos y ejemplos, en donde:

10 La Figura 1 muestra la unión de Fc de IgG1 humana a FcγRIIIa inmovilizado en presencia de PBS o concentraciones crecientes de suero humano, tratados o tratados de forma simulada con Endoglucosidasa-S.

Las Figuras 2A y 2B muestran un análisis espectrométrico de masas de la liberación de PNGasa F de polisacáridos unidos a N encontrados en IgG de suero humano antes de la digestión con EndoS.

15 Las Figuras 3A y 3B muestran un análisis espectrométrico de masas de la liberación de PNGasa F de polisacáridos unidos a N encontrados en IgG de suero humano después de la digestión con EndoS. (Los iones principales son aductos de cloruro. Los iones en  $m/z$  1762 y 1924 son aductos de fosfato;  $m/z$  1519 es un fragmento de  $m/z$  1862.)

Las Figuras 4A y 4B muestran el análisis espectrométrico de masas directo de polisacáridos liberados por EndoS. (Funcionó como aductos de cloruro;  $m/z$  1210, 1372 y 1534 son aductos de fosfato;  $m/z$  951, 1113 y 1275 son fragmentos).

20 La Figura 5 muestra la resistencia de las glucoformas de Fc que contienen oligomanosa a hidrólisis mediada por EndoS. La Fc de IgG 1 glucosilada de manera natural (a-c) y la Fc de tipo oligomanosa ( $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ ) (d-f) se digirieron con Endo-S (b, e) o Endo-H (c, f). Las estructuras de polisacárido mostradas se basan en las especies isoméricas más abundantes, compatibles con las rutas biosintéticas conocidas. La escisión del enlace  $\text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNAc}$  del núcleo da como resultado la eliminación de un único GlcNAc y un resto de Fucosa unido de los polisacáridos complejos ( $\Delta m/z$  pronosticados = 349,1) y una GlcNAc de los polisacáridos de tipo oligomanosa ( $\Delta m/z$  pronosticados = 203,1).

25 La Figura 6 muestra la unión mediante ELISA de IgG1 monoclonal recombinante (AcM IgG CIIC1 que es una IgG quimérica con Fc humano y Fab de ratón) a FcγRIIIa inmovilizado en presencia de tampón (PBS) o concentraciones crecientes de suero humano. La unión se detectó utilizando un anticuerpo secundario específico para el dominio Fab de ratón.

30 La Figura 7 muestra la desactivación mediada por EndoS del suero que conduce a la mejora de un AcM IgG CIIC1 (una IgG quimérica con Fc humano y Fab de ratón) que se une a FcγRIIIa. La unión de Fc de IgG1 humana que contiene de tipo oligomanosa ( $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ ) a FcγRIIIa se muestra en presencia de PBS, suero, suero y Endo-S, suero y Endo-H, o suero y EndoS y Endo H. Los puntos de datos representan la media calculada de tres mediciones independientes de un total de cuatro experimentos.

35 La Figura 8 muestra una representación esquemática de cómo EndoS elimina la afinidad de los anticuerpos séricos en masa a los FcγR, pero no a los anticuerpos modificados con polisacáridos (tipo oligomanosa).

#### Breve descripción de las secuencias

40 La SEQ ID NO: 1 es una secuencia de aminoácidos de EndoS aislada de AP1 de *S. pyogenes*.

La SEQ ID NO: 2 es una secuencia de aminoácidos de EndoS aislada de la API de *S. pyogenes*, que incluye una secuencia de señal.

#### Ejemplos

##### El principio de la invención

50 La figura 8 ilustra el principio de al menos un aspecto de la invención. En particular, la Figura 8 muestra una representación esquemática de cómo EndoS elimina la afinidad de los anticuerpos séricos en masa a los FcγR mediante la eliminación de la glucosilación de Fc "normal". Sin embargo, EndoS no tiene ningún efecto sobre los anticuerpos diseñados con polisacáridos (tipo oligomanosa) y se logra la activación de los FcR. En condiciones fisiológicas, la mayoría de los FcR están unidos mediante Fc de Ig "irrelevante", normalmente suero. Esto pone un límite duro a la concentración eficaz de receptores Fc disponibles (FcγR). En la presente realización, Endo-S se utiliza para reducir significativamente la afinidad de los anticuerpos séricos irrelevantes a los FcγR, pero no a los anticuerpos monoclonales diseñados por polisacárido (tipo oligomanosa).

#### **Ejemplo 1: La reducción de la unión de IgG en suero a FcγRIIIa aumenta la unión de anticuerpos terapéuticos resistentes**

60 Con el fin de demostrar que podría utilizarse EndoS para reducir la unión de IgG en suero a FcγRIIIa, se realizó el siguiente experimento. FcγRIIIa (variante 158Val; R&D systems, Mineápolis, EE.UU.) a 2,5 µg/ml en PBS se recubrió en placas de microtitulación de alta unión (3690, Corning, NY, EE.UU.) durante la noche a 4 °C. Las placas recubiertas se lavaron con PBS que contenía Tween 20 al 0,05 % (Sigma-aldrich, EE.UU.) y se bloquearon durante 2 horas a temperatura ambiente con BSA al 3 % en PBS. Se agregaron luego diluciones en serie de suero humano (H4522, Sigma-Aldrich, EE.UU.) o de glucoformas de IgG1 humanas recombinantes que contienen  $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$  o  $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$  (concentración inicial de 0,1 mg/ml en PBS) y se dejaron unir durante 2 horas a temperatura ambiente.

Las placas se lavaron cinco veces con PBS que contenía Tween al 0,05 % y se detectó la unión utilizando un fragmento Fab conjugado con HRP específico para Fab de IgG murina (ab98659, Abcam, Cambridge, UK). Se utilizó sustrato TMB (Thermo Scientific, Rockford, IL, EE.UU.) para el desarrollo del color de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El desarrollo del color se detuvo mediante la adición de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2M y se midió la absorbancia a 450 nm en un lector de placas de múltiples paredes Spectramax M5 (Molecular Devices, California, EE.UU.). El suero se incubó durante la noche con 1 µg/ml de EndoS o PBS a 37 °C. Las muestras de control de suero se trataron de forma simulada con PBS y se incubaron durante la noche a 37 °C. Los datos se procesaron y graficaron utilizando Prism (software GraphPad, California, EE.UU.). La afinidad aparente se calculó como la concentración de AcM de tipo oligomanosa correspondiente a la mitad de la unión máxima en la curva de unión de ELISA. La unión de sueros humanos normales se detectó utilizando anti-Fab humano marcado. Los resultados se muestran en la Figura 1 y demuestran claramente que el tratamiento con EndoS de la IgG sérica humana da como resultado una disminución en la unión de FcγRIIIa.

La Figura 6 demuestra que se observa una unión reducida de un anticuerpo monoclonal IgG CIIC1 (una IgG quimérica con Fc humano y Fab de ratón que permite la detección específica del monoclonal contra el grupo más grande de anticuerpos séricos) a FcγRIIIa con concentraciones crecientes de IgG sérica. La unión se determinó a diluciones crecientes de sueros (1:5, 1:10, 1:20 y 1:50) y en PBS para un intervalo de concentraciones de IgG monoclonal (eje x). La unión del anticuerpo monoclonal IgG CIIC1 se detectó utilizando el anticuerpo anti-(Fab)<sup>2</sup> de ratón conjugado con HRP. La Figura 6 muestra cómo la IgG sérica compite con el anticuerpo monoclonal IgG CIIC1.

#### 20 La IgG sérica es sensible a la actividad EndoS

Para demostrar que los polisacáridos biseccionados y las estructuras sialiladas fueron resistentes a EndoS, se realizó un análisis de composición de los polisacáridos ligados a N encontrados en IgG sérica humana antes (a) y después (b) de la digestión con EndoS como se describe en la sección de Materiales y Métodos. Las principales estructuras biantenarias neutras encontradas en la Ig sérica nativa (m/z en 1559, 1721, 1883) estaban totalmente ausentes en la IgG que ha sido expuesta a EndoS. En contraste, las correspondientes estructuras bisectadas (m/z 1762, 1925 y 2087 en las Figuras 2A y 2B) representaron una población menor antes de la digestión con EndoS, pero correspondieron a las especies más abundantes en IgG después de la digestión con EndoS.

El análisis espectrométrico de masas directo de los polisacáridos liberados por EndoS se realizó como se describe en la Sección de Materiales y Métodos. Las Figuras 4A y 4B muestran que se hidrolizaron estructuras neutras biantenarias (produciendo productos a m/z 1148, 1310, 1473) pero no se encontraron estructuras bisectadas detectables en el conjunto liberado. Se encontraron algunas estructuras monosialiladas en el grupo liberado (m/z 1566 y 1728) pero se encontraron como una fracción enriquecida en IgG digerida (m/z 2078 y 2280), lo que indica que estas estructuras mostraron resistencia parcial a EndoS. Consistente con la resistencia de las estructuras neutras y bisectadas, la estructura sialilada y bisectada (m/z 2280) se enriqueció significativamente como una fracción de polisacáridos residuales. La mayoría de los polisacáridos sialilados se liberaron con EndoS.

En general, estos datos muestran que los polisacáridos biseccionados son resistentes a EndoS, las estructuras sialiladas son moderadamente resistentes y la mayor población de polisacáridos biantenarios en IgG (que carecen de bisectos y ácidos siálicos) son completamente sensibles a EndoS.

#### Capacidad de los anticuerpos de tipo oligomanosa para resistir la degradación enzimática mediante EndoS

45 Para demostrar que podrían generarse anticuerpos de tipo oligomanosa que eran resistentes a EndoS, se realizaron los siguientes experimentos.

La Figura 5 muestra la resistencia de las glucoformas de Fc de tipo oligomanosa a hidrólisis mediada por EndoS. El dominio IgG-Fc recombinante se expresó en células 293T de riñón embrionario humano sin, Figura 3 (a), o con, (d), el inhibidor kifunensina como se describe en la sección de Materiales y Métodos. Esto produce un perfil biantenario típico de polisacáridos de tipo complejo como se muestra en (a) similar al perfil visto en sueros humanos como se ilustra en las Figuras 2A y 2B o produce un perfil de tipo puramente oligomanosa (d) si se utiliza el inhibidor kifunensina. La Figura 5(b) muestra cómo EndoS fue capaz de escindir completamente los polisacáridos de tipo complejo, pero no tuvo efecto en el polisacárido de tipo oligomanosa (e). La digestión con EndoS demostró la especificidad recíproca de EndoS y cómo es incapaz de escindir los polisacáridos de tipo complejo como se muestra en la Figura 5(c) con hidrólisis completa observada de la glucoforma Fc de tipo oligomanosa como se muestra en la Figura 5(f).

Para demostrar que podría utilizarse EndoS para aumentar la afinidad aparente de un AcM de tipo oligomanosa para FcγRIIIa, se realizó el siguiente experimento. FcγRIIIa (variante 158Val; R&D systems, Mineápolis, EE.UU.) a 2,5 µg/ml en PBS se recubrió en placas de microtitulación de alta unión (3690, Corning, NY, EE.UU.) durante la noche a 4 °C. Las placas recubiertas se lavaron con PBS que contenía Tween 20 al 0,05 % (Sigma-aldrich, EE.UU.) y se bloquearon durante 2 horas a temperatura ambiente con BSA al 3 % en PBS. Se agregaron luego diluciones en serie de suero humano (H4522, Sigma-Aldrich, EE.UU.) o de glucoformas de IgG1 humanas recombinantes que contienen Man<sub>9</sub>GlcNAc<sub>2</sub> o Man<sub>5</sub>GlcNAc<sub>2</sub> (concentración inicial de 0,1 mg/ml en PBS) y se dejaron unir durante 2 horas a temperatura ambiente. Las placas se lavaron cinco veces con PBS que contenía Tween al 0,05 % y se detectó la unión utilizando un fragmento Fab conjugado con HRP específico para Fab de IgG murina (ab98659, Abcam, Cambridge,

UK). Se utilizó sustrato TMB (Thermo Scientific, Rockford, IL, EE.UU.) para el desarrollo del color de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El desarrollo del color se detuvo mediante la adición de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2M y se midió la absorbancia a 450 nm en un lector de placas de múltiples paredes Spectramax M5 (Molecular Devices, California, EE.UU.). Se incubó una dilución 1:5 de suero con una dilución 1:100 de EndoS (1 mg/ml) o Endo H (500 U/μl) durante la noche a 37 °C. Las muestras de suero de control se trataron de forma simulada con PBS y se incubaron durante la noche a 37 °C. Los datos se procesaron y graficaron utilizando Prism (software GraphPad, California, EE.UU.). La afinidad aparente se calculó como la concentración de AcM de tipo oligomanosa correspondiente a la mitad de la unión máxima en la curva de unión de ELISA.

Consistente con los datos de la Figura 1, la Figura 7 muestra que el suero libre de enzimas bloqueó eficazmente la unión del AcM IgG CIIC1 tipo oligomanosa a FcγRIIIa detectado utilizando IgG anti-Fab de ratón conjugada con HRP. La unión se determinó en presencia de solo PBS, o en presencia de suero o suero más combinaciones de EndoS y EndoH. En ausencia de cualquier endoglucosidasa, el suero supera eficazmente el AcM IgG CIIC1 de tipo oligomanosa. Sin embargo, la adición de EndoS condujo a un aumento dramático en la afinidad aparente de AcM de tipo oligomanosa para FcγRIIIa con un 50 % de saturación del receptor alcanzada a aproximadamente 0,05 μM de AcM, un nivel que se aproxima al de AcM:FcR determinado para IgG en ausencia completa de suero y de acuerdo con el valor informado (0,08 μM) de esta interacción (Kanda, Y., Yamada, T., Mori, K., Okazaki, A., Inoue, M., Kitajima-Miyama, K., Kuni-Kamochi, R., Nakano, R., Yano, K., Kakita, S., Shitara, K. & Satoh, M. (2007). *Glycobiology* 17, 104-18).

Esta mejora fue una consecuencia directa de la glucosilación diferencial del suero natural y monoclonal diseñado por ingeniería genética. Esta dependencia a la glucoforma se confirmó mediante la adición de Endo H, lo que condujo a una pérdida de la unión detectable de FcγRIIIa independientemente de si los sueros de la competencia también se habían tratado o no con EndoS. Por ejemplo, el uso de glucoformas de anticuerpos de tipo oligomanosa permite que el anticuerpo terapéutico se desactive con Endo H como se demuestra en la Figura 7. EndoH podría utilizarse para la desactivación del anticuerpo terapéutico para controlar el tiempo de actividad en el cuerpo o para desactivarlo en caso de reacciones adversas del paciente.

#### Materiales y métodos

##### Expresión de proteínas y purificación de glucoformas de IgG1 de tipo oligomanosa Man<sub>9</sub>GlcNAc<sub>2</sub> y Man<sub>5</sub>GlcNAc<sub>2</sub>.

La Fc de IgG1 humana (restos 240-440, siguiendo la numeración de Edelman *et al.*; GenBank número de acceso J00228) se clonó en el vector pHLsec y se expresó de forma transitoria en células de riñón embrionario humano como se describió anteriormente (Aricescu *et al.* *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* Octubre de 2006;62(Pt 10):1243-50. Epub 19 de septiembre de 2006) con ADN mezclado con polietilénimina (PEI) en una proporción de masa de 1:1,5, respectivamente. La glucoforma Man<sub>9</sub>GlcNAc<sub>2</sub> se obtuvo mediante expresión transitoria en células 293T de riñón embrionario humano en presencia de kifunensina 5 μM, un inhibidor de la α-manosidasa de clase I (Chang VT, Crispin M, Aricescu AR, Harvey DJ, Nettleship JE, Fennelly JA, Yu C, Boles KS, Evans EJ, Stuart DI, Dwek RA, Jones EY, Owens RJ, Davis SJ. *Structure.* marzo de 2007;15(3):267-73), para generar IgG-Fc que contiene la polisacárido unido a N de oligomanosa inmadura, Man<sub>9</sub>GlcNAc<sub>2</sub>. La glucoforma Man<sub>5</sub>GlcNAc<sub>2</sub> se obtuvo mediante expresión transitoria en células de riñón embrionario humano deficientes en GlcNAc Transferasa I, Reeves, P. J., N. Callewaert, *et al.* (2002). *Proc Natl Acad Sci U S A* 99 (21): 13419-13424. El sobrenadante celular se aclaró cinco días después de la transfección y la IgG-Fc se purificó mediante cromatografía de afinidad con metales inmovilizados utilizando perlas de agarosa de Ni<sup>2+</sup> de flujo rápido quelantes de sefaroza (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK). La IgG-Fc fue desglucosilada parcialmente a 25 °C durante 12 h utilizando 75 μg ml<sup>-1</sup> de endoglucosidasa H y luego se purificó mediante cromatografía de exclusión de tamaño. La pureza de la proteína se evaluó mediante análisis SDS-PAGE y los rendimientos normales de IgG desglucosilada fueron 20 mg l<sup>-1</sup> de cultivo celular.

Se generaron anticuerpos IgG 1 de longitud completa con dominios Fc de IgG1 humanas mediante la clonación de los dominios Fab del anticuerpo monoclonal murino CIIC1 (Developmental Studies Hybridoma Bank, University of Iowa, Department of Biology, Iowa City, IA 52242) en el vector pFUSE-CHIg-hG1 (Invivogen, San Diego, California, EE.UU.). El anticuerpo CIIC1 inalterado con polisacáridos complejos y de tipo oligomanosa se expresó de forma transitoria en células de riñón embrionario humano como se describe anteriormente. La expresión exitosa de un anticuerpo de longitud completa se confirmó mediante análisis SDS-PAGE y también mediante un ensayo ELISA para determinar la unión a la proteína de Tipo II de colágeno de ratón.

##### Liberación enzimática de polisacáridos ligados a N.

Se liberaron oligosacáridos de bandas que contenían aproximadamente 10 μg de glucoproteína diana que se escindieron de geles de SDS-PAGE reductores teñidos con azul de Coomassie, se lavaron con agua y acetonitrilo alternados y se secaron en una centrifuga de vacío, seguido de rehidratación con 100 Unidades/ml de PNGasa F (New England Biolabs, MA, EE.UU.) e incubación durante 12 horas a 37 °C. Los polisacáridos unidos a N liberados enzimáticamente se eluyeron con agua. La digestión de polisacáridos con endoglucosidasa se realizó mediante la adición de 1 μg de EndoS recombinante (adquirida de Genovis AB, Lund, Suecia y también obtenida del Profesor Ben Davis, CRL, Universidad de Oxford) o 1 μl de Endo H (500U/μl, New England Biolabs, MA, e incubación durante 12

horas a 37 °C.

Espectrometría de masas de desorción/ionización (MALDI) por láser asistida por matriz-tiempo de vuelo (TOF).

5 Las soluciones acuosas de los polisacáridos generados por el método mencionado anteriormente se limpiaron con una membrana Nafion 117. Los espectros de masas de iones positivos MALDI-TOF se registraron con un Shimadzu AXIMA TOF MALDI TOF/TOF equipado con extracción retardada y un láser de nitrógeno (337 nm). La tensión de aceleración fue de 20 kV; la tensión de impulso fue de 3200 V; y el retraso para la fuente de iones de extracción retardada fue de 500 ns. Las muestras se prepararon mediante la adición de 0,5 µl de una solución acuosa de la muestra a la solución de la matriz (0,3 µl de una solución saturada de ácido 2,5-dihidroxibenzoico en acetonitrilo) en la placa diana de acero inoxidable y dejándola secar a temperatura ambiente. La mezcla de muestra/matriz se recristalizó luego en etanol.

**Ejemplo 2: Modelo en ratón**

15 Las células de la línea celular SKBR3 (una línea celular con alta expresión de HER2) se introducen por vía subcutánea en ratones. EndoS y un anticuerpo terapéutico resistente a EndoS y dirigido a HER2 (por ejemplo, Herceptin) se introducen por vía intravenosa en una dosis de 30 mg/Kg por semana, durante un período de 4 semanas. Los ratones de control no reciben ni (i) EndoS ni (ii) el anticuerpo terapéutico. El tamaño de los tumores resultantes se mide mediante calibradores.

**Ejemplo 3: Administración retardada de anticuerpos terapéuticos**

25 Un sujeto con cáncer de mama se trata con 15 mg de EndoS *i.v.* en una solución salina. Los niveles de glucosilación de IgG del paciente se controlan mediante la purificación de una muestra de IgG del paciente y la evaluación de la masa de IgG mediante SDS-PAGE. (La desglucosilación de IgG da como resultado una reducción de la masa de la IgG).

30 Después de un retraso de 2 días, el sujeto se trata con 2 mg de anticuerpo terapéutico/kg de peso corporal trastuzumab *i.v.*

**Ejemplo 4: Tratamiento extracorpóreo de la sangre**

35 La sangre de un sujeto con cáncer de mama se pasa a través de una columna EndoS a una velocidad de 250 ml/hora durante 4 horas y se devuelve al sujeto. En este momento, los niveles de IgG sérica endógena glucosilada descienden por debajo del 50 % de los niveles iniciales. El sujeto se trata posteriormente con 2 mg/kg de trastuzumab *i.v.*

LISTADO DE SECUENCIAS

40 <110> CRISPIN, Matthew David Max SCANLAN, Christopher Neil

<120> Composición de anticuerpos

<130> 489.114439/01

45

<160> 2

<170> PatentIn versión 3.5

50

<210> 1

<211> 959

<212> PRT

<213> Streptococcus pyogenes

55

<400> 1

ES 2 728 290 T3

Glu Glu Lys Thr Val Gln Val Gln Lys Gly Leu Pro Ser Ile Asp Ser  
 1 5 10 15  
 Leu His Tyr Leu Ser Glu Asn Ser Lys Lys Glu Phe Lys Glu Glu Leu  
 20 25 30  
 Ser Lys Ala Gly Gln Glu Ser Gln Lys Val Lys Glu Ile Leu Ala Lys  
 35 40 45  
 Ala Gln Gln Ala Asp Lys Gln Ala Gln Glu Leu Ala Lys Met Lys Ile  
 50 55 60  
 Pro Glu Lys Ile Pro Met Lys Pro Leu His Gly Pro Leu Tyr Gly Gly  
 65 70 75 80  
 Tyr Phe Arg Thr Trp His Asp Lys Thr Ser Asp Pro Thr Glu Lys Asp  
 85 90 95  
 Lys Val Asn Ser Met Gly Glu Leu Pro Lys Glu Val Asp Leu Ala Phe  
 100 105 110  
 Ile Phe His Asp Trp Thr Lys Asp Tyr Ser Leu Phe Trp Lys Glu Leu  
 115 120 125  
 Ala Thr Lys His Val Pro Lys Leu Asn Lys Gln Gly Thr Arg Val Ile  
 130 135 140  
 Arg Thr Ile Pro Trp Arg Phe Leu Ala Gly Gly Asp Asn Ser Gly Ile  
 145 150 155 160  
 Ala Glu Asp Thr Ser Lys Tyr Pro Asn Thr Pro Glu Gly Asn Lys Ala  
 165 170 175

ES 2 728 290 T3

Leu Ala Lys Ala Ile Val Asp Glu Tyr Val Tyr Lys Tyr Asn Leu Asp  
 180 185 190

Gly Leu Asp Val Asp Val Glu His Asp Ser Ile Pro Lys Val Asp Lys  
 195 200 205

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

Ile Gly Lys Leu Ile Gly Pro Lys Gly Val Asp Lys Ser Arg Leu Phe  
 225 230 235 240

Ile Met Asp Ser Thr Tyr Met Ala Asp Lys Asn Pro Leu Ile Glu Arg  
 245 250 255

Gly Ala Pro Tyr Ile Asn Leu Leu Leu Val Gln Val Tyr Gly Ser Gln  
 260 265 270

Gly Glu Lys Gly Gly Trp Glu Pro Val Ser Asn Arg Pro Glu Lys Thr  
 275 280 285

Met Glu Glu Arg Trp Gln Gly Tyr Ser Lys Tyr Ile Arg Pro Glu Gln  
 290 295 300

Tyr Met Ile Gly Phe Ser Phe Tyr Glu Glu Asn Ala Gln Glu Gly Asn  
 305 310 315 320

Leu Trp Tyr Asp Ile Asn Ser Arg Lys Asp Glu Asp Lys Ala Asn Gly  
 325 330 335

Ile Asn Thr Asp Ile Thr Gly Thr Arg Ala Glu Arg Tyr Ala Arg Trp  
 340 345 350

Gln Pro Lys Thr Gly Gly Val Lys Gly Gly Ile Phe Ser Tyr Ala Ile  
 355 360 365

Asp Arg Asp Gly Val Ala His Gln Pro Lys Lys Tyr Ala Lys Gln Lys  
 370 375 380

Glu Phe Lys Asp Ala Thr Asp Asn Ile Phe His Ser Asp Tyr Ser Val  
 385 390 395 400

Ser Lys Ala Leu Lys Thr Val Met Leu Lys Asp Lys Ser Tyr Asp Leu  
 405 410 415

Ile Asp Glu Lys Asp Phe Pro Asp Lys Ala Leu Arg Glu Ala Val Met  
 420 425 430

ES 2 728 290 T3

Ala Gln Val Gly Thr Arg Lys Gly Asp Leu Glu Arg Phe Asn Gly Thr  
 435 440 445

Leu Arg Leu Asp Asn Pro Ala Ile Gln Ser Leu Glu Gly Leu Asn Lys  
 450 455 460

Phe Lys Lys Leu Ala Gln Leu Asp Leu Ile Gly Leu Ser Arg Ile Thr  
 465 470 475 480

Lys Leu Asp Arg Ser Val Leu Pro Ala Asn Met Lys Pro Gly Lys Asp  
 485 490 495

Thr Leu Glu Thr Val Leu Glu Thr Tyr Lys Lys Asp Asn Lys Glu Glu  
 500 505 510

Pro Ala Thr Ile Pro Pro Val Ser Leu Lys Val Ser Gly Leu Thr Gly  
 515 520 525

Leu Lys Glu Leu Asp Leu Ser Gly Phe Asp Arg Glu Thr Leu Ala Gly  
 530 535 540

Leu Asp Ala Ala Thr Leu Thr Ser Leu Glu Lys Val Asp Ile Ser Gly  
 545 550 555 560

Asn Lys Leu Asp Leu Ala Pro Gly Thr Glu Asn Arg Gln Ile Phe Asp  
 565 570 575

Thr Met Leu Ser Thr Ile Ser Asn His Val Gly Ser Asn Glu Gln Thr  
 580 585 590

Val Lys Phe Asp Lys Gln Lys Pro Thr Gly His Tyr Pro Asp Thr Tyr  
 595 600 605

Gly Lys Thr Ser Leu Arg Leu Pro Val Ala Asn Glu Lys Val Asp Leu  
 610 615 620

Gln Ser Gln Leu Leu Phe Gly Thr Val Thr Asn Gln Gly Thr Leu Ile  
 625 630 635 640

Asn Ser Glu Ala Asp Tyr Lys Ala Tyr Gln Asn His Lys Ile Ala Gly  
 645 650 655

Arg Ser Phe Val Asp Ser Asn Tyr His Tyr Asn Asn Phe Lys Val Ser  
 660 665 670

Tyr Glu Asn Tyr Thr Val Lys Val Thr Asp Ser Thr Leu Gly Thr Thr

ES 2 728 290 T3

675	680	685																	
Thr	Asp	Lys	Thr	Leu	Ala	Thr	Asp	Lys	Glu	Glu	Thr	Tyr	Lys	Val	Asp				
690						695					700								
Phe	Phe	Ser	Pro	Ala	Asp	Lys	Thr	Lys	Ala	Val	His	Thr	Ala	Lys	Val				
705					710					715					720				
Ile	Val	Gly	Asp	Glu	Lys	Thr	Met	Met	Val	Asn	Leu	Ala	Glu	Gly	Ala				
				725					730					735					
Thr	Val	Ile	Gly	Gly	Ser	Ala	Asp	Pro	Val	Asn	Ala	Arg	Lys	Val	Phe				
			740					745					750						
Asp	Gly	Gln	Leu	Gly	Ser	Glu	Thr	Asp	Asn	Ile	Ser	Leu	Gly	Trp	Asp				
		755						760				765							
Ser	Lys	Gln	Ser	Ile	Ile	Phe	Lys	Leu	Lys	Glu	Asp	Gly	Leu	Ile	Lys				
	770					775					780								
His	Trp	Arg	Phe	Phe	Asn	Asp	Ser	Ala	Arg	Asn	Pro	Glu	Thr	Thr	Asn				
785					790					795					800				
Lys	Pro	Ile	Gln	Glu	Ala	Ser	Leu	Gln	Ile	Phe	Asn	Ile	Lys	Asp	Tyr				
				805					810					815					
Asn	Leu	Asp	Asn	Leu	Leu	Glu	Asn	Pro	Asn	Lys	Phe	Asp	Asp	Glu	Lys				
			820					825					830						
Tyr	Trp	Ile	Thr	Val	Asp	Thr	Tyr	Ser	Ala	Gln	Gly	Glu	Arg	Ala	Thr				
		835					840					845							
Ala	Phe	Ser	Asn	Thr	Leu	Asn	Asn	Ile	Thr	Ser	Lys	Tyr	Trp	Arg	Val				
	850					855					860								
Val	Phe	Asp	Thr	Lys	Gly	Asp	Arg	Tyr	Ser	Ser	Pro	Val	Val	Pro	Glu				
865					870					875					880				
Leu	Gln	Ile	Leu	Gly	Tyr	Pro	Leu	Pro	Asn	Ala	Asp	Thr	Ile	Met	Lys				
				885					890					895					
Thr	Val	Thr	Thr	Ala	Lys	Glu	Leu	Ser	Gln	Gln	Lys	Asp	Lys	Phe	Ser				
			900					905					910						
Gln	Lys	Met	Leu	Asp	Glu	Leu	Lys	Ile	Lys	Glu	Met	Ala	Leu	Glu	Thr				
		915					920					925							

ES 2 728 290 T3

Ser Leu Asn Ser Lys Ile Phe Asp Val Thr Ala Ile Asn Ala Asn Ala  
 930 935 940

Gly Val Leu Lys Asp Cys Ile Glu Lys Arg Gln Leu Leu Lys Lys  
 945 950 955

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

5

<400> 2

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

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

Thr Val Lys Ala Glu Glu Lys Thr Val Gln Val Gln Lys Gly Leu Pro  
 35 40 45

Ser Ile Asp Ser Leu His Tyr Leu Ser Glu Asn Ser Lys Lys Glu Phe  
 50 55 60

Lys Glu Glu Leu Ser Lys Ala Gly Gln Glu Ser Gln Lys Val Lys Glu  
 65 70 75 80

Ile Leu Ala Lys Ala Gln Gln Ala Asp Lys Gln Ala Gln Glu Leu Ala  
 85 90 95

Lys Met Lys Ile Pro Glu Lys Ile Pro Met Lys Pro Leu His Gly Pro  
 100 105 110

Leu Tyr Gly Gly Tyr Phe Arg Thr Trp His Asp Lys Thr Ser Asp Pro  
 115 120 125

Thr Glu Lys Asp Lys Val Asn Ser Met Gly Glu Leu Pro Lys Glu Val  
 130 135 140

Asp Leu Ala Phe Ile Phe His Asp Trp Thr Lys Asp Tyr Ser Leu Phe  
 145 150 155 160

Trp Lys Glu Leu Ala Thr Lys His Val Pro Lys Leu Asn Lys Gln Gly  
 165 170 175

Thr Arg Val Ile Arg Thr Ile Pro Trp Arg Phe Leu Ala Gly Gly Asp  
 180 185 190

10

ES 2 728 290 T3

Asn Ser Gly Ile Ala Glu Asp Thr Ser Lys Tyr Pro Asn Thr Pro Glu  
 195 200 205  
 Gly Asn Lys Ala Leu Ala Lys Ala Ile Val Asp Glu Tyr Val Tyr Lys  
 210 215 220  
 Tyr Asn Leu Asp Gly Leu Asp Val Asp Val Glu His Asp Ser Ile Pro  
 225 230 235 240  
 Lys Val Asp Lys Lys Glu Asp Thr Ala Gly Val Glu Arg Ser Ile Gln  
 245 250 255  
 Val Phe Glu Glu Ile Gly Lys Leu Ile Gly Pro Lys Gly Val Asp Lys  
 260 265 270  
 Ser Arg Leu Phe Ile Met Asp Ser Thr Tyr Met Ala Asp Lys Asn Pro  
 275 280 285  
 Leu Ile Glu Arg Gly Ala Pro Tyr Ile Asn Leu Leu Leu Val Gln Val  
 290 295 300  
 Tyr Gly Ser Gln Gly Glu Lys Gly Gly Trp Glu Pro Val Ser Asn Arg  
 305 310 315 320  
 Pro Glu Lys Thr Met Glu Glu Arg Trp Gln Gly Tyr Ser Lys Tyr Ile  
 325 330 335  
 Arg Pro Glu Gln Tyr Met Ile Gly Phe Ser Phe Tyr Glu Glu Asn Ala  
 340 345 350  
 Gln Glu Gly Asn Leu Trp Tyr Asp Ile Asn Ser Arg Lys Asp Glu Asp  
 355 360 365  
 Lys Ala Asn Gly Ile Asn Thr Asp Ile Thr Gly Thr Arg Ala Glu Arg  
 370 375 380  
 Tyr Ala Arg Trp Gln Pro Lys Thr Gly Gly Val Lys Gly Gly Ile Phe  
 385 390 395 400  
 Ser Tyr Ala Ile Asp Arg Asp Gly Val Ala His Gln Pro Lys Lys Tyr  
 405 410 415  
 Ala Lys Gln Lys Glu Phe Lys Asp Ala Thr Asp Asn Ile Phe His Ser  
 420 425 430  
 Asp Tyr Ser Val Ser Lys Ala Leu Lys Thr Val Met Leu Lys Asp Lys  
 435 440 445

ES 2 728 290 T3

Ser Tyr Asp Leu Ile Asp Glu Lys Asp Phe Pro Asp Lys Ala Leu Arg  
450 455 460

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

Phe Asn Gly Thr Leu Arg Leu Asp Asn Pro Ala Ile Gln Ser Leu Glu  
485 490 495

Gly Leu Asn Lys Phe Lys Lys Leu Ala Gln Leu Asp Leu Ile Gly Leu  
500 505 510

Ser Arg Ile Thr Lys Leu Asp Arg Ser Val Leu Pro Ala Asn Met Lys  
515 520 525

Pro Gly Lys Asp Thr Leu Glu Thr Val Leu Glu Thr Tyr Lys Lys Asp  
530 535 540

Asn Lys Glu Glu Pro Ala Thr Ile Pro Pro Val Ser Leu Lys Val Ser  
545 550 555 560

Gly Leu Thr Gly Leu Lys Glu Leu Asp Leu Ser Gly Phe Asp Arg Glu  
565 570 575

Thr Leu Ala Gly Leu Asp Ala Ala Thr Leu Thr Ser Leu Glu Lys Val  
580 585 590

Asp Ile Ser Gly Asn Lys Leu Asp Leu Ala Pro Gly Thr Glu Asn Arg  
595 600 605

Gln Ile Phe Asp Thr Met Leu Ser Thr Ile Ser Asn His Val Gly Ser  
610 615 620

Asn Glu Gln Thr Val Lys Phe Asp Lys Gln Lys Pro Thr Gly His Tyr  
625 630 635 640

Pro Asp Thr Tyr Gly Lys Thr Ser Leu Arg Leu Pro Val Ala Asn Glu  
645 650 655

Lys Val Asp Leu Gln Ser Gln Leu Leu Phe Gly Thr Val Thr Asn Gln  
660 665 670

Gly Thr Leu Ile Asn Ser Glu Ala Asp Tyr Lys Ala Tyr Gln Asn His  
675 680 685

Lys Ile Ala Gly Arg Ser Phe Val Asp Ser Asn Tyr His Tyr Asn Asn  
690 695 700

ES 2 728 290 T3

Phe Lys Val Ser Tyr Glu Asn Tyr Thr Val Lys Val Thr Asp Ser Thr  
 705 710 715 720  
 Leu Gly Thr Thr Thr Asp Lys Thr Leu Ala Thr Asp Lys Glu Glu Thr  
 725 730 735  
 Tyr Lys Val Asp Phe Phe Ser Pro Ala Asp Lys Thr Lys Ala Val His  
 740 745 750  
 Thr Ala Lys Val Ile Val Gly Asp Glu Lys Thr Met Met Val Asn Leu  
 755 760 765  
 Ala Glu Gly Ala Thr Val Ile Gly Gly Ser Ala Asp Pro Val Asn Ala  
 770 775 780  
 Arg Lys Val Phe Asp Gly Gln Leu Gly Ser Glu Thr Asp Asn Ile Ser  
 785 790 795 800  
 Leu Gly Trp Asp Ser Lys Gln Ser Ile Ile Phe Lys Leu Lys Glu Asp  
 805 810 815  
 Gly Leu Ile Lys His Trp Arg Phe Phe Asn Asp Ser Ala Arg Asn Pro  
 820 825 830  
 Glu Thr Thr Asn Lys Pro Ile Gln Glu Ala Ser Leu Gln Ile Phe Asn  
 835 840 845  
 Ile Lys Asp Tyr Asn Leu Asp Asn Leu Leu Glu Asn Pro Asn Lys Phe  
 850 855 860  
 Asp Asp Glu Lys Tyr Trp Ile Thr Val Asp Thr Tyr Ser Ala Gln Gly  
 865 870 875 880  
 Glu Arg Ala Thr Ala Phe Ser Asn Thr Leu Asn Asn Ile Thr Ser Lys  
 885 890 895  
 Tyr Trp Arg Val Val Phe Asp Thr Lys Gly Asp Arg Tyr Ser Ser Pro  
 900 905 910  
 Val Val Pro Glu Leu Gln Ile Leu Gly Tyr Pro Leu Pro Asn Ala Asp  
 915 920 925  
 Thr Ile Met Lys Thr Val Thr Thr Ala Lys Glu Leu Ser Gln Gln Lys  
 930 935 940  
 Asp Lys Phe Ser Gln Lys Met Leu Asp Glu Leu Lys Ile Lys Glu Met

ES 2 728 290 T3

945						950											960
Ala	Leu	Glu	Thr	Ser	Leu	Asn	Ser	Lys	Ile	Phe	Asp	Val	Thr	Ala	Ile		
				965					970					975			
Asn	Ala	Asn	Ala	Gly	Val	Leu	Lys	Asp	Cys	Ile	Glu	Lys	Arg	Gln	Leu		
			980					985					990				
Leu	Lys	Lys															
		995															

## REIVINDICACIONES

1. Un agente que reduce la unión al receptor Fc mediante degradación enzimática de anticuerpos séricos endógenos para su uso en un método para tratar una enfermedad, en donde el agente es una endoglucosidasa, una proteasa o una proteína N-glucanasa y el método aumenta la potencia terapéutica de un anticuerpo, en donde el modo de acción de dicho anticuerpo se basa en la interacción Fc:FcR, y en donde el método comprende las etapas:
- (a) administrar dicho agente a un sujeto; y posteriormente,  
 (b) después de un intervalo de tiempo establecido, administrar dicho anticuerpo al sujeto.
2. El agente para su uso de la reivindicación 1, en donde la enfermedad es cáncer, infección o autoinmunidad.
3. El agente para su uso de la reivindicación 2, en donde el cáncer es Leucemia linfoblástica aguda, Leucemia mieloide aguda, Carcinoma adrenocortical, Cánceres relacionados con SIDA, Linfoma relacionado con SIDA, Cáncer de ano, Cáncer de apéndice, Astrocitoma, cerebelar o cerebral de la infancia, Carcinoma de células basales, Cáncer del conducto biliar, extrahepático, Cáncer de vejiga, Cáncer óseo, Osteosarcoma/histiocitoma fibroso maligno, Glioma del tronco encefálico, Cáncer de cerebro, Tumor cerebral, astrocitoma cerebeloso, Tumor cerebral, astrocitoma cerebral/glioma maligno, Tumor cerebral, ependimoma, Tumor cerebral, meduloblastoma, Tumor cerebral, tumores neuroectodérmicos primitivos supratentoriales, Tumor cerebral, glioma de la vía óptica e hipotalámico, Cáncer de mama, Adenomas bronquiales/carcinoides, Linfoma de Burkitt, Tumores carcinoides, Tumores carcinoides, gastrointestinal, Carcinoma de sitio primario desconocido, Linfoma del sistema nervioso central, Astrocitoma cerebeloso, Astrocitoma cerebral/Glioma maligno, Cáncer de cuello uterino, Leucemia linfocítica crónica, Leucemia mielógena crónica, Trastornos mieloproliferativos crónicos, Cáncer de colon, Linfoma cutáneo de linfocitos T, Tumor desmoplásico de células redondas pequeñas, Cáncer endometrial, Ependimoma, Cáncer de esófago, Sarcoma de Ewing en la familia de tumores Ewing, Tumor de células germinales extracraneales, infantil, Tumor de células germinales extragonadales, Cáncer del conducto biliar extrahepático, Cáncer ocular, Melanoma intraocular, Cáncer ocular, Retinoblastoma, Cáncer de vesícula biliar, Cáncer gástrico (estómago), Tumor carcinoide gastrointestinal, Tumor del estroma gastrointestinal (GIST), Tumor de células germinales: extracraneal, extragonadal u ovárico, Tumor trofoblástico gestacional, Glioma del tronco encefálico, Glioma, Astrocitoma cerebral infantil, Glioma, de Vía óptica e Hipotalámica Infantil, Carcinoide gástrico, Tricoleucemia, Cáncer de cabeza y cuello, Cáncer cardíaco, Cáncer hepatocelular (hígado), Linfoma de Hodgkin, Cáncer hipofaríngeo, Glioma hipotalámico y de la vía óptica, Melanoma intraocular, Carcinoma de células de islote (páncreas), sarcoma de Kaposi, Cáncer renal (cáncer de células renales), Cáncer de laringe, Leucemias, Leucemia, linfoblástica aguda (también llamada leucemia linfocítica aguda), Leucemia, mieloide aguda (también llamada leucemia mielógena aguda), Leucemia, linfocítica crónica (también llamada leucemia linfocítica crónica), Leucemia, mielógena crónica (también llamada leucemia mieloide crónica), Leucemia, células pilosas, Cáncer de labio y de la cavidad oral, Liposarcoma, Cáncer de hígado (Primario), Cáncer de pulmón, Cáncer de pulmón no microcítico, microcítico, Linfomas, Linfoma, relacionado con SIDA, Linfoma, de Burkitt, Linfoma, cutáneo de linfocitos T, Linfoma, de Hodgkin, Linfomas, No-Hodgkinianos (una antigua clasificación de todos los linfomas excepto los de Hodgkin), Linfoma, Sistema nervioso central primario, Macroglobulinemia, de Waldenström, Histiocitoma fibroso maligno de hueso/osteosarcoma, Meduloblastoma, Melanoma, Melanoma, Intraocular (ojo), Carcinoma de células de Merkel, Mesotelioma, Maligno del Adulto, Mesotelioma, Cáncer de cuello escamoso metastásico con tumor primario oculto, Cáncer de boca, Síndrome de neoplasia endocrina múltiple, mieloma múltiple/neoplasia de células plasmáticas, Micosis fungoides, Síndromes mielodisplásicos, Enfermedades Mielodisplásicas/Mieloproliferativas, Leucemia mielógena, crónica, leucemia mieloide, aguda de adulto, leucemia mieloide, aguda infantil, Mieloma, Múltiple (cáncer de Médula Ósea), Trastornos mieloproliferativos, Cáncer de la cavidad nasal y del seno paranasal, Carcinoma nasofaríngeo, Neuroblastoma, Linfoma no de Hodgkin, Cáncer no microcítico de pulmón, Cáncer oral, Cáncer orofaríngeo, Osteosarcoma/histiocitoma fibroso maligno de hueso, Cáncer de ovarios, Cáncer epitelial de ovarios (Tumor epitelial superficial-estromal), Tumor de células germinales ováricas, Tumor ovárico de bajo potencial maligno, Cáncer de páncreas, Cáncer de páncreas, Célula de los islotes, Cáncer del seno paranasal y de la cavidad nasal, Cáncer paratiroideo, Cáncer de pene, Cáncer faríngeo, Feocromocitoma, Astrocitoma pineal, Germinoma pineal, Pineoblastoma y tumores neuroectodérmicos primitivos supratentoriales, Adenoma pituitario, Neoplasia de células plasmáticas/Mieloma múltiple, Blastoma pleuropulmonar, Linfoma primario del sistema nervioso central, Cáncer de próstata, Cáncer de recto, Carcinoma de células renales (cáncer de riñón), de la pelvis renal y el uréter, cáncer de células de transición, Retinoblastoma, Rabdomiosarcoma, Cáncer de las glándulas salivales, Sarcoma, Familia de tumores de Ewing, Sarcoma de Kaposi, Sarcoma, tejidos blandos, Sarcoma, uterino, Síndrome de Sézary, Cáncer de piel (no melanoma), Cáncer de piel (melanoma), Carcinoma de piel, células de Merkel, Cáncer microcítico de pulmón, Cáncer del intestino delgado, Sarcoma de tejidos blandos, Carcinoma de células escamosas, Cáncer escamoso de cuello con primario oculto, metastásico, Cáncer de estómago, Tumores neuroectodérmicos primitivos supratentoriales, Linfoma de linfocitos T, cutáneo - véase Micosis fungoides y síndrome de Sézary, Cáncer de testículos, Cáncer de garganta, Timoma, Timoma y Carcinoma tímico, Cáncer de tiroides, Cáncer de tiroides, Cáncer de células transicionales de la pelvis renal y el uréter, Tumor trofoblástico, Cáncer de células transicionales de la pelvis renal y el uréter, Cáncer uretral, Cáncer de útero, endometrial, Sarcoma uterino, Cáncer de vagina, Glioma de la vía óptica e hipotalámico, Cáncer de vulva, Macroglobulinemia de Waldenström y tumor de Wilms (cáncer de riñón).
4. El agente para su uso de la reivindicación 2, en donde el cáncer es cáncer de vejiga, cáncer de pulmón, cáncer de

mama, melanoma, cáncer de colon, cáncer rectal, linfoma no de Hodgkin, cáncer de endometrio, cáncer de páncreas, cáncer de riñón (células renales), cáncer de próstata, leucemia, cáncer de tiroides y cáncer de esófago, preferentemente cáncer de mama.

- 5 5. El agente para su uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el agente y el anticuerpo están presentes como una preparación combinada para su uso secuencial.
6. El agente para su uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde el intervalo de tiempo establecido es 1-2, 1-5, 1-10 o 1-20 días.
- 10 7. El agente para su uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde el método comprende las etapas de:
- 15 (a) tratar la sangre del sujeto *ex vivo* con el agente;  
(b) devolver la sangre tratada al sujeto; y posteriormente  
(c) administrar dicho anticuerpo al sujeto.
8. El agente para su uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde la endoglucosidasa es endoglucosidasa S (EndoS) o endoglucosidasa F3 o endoglucosidasa Ebeta, o en donde la proteasa es IdeS.
- 20 9. El agente para su uso de la reivindicación 8, en donde el agente es EndoS o IdeS.
10. El agente para su uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde dicho anticuerpo es Natalizumab, Vedolizumab, Belimumab, Atacicept, Alefacept, Otelixizumab, Teplizumab, Rituximab, Ofatumumab, Ocrelizumab, Epratuzumab, Alemtuzumab, Abatacept, Eculizumab, Omalizumab, Canakinumab, Meplizumab, Reslizumab, Tocilizumab, Ustekinumab, Briakinumab, Etanercept, Infliximab, Adalimumab, Certolizumab pegol, Golimumab, Trastuzumab, Gemtuzumab, Ozogamicin, Ibritumomab, Tiuxetan, Tositumomab, Cetuximab, Bevacizumab, Panitumumab, Denosumab, Ipilimumab, Brentuximab y Vedotin.
- 25 11. El agente para su uso de la reivindicación 10, en donde dicho anticuerpo es Trastuzumab.
- 30

Figura 1

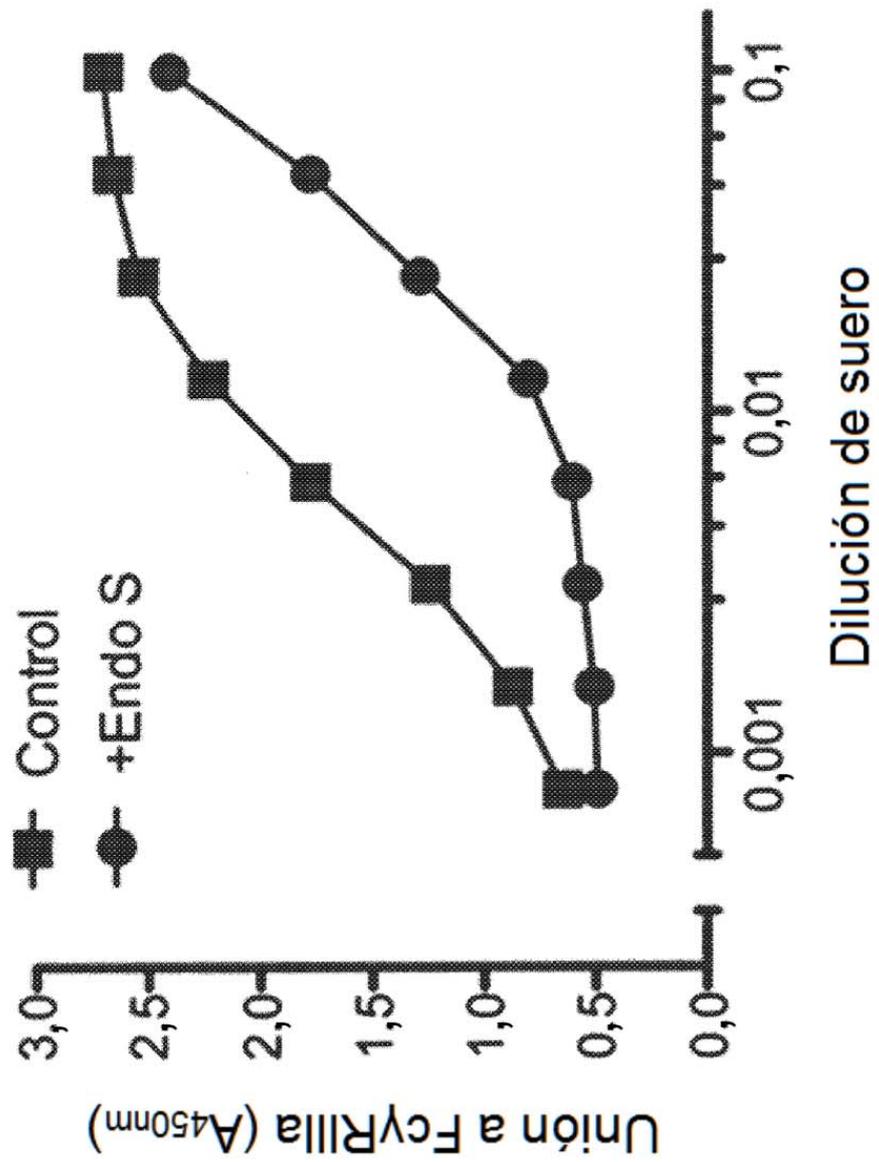


Figura 2A

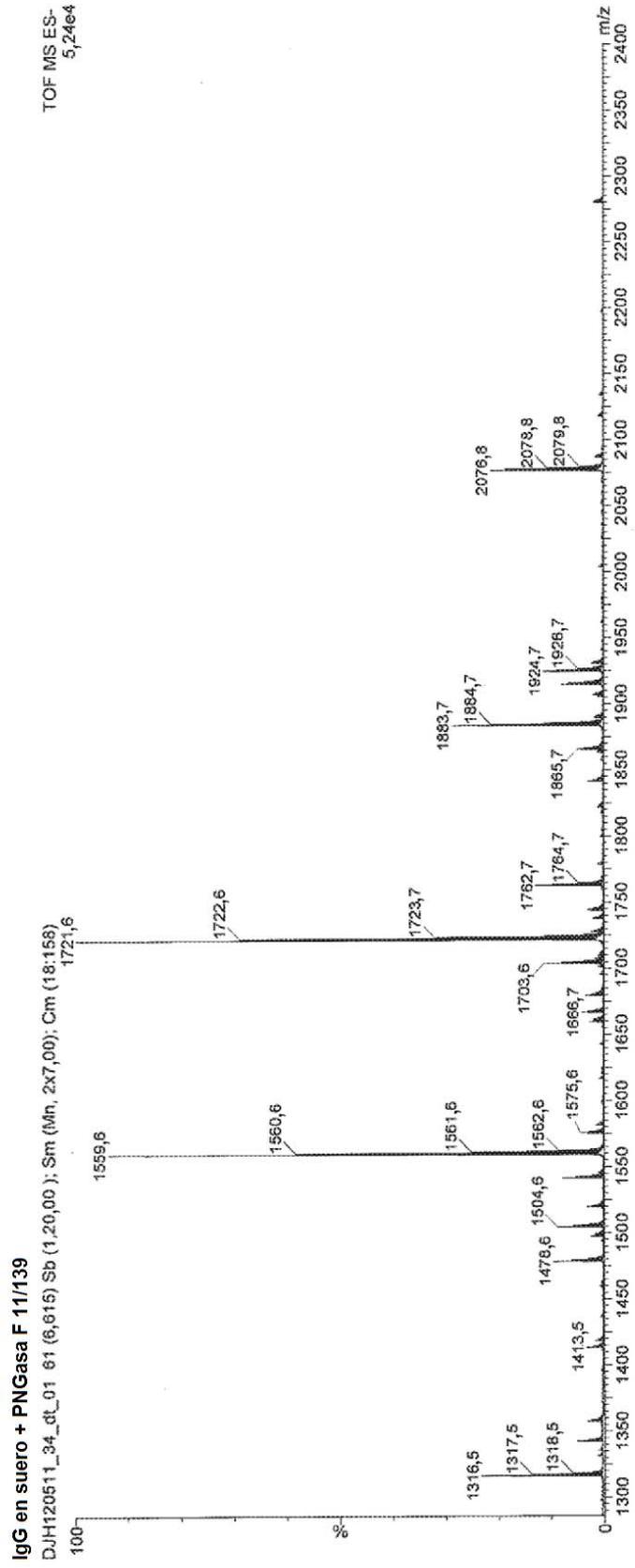


Figura 2B

<i>m/z</i> ([M+H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ] <sup>-</sup> )		Composición				Estructura
Encontrado	Calc.	Hex	HexNAc	Fuc	Neu5Ac	
1413,4	1413,5	3	4	0	0	
1559,5	1559,5	3	4	1	0	
1575,5	1575,5	4	4	0	0	
1616,5	1616,5	3	5	0	0	
1721,6	1721,6	4	4	1	0	
1737,6	1737,6	5	4	0	0	
1762,6	1762,6	3	5	1	0	
1778,6	1778,6	4	5	0	0	
1883,6	1883,6	5	4	1	0	
1914,7	1914,7	4	4	1	1	
1924,7	1924,6	4	5	1	0	
1930,7	1930,7	5	4	0	1	
1940,6	1940,6	5	5	0	0	
2076,7	2076,7	5	4	1	1	
2086,7	2086,7	5	5	1	0	
2133,7	2133,8	5	5	0	1	
2279,8	2279,8	5	5	1	1	
2389,8	2389,8	5	4	1	2(Na)	

Figura 3A

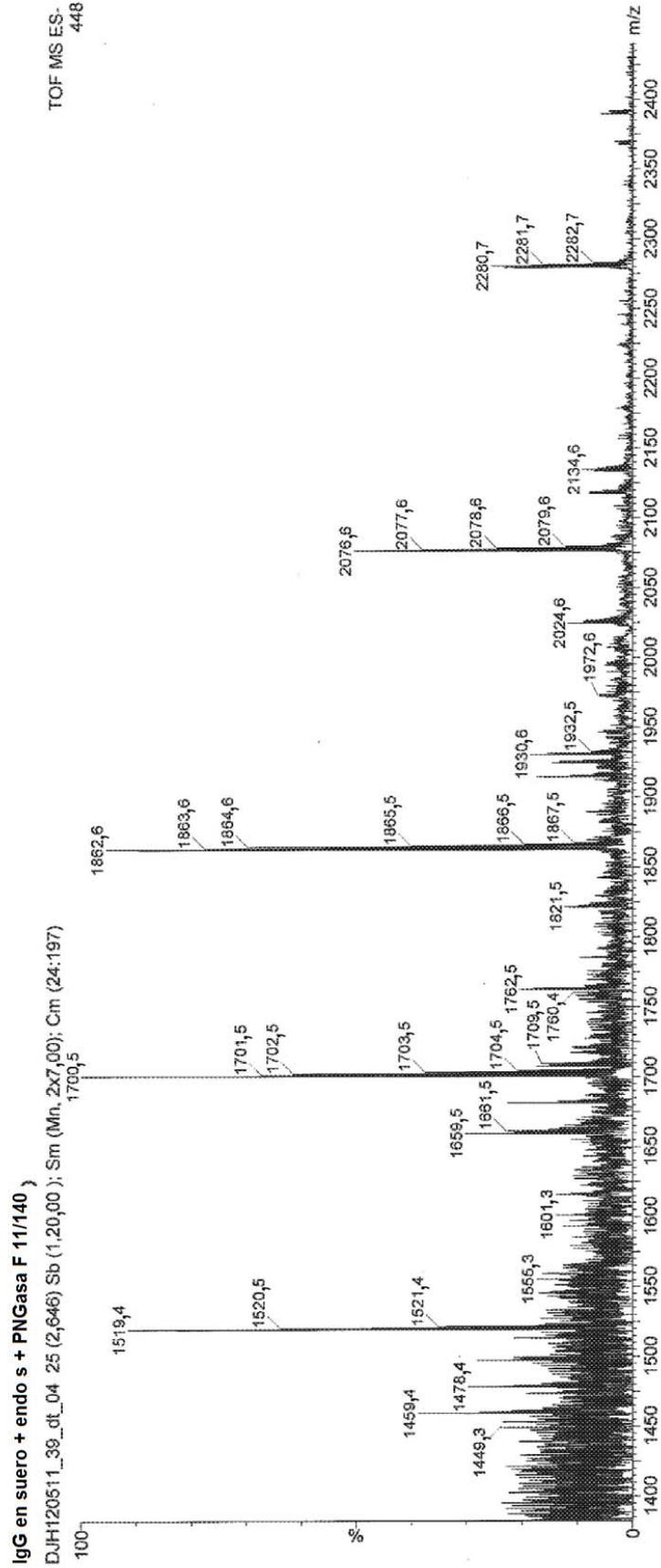


Figura 3B

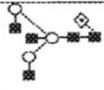
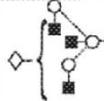
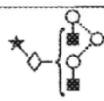
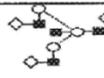
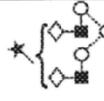
<i>m/z</i> ([M+H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> <sup>-</sup> ])		Composición				Estructura
Encontrado	Calc.	Hex	HexNAc	Fuc	Neu5Ac	
1700,6	1700,6	3	5	1	0	
1862,6	1862,6	4	5	1	0	
1914,7	1914,7	4	4	1	1	
2024,7	2024,7	5	5	1	0	
2076,6	2076,7	5	4	1	1	
2279,8	2279,8	5	5	1	1	
2389,8	2389,8	5	4	1	2(Na)	

Figura 4A

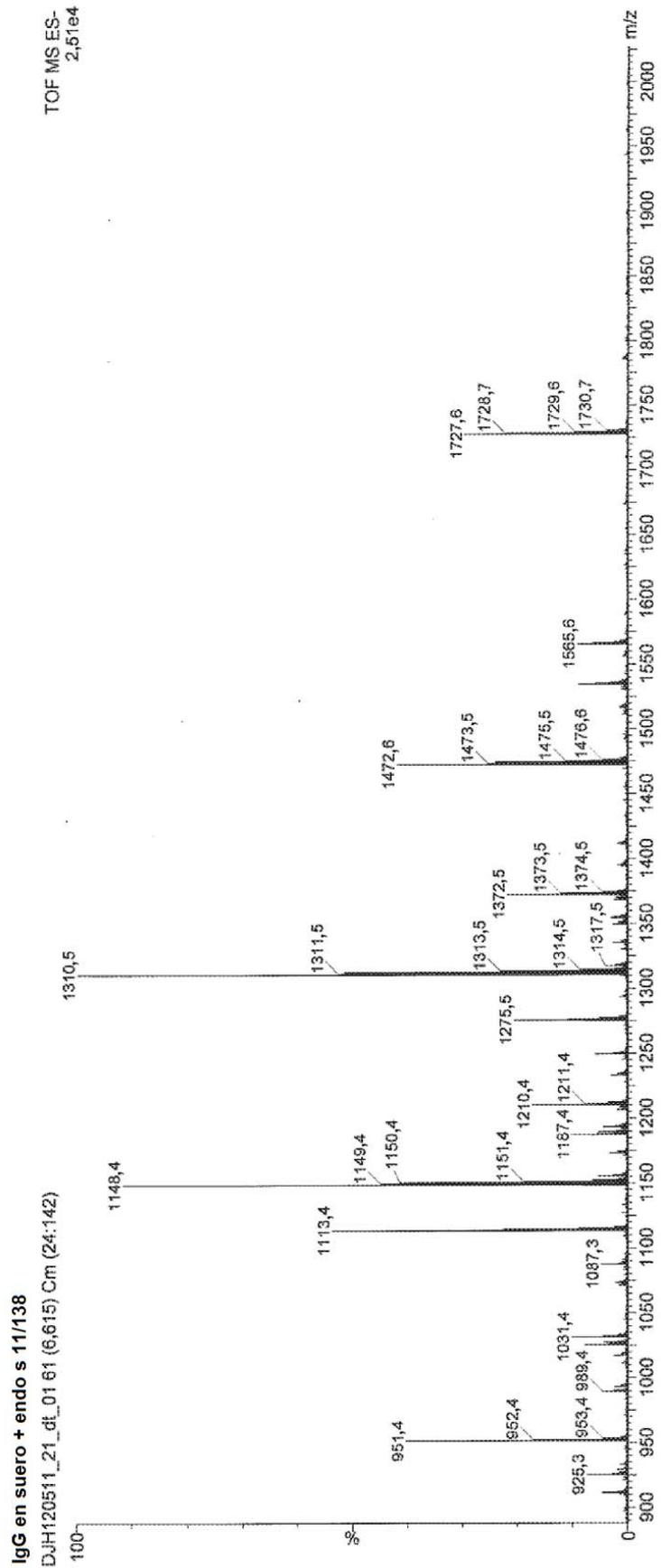


Figura 4B

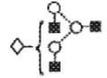
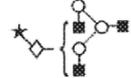
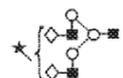
$m/z$ ( $[M+H_2PO_4]^-$ )		Composición			Estructura	Fragmentado
Encontrado	Calc.	Hex	HexNAc	Neu5Ac		
1148,4	1148,4	3	3	0		+
1310,5	1310,5	4	3	0		+
1472,6	1472,6	5	3	0		+
1565,6	1565,6	4	3	1		+
1727,6	1727,6	5	3	1		+

Figura 5

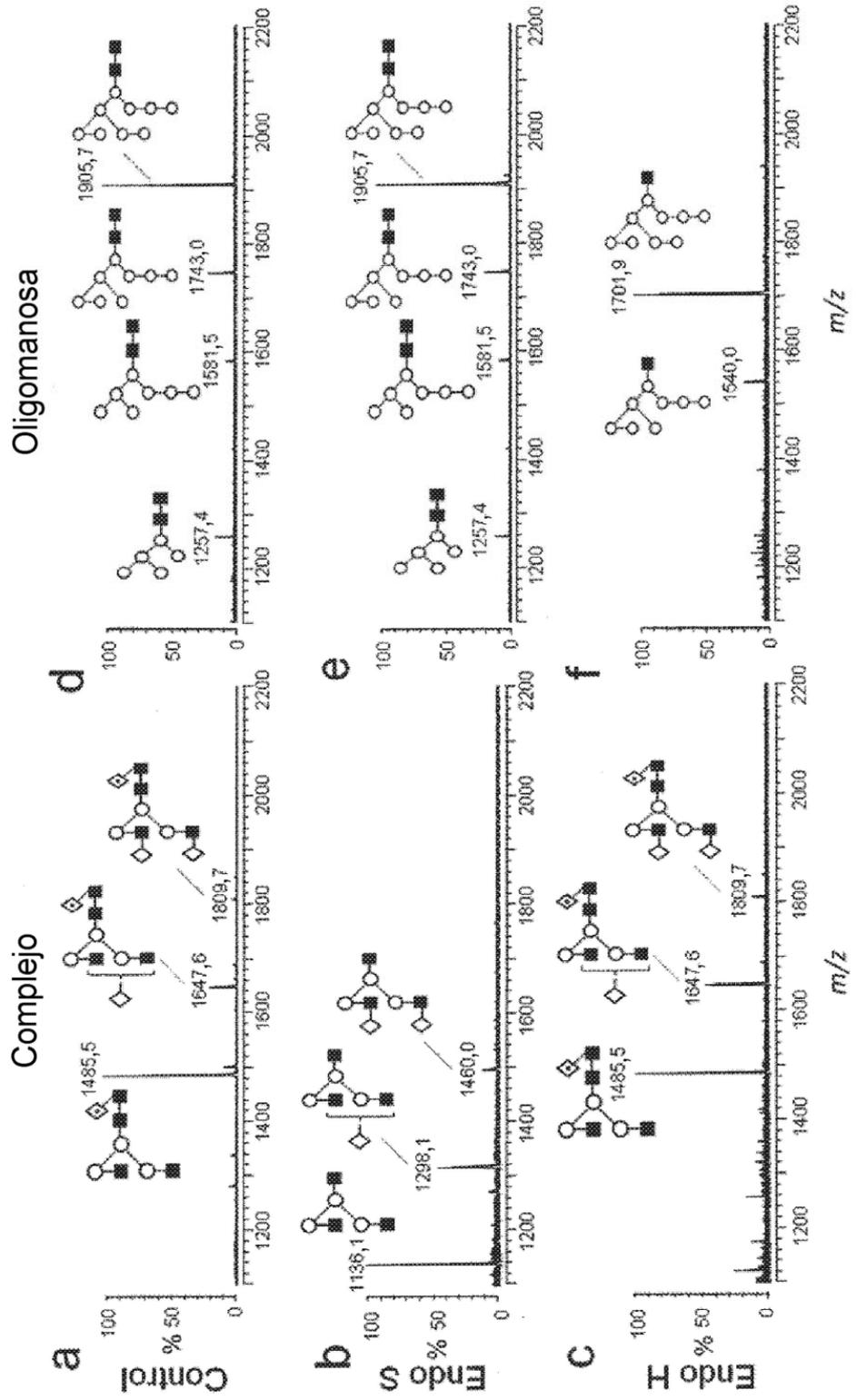


Figura 6

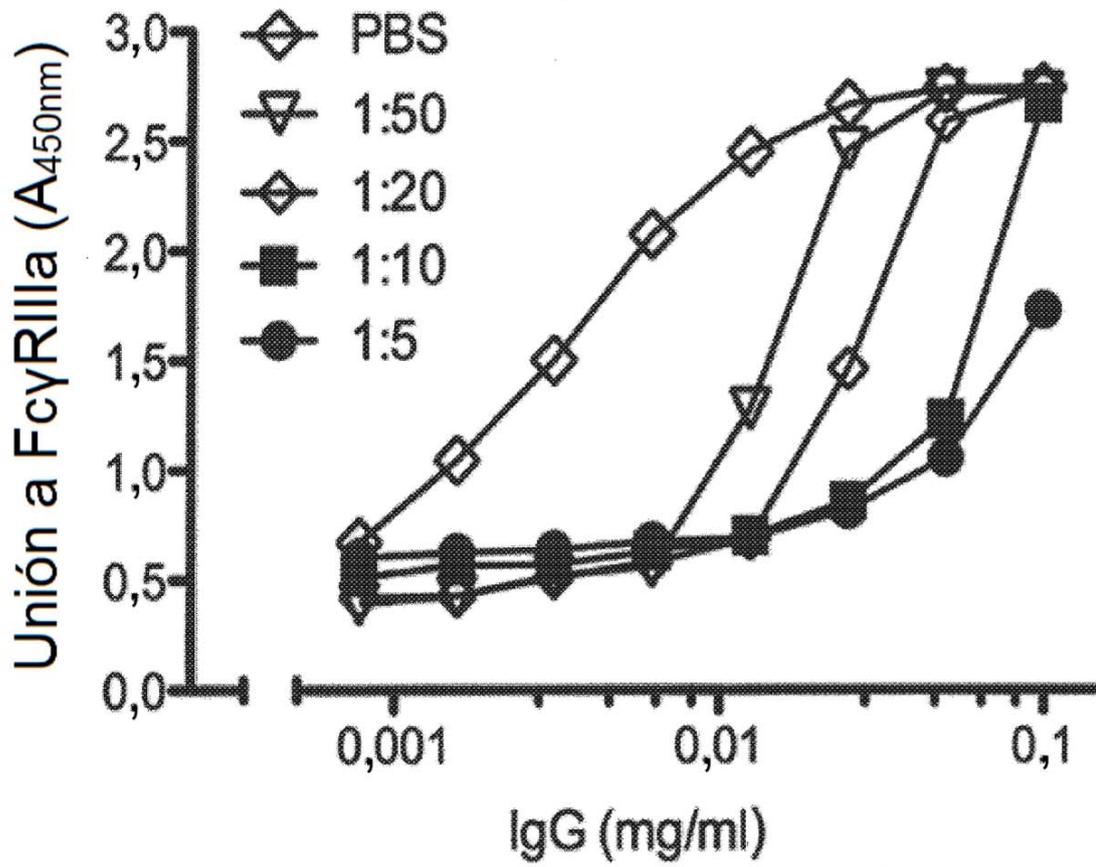


Figura 7

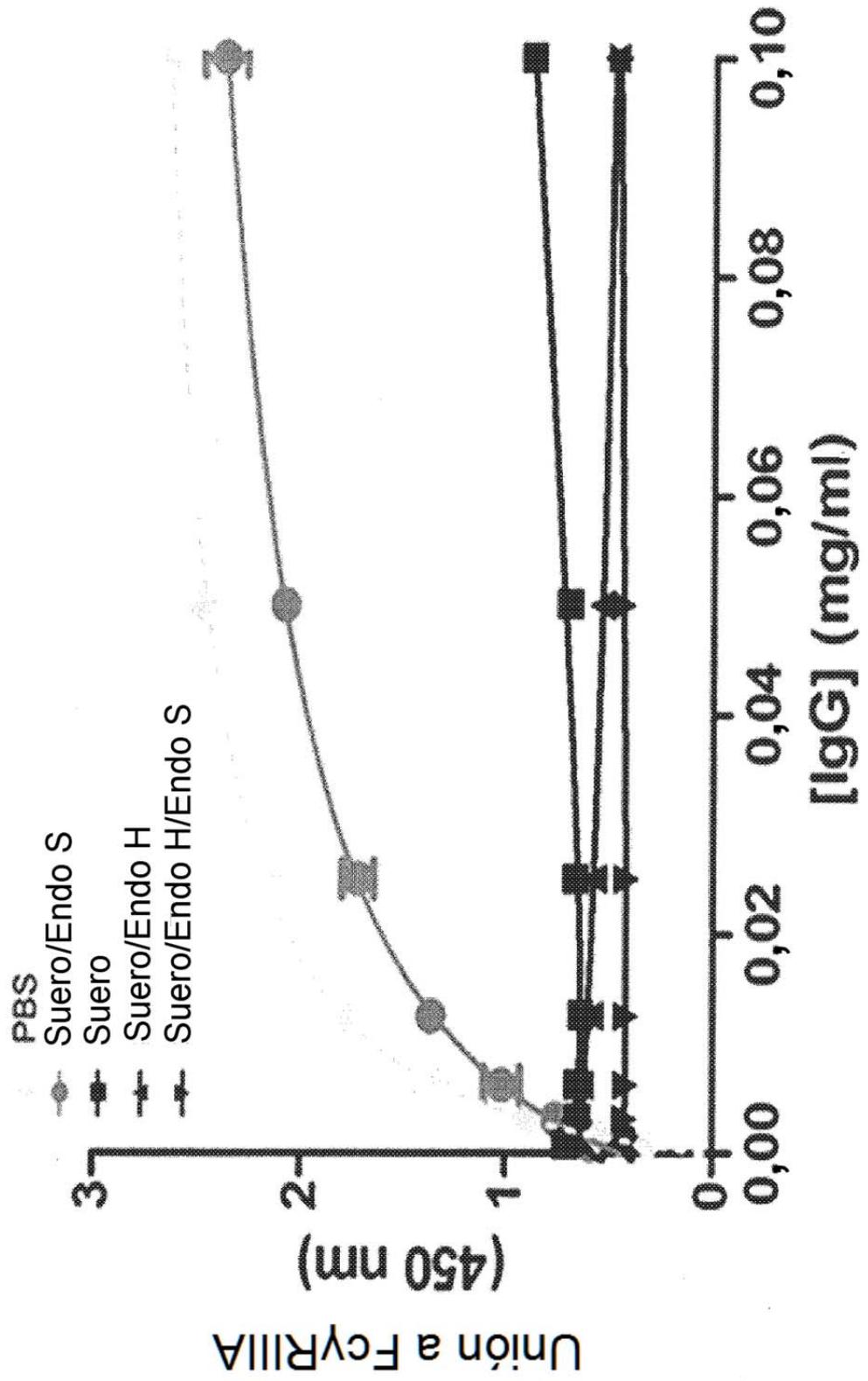


Figura 8

