



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) BR 112014019825-0 B1



(22) Data do Depósito: 11/02/2013

(45) Data de Concessão: 24/08/2021

(54) Título: GLICOENGENHARIA QUIMIOENZIMÁTICA DE ANTICORPOS E FRAGMENTOS FC DOS MESMOS

(51) Int.Cl.: C12P 21/08; C07K 16/18; A61K 39/395.

(30) Prioridade Unionista: 10/02/2012 US 61/597,468.

(73) Titular(es): UNIVERSITY OF MARYLAND, BALTIMORE.

(72) Inventor(es): WANG, LAI-XI; HUANG, WEI.

(86) Pedido PCT: PCT US2013025553 de 11/02/2013

(87) Publicação PCT: WO 2013/120066 de 15/08/2013

(85) Data do Início da Fase Nacional: 11/08/2014

(57) Resumo: GLICOENGENHARIA QUIMIOENZIMÁTICA DE ANTICORPOS E FRAGMENTOS FC DOS MESMOS. A presente invenção proporciona mutantes Endo-S recombinantes que exibem atividade de hidrólise reduzida e atividade de transglicosilação aumentada para a síntese das glicoproteínas, em que uma desejada oxazolina sialilada ou oxazolina oligossacarídeo sintética é adicionada a um aceptor G1cNAc-proteína de núcleo fucosilado ou não fucosilado. Tais mutantes Endo-S recombinantes são úteis para a remodelação de glicosilação eficiente domínio IgG1-Fc para fornecer diferentes glicoformas de anticorpos que portam estruturalmente Fc N-glicanos bem definidos.

**"GLICOENGENHARIA QUIMIOENZIMÁTICA DE ANTICORPOS E
FRAGMENTOS FC DOS MESMOS"**

DIREITOS DO GOVERNO NA INVENÇÃO

[001] Esta invenção foi feita com o apoio do governo com os números de concessão GM080374 e GM096973 concedidos pelo National Institutes of Health. O governo tem determinados direitos na invenção.

REFERÊNCIA CRUZADA A PEDIDOS RELACIONADOS

[002] O pedido reivindica prioridade ao Pedido Provisório dos EUA N ° 61/597.468 depositado em 10 de fevereiro de 2012, o conteúdo do qual é incorporado no presente documento por referência, para todos os fins.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

[003] Campo da Invenção

[004] A invenção refere-se a síntese da glicoproteínas, e mais particularmente, à utilização de uma Endo S mutante e recombinante, uma endo-PN-acetilglucosaminidase de *Streptococcus pyogenes*, que possui atividade transglicosilação e atividade de hidrólise limitada de modo permitindo a remodelação de glicosilação eficiente do domínio anticorpo-Fc.

[005] Descrição da técnica Relacionada

[006] Os anticorpos monoclonais (mAb) do tipo IgG, são uma importante classe de proteínas terapêuticas utilizadas para o tratamento de câncer, doenças auto-imunes e infecciosas. (1-3) Anticorpos IgG são compostos de duas cadeias pesadas e duas cadeias leves que estão associadas para formar três domínios distintos da proteína, incluindo dois domínios Fab variáveis e um domínio constante Fc (cristalizável) ligado por uma região de dobradiça

flexível. Os domínios de Fab são responsáveis pela ligação ao antígeno, enquanto que o domínio Fc está envolvido em funções efetoras mediadas pelo receptor Fc, tais como citotoxicidade celular dependente de anticorpos (ADCC) e citotoxicidade dependente de complemento (CDC). (2, 4) O domínio Fc é um homodímero que porta dois N-glicanos nas locais de N-glicosilação conservados (N297). Os oligossacarídeos ligados são do tipo complexo biantenar com considerável heterogeneidade estrutural, em que o núcleo de heptassacarídeo N-ligado pode ser diferencialmente decorado com fucose nuclear (Fuc), bissectriz N-acetilglucosamina (GlcNAc), galactose terminal (Gal), e ácido siálico terminal (Sia) como mostrado na Figura 1. (5-7) Estudos estruturais de raios-X cristalográficos e RMN indicam que os glicanos Fc são colocados entre os dois subdomínios CH2/CH3 e têm múltiplas interações não covalentes com os domínios Fc. (8-14) Estes estudos têm mostrado que a ligação de diferentes glicanos Fc pode ter impacto distinto sobre as conformações do domínio Fc, implicando um papel importante da glicosilação na manutenção de uma adequada estrutura de domínio Fc para interações com receptores Fc respectivos associados com as funções efetoras do anticorpo (8-14).

[007] Foi ainda demonstrado que as estruturas finas de N-glicanos Fc são determinantes importantes das atividades de pro- e anti-inflamatórias de anticorpos. (2, 15), por exemplo, a falta de fucose de núcleo, bem como a ligação de uma porção GlcNAc bissector, aumenta dramaticamente a afinidade do anticorpo para o receptor FcγRIIIa (FcγRIIIa), que é responsável pela citotoxicidade celular dependente de anticorpos (ADCC). (11, 16-18) Assim, mAbs com baixo teor

de fucose são procurados para a melhoria da eficácia anticâncer in vivo. (19, 20) Por outro lado, a glicoforma FC α -2,6-sialilada terminal, um componente menor da imunoglobulina intravenosa (IVIG) reunidos a partir dos soros de milhares de doadores de sangue saudáveis, foi recentemente identificado como a espécie ativa para a atividade anti-inflamatória de IVIG em um modelo de rato de artrite reumatóide (AR). (21-23) Contudo, IgG disponíveis comercialmente, incluindo anticorpos monoclonais e IVIG, tipicamente existem como misturas de glicoformas que não são ideais para as suas respectivas atividades terapêuticas. Por exemplo, as glicoformas Fc maiores de anticorpos monoclonais atualmente utilizados para o tratamento do câncer são de núcleo fucosilado que possuem uma afinidade relativamente baixa para o receptor de ativação Fc γ RIIIa, demonstrando pouca eficácia particularmente para aqueles pacientes com o polimorfismo alélico Fc γ RHIIa-F158 de baixa afinidade. (2, 19, 20)

[008] O impacto da glicosilação sobre as funções biológicas e resultado terapêutico de anticorpos IgG tem estimulado grande interesse no desenvolvimento de métodos para controlar a glicosilação de anticorpos. Uma abordagem é a de controlar os perfis de glicosilação durante a produção por meio de engenharia do caminho biossintético de glicano em vários sistemas de expressão, incluindo células hospedeiras de mamífero, de plantas e de levedura (24-30). Esse controle de glicosilação, resultou na produção de baixo-fucose ou não fucosilado anticorpos monoclonais com a melhoria da atividade ADCC. Porém, as glicoformas que podem ser geradas por esta abordagem tem sido limitadaa, e na maioria dos casos, um controle completo a uma glicoforma

homogênea definida é difícil.

[009] Uma análise recente dos vários fármacos de glicoproteínas terapêuticas disponíveis no mercado, incluindo rituximab anticorpo monoclonal, indicou modificações significativas dos perfis de glicosilação de diferentes lotes produzidos em diferentes períodos. (31) Esta análise implica o desafio na manutenção de uma produção consistente de fármacos à base de glicoproteínas e também levanta preocupações regulatórias, como alterações da glicosilação Fc seria mais provável impactar a eficácia terapêutica.

[0010] Uma abordagem alternativa para lidar com a inconsistência e heterogeneidade na glicosilação de glicoproteínas é a realização de remodelação de glicosilação através apareação dos N-glicanos heterogêneos e ampliar as cadeias de açúcar por glicosilação enzimática. (32, 33) Tal glicosilação enzimática foi recentemente descrito usando um método quimioenzimático para remodelação de glicosilação Fc que tira proveito da atividade transglicosilação de várias endoglicosidases e seus mutantes glicosintase usando glicano oxazolininas como seus substratos (34-36) Esta abordagem de remodelação consiste em duas etapas: apareação de todas os N-glicanos heterogêneos por um endoglicosidase para deixar apenas o primeiro GlcNAc no(s) local(is) de glicosilação e, em seguida, voltar a adicionar uma estrutura bem definida de N-glicanos em bloco por meio de uma reação de transglicosilação catalisada por endoglicosidase. (32)

[0011] Um trabalho recente demonstrou que a engenharia de glicosilação de domínio de IgG-Fc pode ser conseguida por uma combinação a expressão em células CHO ou de

levedura do domínio Fc e a sua subsequente remodelação quimioenzimática através de uma abordagem desglicosilação / reglicosilação enzimática. (34-36) Foi demonstrado que a endo-PN-acetilglucosaminidase de *Arthrobacter protophormiae*, endoA, é altamente eficiente para glicosilar o domínio Fc contendo GlcNAc utilizando vários oxazolinas de núcleo de N-glicano sintéticas como substratos. (34, 35) No entanto, as limitações do estado atual do método são evidentes: (a) nem endoA nem endoM (outra endoglicosidase de *Mucor hiemalis*) foi capaz de transformar domínio IgG-Fc fucosilado-núcleo, (35) as principais glicoformas de mAbs recombinantes e IVIG; (B) mutantes EndoD eram capazes de fixar um núcleo Man₃GlcNAc a um domínio de GlcNAc-Fc fucosilado, (36), mas nenhum dos endoD, endoA, endoM, e seus mutantes (36-39) eram capazes de transferir N-glicano tipo complexo intacto a domínio GlcNAc-Fc ou fucosilados ou não fucosilado; e (c) a remodelação de glicosilação de anticorpos IgG de comprimento completo intactos com N-glicanos de tipo complexo ainda está para ser alcançado.

[0012] Em uma tentativa de desenvolver um sistema deglicosilação / glicosilação enzimática eficiente para remodelação de glicosilação de glicoproteína, atenção se voltou para endoS, uma endo- β -N-acetilglucosaminidase (ENGase) de *Streptococcus pyogenes*, que é capaz de hidrolisar os Fc N-glicanos de anticorpos IgG intactos por clivar a ligação β 1,4-glicosídica no núcleo quitobiase dos N-glicanos. (40-42). Endo-S possui atividade de transglicosilação, tal como o capaz de utilizar Man₃GlcNAc oxazolina como substrato doador para glicosilar um aceptor de GlcNAc. No entanto, a Endo-S de tipo selvagem também possui atividade hidrolítica altamente ativa, de modo que o

produto IgG glicosilado também está sujeito a hidrólise rápida se a Endo-S de tipo selvagem é utilizada para a síntese e remodelação de glicosilação.

[0013] À luz das atividades acima conhecidas de Endo S, seria vantajoso proporcionar um mutante de Endo-S que apresenta uma atividade de transglicosilar com atividade de hidrolização reduzida.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[0014] A presente invenção proporciona mutantes selecionados e Endo-S recombinantes dos mesmos, que exibem atividade de hidrólise reduzida e atividade de transglicosilação aumentada para a síntese de anticorpos IgG e fragmentos Fc destes, em que uma cadeia de açúcar desejado é adicionado a um acceptor GlcNAc-IgG de núcleo fucosilado ou não fucosilado .Como tal, a presente invenção permite a síntese e remodelação de anticorpos terapêuticos e fragmentos Fc dos mesmo para proporcionar certas atividades biológicas, tais como, o tempo de meia-vida prolongada in vivo, menor imunogenicidade, a atividade in vivo melhorada, aumento da capacidade de direcionamento, e/ou a capacidade de entregar um agente terapêutico.

[0015] Em um aspecto, a presente invenção proporciona a atividade transglicosilação de uma endo-PN-acetilglucosaminidase de *Streptococcus pyogenes* (SEQ ID NO: 1) e seus mutantes, em que os mutantes têm pelo menos 95% de homologia ao mesmo e exibem atividade de transglicosilação em aceptores de GlcNAc-IgG tanto de núcleo fucosilados como não fucosilado, em que as endoglicosidases permitem a transferência de um oligossacarídeo (sob a forma de uma oxazolina de açúcar ativado) em bloco para um GlcNAc-IgG fucosilados ou não

fucosilado (ou um fragmento Fc do mesmo) de modo a formar uma nova glicofoma de IgG (ou um seu fragmento Fc).

[0016] Em outro aspecto, a presente invenção proporciona mutantes Endo-S que mostram marcadamente uma maior eficácia de transglicosilação ou atividade hidrolítica de produto diminuída ou abolida. Mutantes incluem preferências mutações sítio-específicas, incluindo uma mutação Asp-233. Os mutantes incluem, mas não estão limitados a, D233Q (SEQ ID NO: 2) e D233A (SEQ ID NO: 3).

[0017] Em um outro aspecto, a presente invenção proporciona um método quimioenzimático para a preparação de glicofomas de núcleo fucosilado ou não fucosilado homogêneos de anticorpos IgG, que compreende:

- a. proporcionar um aceptor selecionado a partir do grupo que consiste de um GlcNAc-IgG DE núcleo fucosilado, GlcNAc-IgG de núcleo não fucosilado ou fragmentos de IgG-Fc correspondentes; e
- b. reagir o aceptor com um substrato doador, incluindo uma porção de oligossacarídeo ativado, na presença de mutantes Endo-S-Asp 233 de *Streptococcus pyogenes* para transferir a porção de oligossacarídeo ativado para o aceptor e produzir a glicoproteína fucosilada ou não fucosilada homogênea.

[0018] Em ainda um outro aspecto, a presente invenção proporciona um método para a preparação de uma IgG de núcleo fucosilado ou fragmento IgG-Fc tendo uma porção oligossacarídeo predeterminada, que compreende:

- a. proporcionar um aceptor de IgG de núcleo fucosilado que compreende um resíduo N-acetilglucosamina de núcleo fucosilado ligada a asparagina (GlcNAc); e
- b. enzimaticamente reagir o aceptor de IgG de núcleo

fucosilado com um doador de oligossacarídeo ativado na presença de mutante de S-Endoglicosidase D233Q (SEQ ID NO: 2) e D233A (SEQ ID NO: 3), em que o doador de oligossacarídeo ativado porta uma porção oligossacarídeo que compreende um número e o tipo de resíduos de açúcar predeterminado, em que a porção de oligossacarídeo está ligada de forma covalente ao acceptor de IgG de núcleo fucosilado, preparando-se assim a IgG de núcleo fucosilado ou fragmento IgG-Fc tendo a porção de oligossacarídeo predeterminada.

[0019] Em ainda outro aspecto, a presente invenção proporciona uma porção de oligossacarídeo ativado, tal como glicano ou oligossacarídeo oxazolina, fluoreto de glicosila, glicosil azida ou um glicósido de arila, tal como um substrato doador para a síntese de glicoproteínas de núcleo fucosilado homogêneas ou glicoproteínas não fucosiladas. De preferência, a porção de oligossacarídeo ativado é um oligossacarídeo oxazolina.

[0020] Em um outro aspecto, a presente invenção refere-se a um método quimioenzimático para a preparação de um anticorpo de monômeros fucosilados ou não fucosilados homogêneos ou um fragmento Fc do mesmo, dito método compreendendo:

proporcionar um acceptor selecionado a partir do GlcNAc-anticorpo de núcleo fucosilado ou não fucosilado ou um fragmento Fc do mesmo; e

reagir o acceptor com um substrato de doador na presença de um mutante Endo-S Asp-233 de *Streptococcus pyogenes*, em que o substrato doador compreende um componente oligossacarídeo predeterminado com um número e tipo de resíduos de açúcar definidos e tipos de ligação específicos, fornecendo assim

o anticorpo de monômero fucosilado ou não fucosilado homogêneo ou um fragmento Fc do mesmo. Em uma modalidade, uma GlcNAc fucosilado contendo proteína é um alfa-1-6-fucosil-GlcNAc-a proteína.

[0021] Em outro aspecto, a presente invenção refere-se a um método de remodelar um anticorpo ou seu fragmento Fc com um oligossacarídeo possuindo um componente oligossacarídeo predeterminado com um número e tipo de resíduos de açúcar definidos e com tipos específicos de ligação, compreendendo o método:

- a. proporcionar um anticorpo de núcleo fucosilado ou fragmento Fc do mesmo que compreende Fc N-glicanos;
- b. tratar o anticorpo de núcleo fucosilado ou fragmento Fc com uma endo-enzima de hidrólise para produzir uma porção GlcNAc ligada a Asn; e
- c. unir o oligossacarídeo à porção GlcNAc ligada a Asn na presença de um mutante de Endo-S tendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO: 2 e SEQ ID NO: 3, adicionando assim o componente oligossacarídeo predeterminado.

[0022] Em um outro aspecto, a presente invenção refere-se a um método de remodelação de uma IgG de núcleo fucosilado ou não fucosilado ou fragmento IgG-Fc com um oligossacarídeo possuindo um componente oligossacarídeo predeterminado com um número e tipo de resíduos de açúcar definidos e com os tipos de ligação específicos, o método compreendendo:

- a. proporcionar uma IgG de núcleo fucosilado ou não fucosilado ou fragmento IgG-Fc obtido a partir de fontes naturais ou recombinantes que portam N-glicanos heterogêneos;

b. tratar a IgG ou fragmento IgG-Fc natural ou recombinante com uma endo-enzima (uma endoglicosidase de tipo selvagem ou um endoglicosidase mutante com atividade hidrolítica eficiente) para hidrolisar a ligação entre os dois resíduos de GlcNAc posicionados mais próximos do domínio peptídico formando assim uma proteína desglicosilada portando um acceptor de GlcNAc de núcleo fucosilado ou não fucosilado; e

c. unir o componente oligossacarídeos pré-determinado ao acceptor de GlcNAc para reconstituir a ligação beta-1,4-glicosídica através transglicosilação com um mutante Endo-S Asp-233 de *Streptococcus pyogenes*, assim acrescentando o componente oligossacarídeo pré-determinado para remodelar o IgG de núcleo fucosilado ou não fucosilado ou fragmento IgG-Fc.

[0023] Oligossacarídeos oxazolinás aplicáveis incluem, mas não se limitando a, tipo elevado teor de manose, tipo híbrido, oxazolina sialoglicano e N-glicano tipo complexo, bem como os seus derivados modificados seletivamente, tais como aqueles com etiquetas específicas. De preferência, di-, tri-, tetra-, penta-, hexil-, hepta-, octil-, nona-, deca- ou undecaasacarídeo oxazolinás são utilizados como substratos doadores para a síntese quimioenzimática altamente eficiente de anticorpos IgG de núcleo fucosilados ou não fucosilado homogêneos e fragmentos de IgG-Fc.

[0024] Em ainda outro aspecto, a presente invenção refere-se a um método para sintetizar um anticorpo ou fragmento modificado do mesmo, compreendendo o método;

a. proporcionar um anticorpo IgG naturalmente existente, um anticorpo recombinante ou um domínio Fc que porta Fc N-glicanos como precursores;

b. Deglicosilar Fc utilizando uma endoglicosidase, tal como uma Endo-S selvagem para deglicosilar o domínio Fc para formar um acceptor de GlcNAc; em que o acceptor de GlcNAc é posicionado na região Fc do anticorpo e o acceptor de GlcNAc é ou núcleo fucosilado ou não fucosilado; e

c. transglicosilar o acceptor de GlcNAc no anticorpo IgG naturalmente existente, o anticorpo recombinante ou o domínio Fc com uma oligossacarídeo oxazolina ou uma oxazolina sialoglicano tendo um número predeterminado de resíduos de açúcar sob a catálise de uma enzima selecionada a partir do grupo que consiste em mutantes Endo-S incluindo a SEQ ID NO: 2 e SEQ ID NO: 3, para formar o anticorpo modificado com um número predeterminado de resíduos de açúcar.

[0025] Em ainda outro aspecto, a presente invenção proporciona um método de remodelar uma imunoglobulina intravenosa (IVIG) exibindo glicoformas-Fc sialiladas, o método que compreende:

a. proporcionar uma IVIG portando Fc N-glicanos;

b. Fc deglicosilar os Fc N-glicanos usando uma endoglicosidase incluindo Endo-S selvagem para formar aceptores GlcNAc; em que os aceptores de GlcNAc são posicionados na região Fc da IVIG e os aceptores de GlcNAc ou são fucosilados ou não fucosilado; e

c. transglicosilar os aceptores de GlcNAc com uma oxazolina sialoglicano tendo um número predeterminado de resíduos de açúcar sob a catálise de uma enzima selecionada a partir do grupo que consiste em mutantes Endo-S incluindo SEQ ID NO: 2 e SEQ ID NO: 3, para formar uma IVIG sialilada.

[0026] Um outro aspecto da presente invenção proporciona

uma composição contendo preparação de IVIG que compreende pelo menos 90% de glicoformas Fc sialiladas homogêneas para aumentar a atividade anti-inflamatória, em que as glicoformas Fc sialiladas são sintetizadas usando um mutante de *Streptococcus pyogenes* Endo-S Asp-233 em combinação com uma porção GlcNAc posicionada na região Fc de uma IVIG desglicosilada e uma oxazolina sialoglicano tendo um número predeterminado de resíduos de açúcar.

[0027] Em ainda um outro aspecto, a presente invenção refere-se a um método para a síntese de anticorpos IgG de núcleo fucosilado ou não fucosilado homogêneos ou fragmentos de IgG-Fc, o método que compreende:

- a. proporcionar um anticorpo IgG natural ou recombinante ou fragmento IgG-Fc, em que a IgG recombinante ou IgG-Fc é produzida a partir de um sistema de expressão de proteína típica, incluindo mas não limitada a leveduras, insetos, plantas, e qualquer sistema de expressão de mamífero;
- b. remover os N-glicanos de uma enzima selecionada a partir do grupo que consiste em Endo-H, Endo-A, Endo-S, e/ou endo-F3 para formar uma proteína contendo GlcNAc de núcleo fucosilado ou não fucosilado;
- c. proporcionar uma oxazolina de açúcar ou de oxazolina sialoglicano com um componente oligossacarídeo desejado que compreende um número e tipo de resíduos de açúcar na cadeia definido; e
- d. enzimaticamente transglicosilar a proteína contendo GlcNAc fucosilado ou não fucosilado com uma oxazolina de açúcar tendo um número desejado de resíduos de açúcar ou oxazolina sialoglicano tendo um número desejado de açúcar e de resíduos de ácido siálico com uma endoglicosidase selecionada a partir do grupo que consiste em mutantes de

Streptococcus pyogenes Endo-S Asp -233, formando assim um anticorpo IgG de núcleo fucosilados ou não fucosilado homogêneo ou o fragmento IgG-Fc possuindo uma extensão do número desejado de resíduos de açúcar e/ou ácido siálico.

[0028] Está previsto que a oligossacarídeo oxazolina ou oxazolina sialoglicano tendo um componente oligossacarídeo predeterminado com um número e tipo de resíduos de açúcar definida pode compreender ainda uma etiqueta ou porção adicional, incluindo, um agente terapêutico ou fármaco, tais como para o tratamento de câncer, HIV ou outros vírus, substâncias que ativam os receptores na membrana plasmática das células, agentes que afetam a química intracelular, agentes que afetam física celular, genes, análogos do gene, RNA, análogos de RNA, DNA, análogos de DNA, sequências de aminoácidos dos receptores de superfície, tais como CCR5 ou CD4, estrutura antigênica que tem afinidade para um anticorpo específico; sequências de aminoácidos de ligandos de receptores, tais como gp120, gp41 ou gp160, antagonistas de receptores, bloqueadores dos receptores, enzimas, substratos de enzimas, inibidores de enzimas, moduladores de enzimas, proteínas terapêuticas, análogos de proteínas, metabolitos, análogos de metabolitos, oligonucleotídeos, análogos de oligonucleotídeos, antígenos, análogos de antígenos, anticorpos ou os seus fragmentos, análogos de anticorpo, um anticorpo diferente do anticorpo modificado, que é reativo a outra bactéria receptora, vírus, íons inorgânicos, íons metálicos, agregados de metais, polímeros, compostos fluorescentes e quaisquer combinações dos mesmos.

[0029] Como tal, a presente invenção proporciona ainda um dispositivo de administração para a administração de um

fármaco ou agente terapêutico possuindo uma atividade biológica para tratar um estado, o dispositivo de administração que compreende: um fragmento de IgG-Fc ou IgG remodelada tendo uma cadeia de açúcar pré-determinada ou sialoglicano e um agente terapêutico ou fármaco ligado ao resíduo de açúcar terminal ou ácido siálico.

[0030] A presente invenção prevê a modificação de anticorpos monoclonais relacionados com o HIV, incluindo, mas não limitado a 17b, 48d, A32, C11, 2G12, F240, IgG1b12, 19e, X5, TNX-355 e F91, todos os quais estão disponíveis comercialmente.

[0031] Outros anticorpos relacionados com o câncer ou outras doenças também podem ser remodelados para um ajuste individual a determinados receptores, aumentando assim a atividade biológica, os anticorpos monoclonais podem incluir, mas não estão limitados a, cetuximab, rituximab, muromonab-CD3, abciximab, daclizumab, basiliximab, palivizumab, infliximab, trastuzumab, gemtuzumab, ozogamicin, alemtuzumab, ibritumomab tiuxetan, adalimumab, omalizumab, tositumomab, I- 131 tositumomab, efalizumab, bevacizumab, panitumumab, pertuzumab, natalizumab, etanercept, IGN101 (Aphton), volociximab (Biogen Idee and PDL BioPharm), Anti-CD80 mAb (Biogen Idee), Anti-CD23 mAb (Biogen Idel), CAT-3888 (Cambridge Antibody Technology), CDP-791 (Imclone), eraptuzumab (Immunomedics), MDX-010 (Medarex and BMS), MDX-060 (Medarex), MDX-070 (Medarex), matuzumab (Merck), CP-675,206 (Pfizer), CAL (Roche), SGN-30 (Seattle Genetics), zanolimumab (Serono and Genmab), adecatumumab (Serono), oregovomab (United Therapeutics), nimotuzumab (YM Bioscience), ABT-874 (Abbott Laboratories), denosumab (Amgen), AM 108 (Amgen), AMG 714 (Amgen),

fontolizumab (Biogen Idee and PDL BioPharm), daclizumab (Biogen Idee and PDL BioPharm), golimumab (Centocor and Schering-Plough), CNTO 1275 (Centocor), ocrelizumab (Genetech and Roche), HuMax-CD20 (Genmab), belimumab (HGS and GSK), epratuzumab (Immunomedics), MLN1202 (Millennium Pharmaceuticals), visilizumab (PDL BioPharm), tocilizumab (Roche), ocrelizumab (Roche), certolizumab pegol (UCB, formerly Celltech), eculizumab (Alexion Pharmaceuticals), pexelizumab (Alexion Pharmaceuticals and Procter & Gamble), abelximab (Centocor), ranibizumab (Genetech), mepolizumab (GSK), TNX-355 (Tanox), ou MYO-029 (Wyeth)..

[0032] Ainda um outro aspecto da invenção refere-se a um método de remodelar um anticorpo que inclui inicialmente uma cadeia de açúcar heterogêneo, o método que compreende:

a. remover a cadeia de açúcar heterogênea do anticorpo com uma endoglicosidase para deixar uma única porção GlcNAc fucosilada ou não fucosilada ligada a um local de glicosilação original; e

b. transferir um núcleo oligossacarídeo ou oxazolina sialoglicano com, pelo menos, uma etiqueta para a porção GlcNAc fucosilado ou não fucosilado por uma transglicosilação catalisada por endoglicosidase para se obter um anticorpo etiquetado, em que a endoglicosidase é selecionada a partir do grupo que consiste em mutantes de Endo-S incluindo SEQ ID NO: 2 e SEQ ID NO: 3.

[0033] A porção de etiqueta pode incluir, mas não está limitada a, antígenos, fármacos terapêuticos, tais como para o câncer ou o HIV, toxinas, sondas fluorescentes, biotina, espécies de PEG, lipídeos ou nucleotídeos.

[0034] Em outro aspecto, a presente invenção proporciona uma composição que compreende pelo menos um mutante de

Streptococcus pyogenes Endo-S Asp-233 selecionado a partir do grupo que consiste em D233Q (SEQ ID NO: 2) e D233A (SEQ ID No: 3).

[0035] Em ainda outro aspecto, a presente invenção proporciona uma preparação substancialmente homogênea de um anticorpo de núcleo fucosilado ou não fucosilado ou um fragmento Fc do mesmo tendo uma porção oligossacarídeo predeterminada, em que a preparação substancialmente homogênea é produzida por qualquer um dos métodos acima mencionados. Também são fornecidas composições que compreendem tais preparações homogêneas.

[0036] Em ainda um outro aspecto, a presente invenção proporciona um método de tratamento utilizando um anticorpo remodelado tendo um estado de glicosilação desejado e/ou forma sialilada em uma quantidade suficiente para modular a atividade biológica do indivíduo tratado.

[0037] Outros aspectos, características e modalidades da invenção serão mais evidentes a partir da divulgação que se segue e reivindicações anexas.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

[0038] A Figura 1 mostra as estruturas de um anticorpo IgG e típico dos Fc N-glicanos. a) Estrutura da Alfa espinha dorsal de IgG humana, mostrando regiões funcionais (modelados com base no código PDB 1HZH): b) A estrutura de um comprimento total de bi-antennaiy tipo complexo de N-glicanos ligados a Asn-297 no domínio Fc (■ GlcNAc; ● Man; ⊗ Gal; ⊙ Glc; ▲ Fuc; ◆ Sia).

[0039] A Figura 2 mostra o alinhamento da sequência de endoscopia (SEQ ID NO: 4) e EndoF3 (SEQ ID NO: 5).

[0040] Figuras 3 A e B mostram o esquema para a remodelação de glicosilação de rituximab para glicoformas

naturais e seletivamente modificados homogêneas (■ GlcNAc; ● Man; ⊗ Gal; ⊙ Glc; ▲ Fuc; ◆ Sia).

[0041] A Figura 4 mostra a SDS-PAGE e análise de ESI-MS de remodelação de glicosilação de rituximab. (a) a análise de SDS-PAGE: pista 0, marcadores de proteína; Pista 1, rituximab comercial; Pista 2, EndoS rituximab deglicosilado (1); Pista 3, produto de transglicosilação (3) a partir da reação catalisada por Endos-D233A entre (1) e oxazolina sialoglicano (2); Pista 4, produto de transglicosilação da reação catalisada por Endos-D233Q de (1) e (2); pista 5, o produto de transglicosilação (5) a partir da catalisada reação por endos-D233Q entre o rituximab desglicosilado (1) e Man3GlcNAc oxazolina (4); pista 6, o produto de transglicosilação (7) a partir da reação catalisada por endos-D233Q entre o rituximab desglicosilado (1) e N3Man3GlcNAc oxazolina (6). (b) ESI-MS (depois de desconvolução) da cadeia pesada do rituximab comercial. (c) ESI-MS do rituximab de-glicosilado (1). (d) ESI-MS do produto transglicosilação (3). (e) ESI-MS do produto de transglicosilação (5). (f) ESI-MS do produto de transglicosilação (7).

[0042] As Figuras 5 A e B mostram a remodelação enzimática para glicoforma não-fucosilada homogênea de rituximab (■ GlcNAc; ● Man; ⊗ Gal; ⊙ Glc; ▲ Fuc; ◆ Sia).

[0043] A Figura 6 mostra a SDS-PAGE e análise de ESI-MS de glicoengenharia do rituximab para a glicoforma G2 não fucosilada. (a) análise de SDS-PAGE: pista 0, marcadores de proteína; Pista 1, rituximab comercial; Pista 2, o rituximab de-glicosilado por endoS (1); Pista 3, o produto

defucosilado (8); Pista 4, a glicoforma G2 modificada por glicoengenharia. (b) ESI-MS (depois de desconvolução) da cadeia pesada do rituximab defucosilado (8). (c) ESI-MS da cadeia pesada do rituximab modificada por glicoengenharia G2 (10).

[0044] A Figura 7 mostra o glicoengenharia de Fc de sítio específico de IVIG humano.

(■ GlcNAc; ● Man; ⊗ Gal; ○ Glc; ▲ Fuc; ◆ Sia).

[0045] A Figura 8 mostra os perfis de HPLC fluorescentes de N-glicanos marcados com 2AB a partir de Fab e Fc de IVIG. a) a partir Fc de IVIG nativa; b) a partir de Fc de IVIG modificada por glicoengenharia; c) a partir de Fab de IVIG nativo; d) a partir de Fab de IVIG modificado por glicoengenharia. As estruturas de glicano incluem os seguintes componentes: ■ GlcNAc; ● Man; ⊗ Gal; ○ Glc; ▲ Fuc; ◆ Sia).

[0046] Figuras 9 A-C mostram sensogramas SPR típicos de ligação de G2-rituximab e rituximab comercial, com respectivos receptores Fcγ: FcγRH1a-V158 (A), FcγRIIIa-F158 (B), e FcγRIIb (C). Os anticorpos foram imobilizados por captura de Proteína A e a ligação foi analisada por injeção dos respectivos receptores Fcγ em uma série de diluições de 2 vezes a partir de 40 µg/ml (1,33 mM).

[0047] A Figura 10 mostra a MALDI-TOF MS dos Fc N-glicanos liberados pelo tratamento com PNGase F com os mesmos símbolos, conforme definido na Figura 1.

[0048] A Figura 11 mostra a MALDI-TOF MS dos Fc N-glicanos liberados por tratamento com EndoS com os mesmos símbolos, conforme definido na Figura 1.

[0049] As Figuras 12 A-C mostram a análise por LC-MS de

rituximab. a) o perfil de LC rituximab reduzido; b) ESI-MS da cadeia leve; c) MS deconvolvido da cadeia leve; d) ESI-MS da cadeia pesada; e) deconvolvidos MS da cadeia pesada.

[0050] A Figura 13 mostra o perfil de HPLC fluorescente de N-glicanos marcados com 2-AB liberados das amostras de rituximab comercial e modificado por glicoengenharia por tratamento com PNGase F, a) a partir de rituximab comercial; b) a partir de rituximab sialilado (3); c) a partir do rituximab não fucosilado (10). ■ GlcNAc; ● Man; ⊗ Gal; ○ Glc; ▲ Fuc; ◆ Sia].

[0051] A Figura 14 mostra a análise de SDS-PAGE de transglicosilação por EndoS do tipo selvagem. Pista 0, marcadores de proteína; Pista 1, rituximab comercial; Pista 2, rituximab de-glicosilada por EndoS (1); Pista 3 a pista 7, o monitoramento da reação de transglicosilação entre rituximab de-glicosilado (1) e oxazolina sialoglicano (2): Pista 3, 15 minutos; Pista 4, 30 min; Pista 5, 1 h; Pista 6, 2 h; Pista 7, 4 h.

[0052] As Figuras 15 A e B mostram o monitoramento de LC-MS para defucosilação de Fuc(α 2,6)GlcNAc-rituximab (1) com a α -fucosidase de rim de bovino. Os perfis deconvolvidos ESI-MS de cadeia pesada do rituximab foram mostrados (FG-Rx, cadeia pesada de Fuc(α 2,6)GlcNAc-rituximab; G-Rx, cadeia pesada de GlcNAc-rituximab). a) incubação com a α -fucosidase, durante 2 dias; b) a incubação com a α -fucosidase, durante 7 dias; c) a incubação com a α -fucosidase, durante 14 dias; e d) a incubação com a α -fucosidase, durante 20 dias.

[0053] A Figura 16 mostra a análise de SDS-PAGE de glicoengenharia de IVIG. Pista 0, marcador de proteína; Pista 1, IVIG comercial; Pista 2, IVIG (11) após

desglicosilação por EndoS; Pista 3, IVIG (12) depois de transglicosilação catalisada por Endos-D233Q com oxazolina sialoglicano.

[0054] Figura 17 A e B mostram os resíduos de aminoácidos de mutantes de *Streptococcus pyogenes* Endo-S-Asp 233 D233Q (SEQ ID NO: 2) e D233A (SEQ ID No: 3), respectivamente.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[0055] A presente invenção proporciona novos mutantes glicosintase Endos Asp 233 que apresentam uma eficiência notável transglicosilação capaz de transferir N-glicanos do tipo complexo de glicano oxazolínicos ativados para desglicosilar anticorpos intactos sem hidrólise do produto. Verificou-se aqui que os mutantes glicosintase Endos Asp 233 agiram de forma eficiente tanto em núcleo fucosilado como não fucosilado domínio GlcNAc-Fc de anticorpos intactos para fornecer várias glicoformas IgG definidos. Além disso, anticorpos e imunoglobulinas intravenosas foram transformados em glicoformas Fc totalmente sialiladas com o aumento da atividade anti-inflamatória. Ainda adicionalmente, a presente invenção proporciona uma glicoforma homogênea possuindo um aumento da atividade de ADCC com atividade de ligação ao receptor FcγIIIa reforçada e glicoformas marcadas com azido, que pode ainda ser transformados em outros glicoformas.

[0056] A prática da presente invenção irá empregar, salvo indicação em contrário, técnicas convencionais de imunologia, biologia molecular, microbiologia, biologia celular e ADN recombinante, que estão dentro da perícia na técnica. Veja-se, por exemplo, Sambrook, et al. CLONAGEM MOLECULAR CLONING: A Laboratory Manual, 2^a edição (1989);

Current Protocols in MOLECULAR BIOLOGY (FM Ausubel, et al eds, (1987)...); a série METHODS IN ENZYMOLOGY (Academic Press, Inc.): PCR 2: A PRACTICAL APPROACH (M. J. MacPherson, B. D. Hames and G. R. Taylor eds. (1995)), Harlow and Lane, eds. (1988) ANTIBODIES, A LABORATORY MANUAL, and ANIMAL CELL CULTURE (R. I. Freshney, ed. (1987)).

[0057] Entende-se que os aspectos da presente invenção aqui descrita incluem "composto" e/ou "consistindo essencialmente em" aspectos.

[0058] Definições

[0059] Tal como utilizado aqui na especificação, "um" ou "uma" podem significar um ou mais. Como é usado no presente documento nas reivindicações, quando usado juntamente com a palavra "que compreende", as palavras "um" ou "uma" podem significar um ou mais do que um. Como é usado no presente documento "outro" pode significar pelo menos um segundo ou mais.

[0060] Como é usado no presente documento, "atividade biológica" refere-se às propriedades farmacodinâmicas e farmacocinéticas, incluindo, por exemplo, a afinidade molecular ou efeitos bioquímicos ou fisiológicos resultante, afinidade para o receptor ou o efeito fisiológico ou bioquímico resultante, afinidade não- de receptor ou efeito bioquímico ou fisiológico, eficácia, biodisponibilidade, absorção, distribuição, metabolismo ou eliminação.

[0061] Como é usado no presente documento, "açúcar" refere-se a uma molécula contendo um carboidrato oxidado ou não oxidado, incluindo, mas não limitado a, um monossacarídeo, dissacarídeo, trissacarídeo,

oligossacarídeo ou polissacarídeo, incluindo, por exemplo, N-acetilglucosamina, manose, galactose, ácido N-acetilneuramínico (ácido siálico), glicose, frutose, fucose, sorbose, ramnose, Manoseptulose, N-acetilgalactosamina, a dihidroxiacetona, xilose, xilulose, arabinose, gliceraldeído, sacarose, lactose, maltose, trealose, celobiose ou qualquer combinação facta de a L-ou D-isómero. Sugar refere ainda que, essas moléculas produzidas naturalmente, recombinante, sinteticamente, e/ou semi-sinteticamente.

[0062] Como é usado no presente documento, "homogêneo" refere-se a glicoproteínas de núcleo fucosilado ou glicoproteínas não fucosiladas em que o componente oligossacarídeo compreende pelo menos 75%, mais preferencialmente pelo menos 80%, pelo menos 85% ou pelo menos 90%, e mais preferivelmente pelo menos 95% do mesmo número e tipos de resíduos de açúcar.

[0063] Como é usado no presente documento, "proteína" ou "glicoproteína" é intermutável com os termos peptídeo e glicopeptídeos.

[0064] Como é usado no presente documento, "homologia" refere-se à sequência de aminoácidos com a identidade ou semelhança entre dois polipeptídeos substancial e tendo, pelo menos, 90%, e mais preferencialmente pelo menos 95% de semelhança com um polipeptídeo de referência. Para polipeptídeos, o comprimento de comparação para obter as homologias percentuais acima descritas entre sequências será geralmente de pelo menos 25 aminoácidos, alternativamente pelo menos 50 aminoácidos, mais provavelmente, pelo menos 100 aminoácidos, e mais provavelmente 200 aminoácidos ou mais. Polipeptídeos

substancialmente idênticos ou homólogos incluem adições, deleções, truncagens internas ou inserções, substituições conservativas e não conservativas, ou outras modificações, localizadas em posições da sequência de aminoácidos que não destroem a função do endoglicosidase. Os peritos na arte reconhecerão os inúmeros aminoácidos que podem ser modificados ou substituídos por outros resíduos quimicamente semelhantes, sem alterar substancialmente a atividade.

[0065] Como é usado no presente documento, "modular" refere-se a um aumento ou uma diminuição na "atividade biológica", tal como definido acima, quando comparada com um anticorpo de engenharia de glicosilação da presente invenção para um anticorpo não modificado por engenharia deglicosilação.

[0066] Como é usado no presente documento, "molécula de imunoglobulina" ou "anticorpos" refere-se a moléculas que contêm um local de ligação ao antígeno que se liga especificamente a um antígeno ou a uma região Fc, que se liga aos receptores celulares. Estruturalmente, o anticorpo mais simples que ocorre naturalmente (por exemplo, IgG) compreende quatro cadeias polipeptídicas, duas pesadas (H) e duas cadeias leves (L) inter-cadeias ligadas por pontes dissulfeto. As imunoglobulinas naturais constituem uma grande família de moléculas que inclui vários tipos de moléculas, tais como IgD, IgG, IgA, IgM e IgE. O termo também abrange anticorpos híbridos, ou anticorpos alterados, e seus fragmentos, incluindo Fc fragment (s).

[0067] Os anticorpos podem ser fragmentados utilizando técnicas convencionais, tal como aqui descritas e os fragmentos pesquisados quanto à utilidade do mesmo modo

como descrito para os anticorpos inteiros. Um fragmento Fab de uma molécula de imunoglobulina é uma proteína multimérica que consiste da porção de uma molécula de imunoglobulina que contém as porções imunologicamente ativas de uma cadeia pesada de imunoglobulina e uma cadeia leve de imunoglobulina covalentemente acoplados em conjunto e é capaz de se combinar especificamente com um antígeno. Os fragmentos Fab e Fc podem ser preparados por digestão proteolítica de moléculas de imunoglobulina substancialmente intactas com papaína, utilizando métodos que são bem conhecidos na técnica. No entanto, um fragmento Fab ou Fc também podem ser preparados através da expressão em uma célula hospedeira adequada as porções desejadas da cadeia pesada de imunoglobulina e cadeia leve de imunoglobulina, utilizando métodos conhecidos na arte.

[0068] Como é usado no presente documento, com respeito a anticorpos, "substancialmente puro" significa separado desses contaminantes que o acompanham no seu estado natural ou os contaminantes produzidos ou utilizados no processo de obtenção do anticorpo. Este termo inclui ainda o produto desejado com estado de glicosilação único, seja ou não se este estado inclui glicosilação em um único local ou vários locais. Tipicamente, o anticorpo é substancialmente puro, quando constitui pelo menos 60%, em peso, do anticorpo na formulação. Por exemplo, o anticorpo na preparação é pelo menos cerca de 75%, em certas modalidades, pelo menos, cerca de 80%, em certas modalidades de cerca de 85%, em certas modalidades, pelo menos, cerca de 90%, em certas modalidades, pelo menos, cerca de 95%, e mais preferencialmente, pelo menos cerca de 99%, em peso, do anticorpo desejado. Um anticorpo substancialmente puro

inclui um anticorpo produzido naturalmente, de forma recombinante ou sinteticamente.

[0069] Como é usado no presente documento, "quantidade terapêuticamente eficaz" refere-se a uma quantidade que resulta em uma melhoria ou remediação dos sintomas da doença ou condição.

[0070] Os antígenos úteis para a união como uma etiqueta a uma glicoproteína de núcleo fucosilados ou não fucosilado modificada da presente invenção e mais preferivelmente um anticorpo ou um seu fragmento pode ser um antígeno estranho, um antígeno endógeno, os seus fragmentos ou variantes possuindo a mesma atividade funcional .

[0071] Como é usado no presente documento, "antígeno endógeno" refere-se a uma proteína ou parte dela que está naturalmente presente no animal receptor de células ou tecido, tal como uma proteína celular, um agente imunorregulador, ou um agente terapêutico.

[0072] Como é usado no presente documento, "antígeno estranho" refere-se a uma proteína ou um seu fragmento, que é estranha para a célula ou tecido animal receptor, incluindo, mas não limitado a, uma proteína viral, uma proteína do parasita, um agente imunorregulador ou uma agente terapêutico.

[0073] O antígeno estranho pode ser uma proteína, um fragmento antigênico, ou fragmentos antigênicos deste que se originam a partir de agentes patogênicos virais e parasitárias.

[0074] Em alternativa, o antígeno estranho pode ser codificado por um gene sintético e pode ser construído usando métodos convencionais de ADN recombinante; o gene sintético pode expressar antígenos ou partes dele que se

originam de patógenos virais e parasita. Estes patógenos podem ser infecciosos em hospedeiros humanos, animais domésticos e animais silvestres.

[0075] O antígeno estranho pode ser qualquer molécula que é expressa por qualquer agente patogênico viral ou parasita, antes ou durante a entrada, a colonização, ou a replicação dentro do animal hospedeiro.

[0076] Os agentes patogênicos virais, a partir do qual os antígenos virais são derivados incluem, mas não estão limitados a, ortomixovirus, tal como o vírus da gripe (ID de Taxonomia: 59771); retrovirus, tais como o RSV, HTLV-1 (ID de Taxonomia: 39015) e HTLV-II (ID de Taxonomia: 11909); Herpes virus, como EBV (ID de Taxonomia: 10295), CMV (ID de Taxonomia: 10358) ou o vírus do herpes simplex (n° ATCC: VR-1487); Lentivirus, tais como o HIV-1 (ID de Taxonomia: 12721) e o HIV-2 (ID de Taxonomia: 11709); Rabdovirus, tais como a raiva; Picomovirus, tais como poliovirus (ID de Taxonomia: 12080); Poxvirus, tal como vaccinia (ID de Taxonomia: 10245); Rotavirus (ID de Taxonomia: 10912); e Parvovirus, tais como vírus adeno-associado 1 (ID de Taxonomia: 85106).

[0077] Exemplos de antígenos virais incluem, mas não estão limitados a, os antígenos do vírus da imunodeficiência humana Nef (National Institute of Allergy and Infectious Disease HIV, N° de Cat. de depósito 183; N° GenBank AF238278), Gag, Env (National Institute of Allergy and Infectious Disease HIV, N° de Cat. de depósito 2433;.. N° GenBank U39362), Tat (National Institute of Allergy and Infectious Disease HIV, N° de Cat. de depósito 827; N° GenBank M13137), Rev (National Institute of Allergy and Infectious Disease HIV, N° de Cat. de depósito 2088;.. N°

GenBank L14572), Pol (National Institute of Allergy and Infectious Disease HIV, N° de Cat. de depósito 238;. N° GenBank AJ237568) e de células T e B epitopos de células de gp120; o antígeno de superfície da hepatite B (N° GenBank AF043578); antígenos rotavírus, como VP4 (N° GenBank AJ293721) e VP7 (N° GenBank AY003871); antígenos do vírus da gripe, tais como a hemaglutinina (N° GenBank AJ404627); nucleoproteína (N° GenBank AJ289872); e antígenos do vírus de herpes simplex, tais como timidina cinase (N° de acesso GenBank AB047378).

[0078] Os agentes patogênicos bacterianos, a partir do qual os antígenos bacterianos são derivados, incluem, mas não estão limitados a, *Mycobacterium spp.*, *Helicobacter pylori*, *Salmonella spp.*, *Shigella spp.*, *E. coli*, *Rickettsia spp.*, *Listeria spp.*, *Legionella pneumoniae*, *Pseudomonas spp.*, *Vibrio spp.* e *Borellia burgdorferi*.

[0079] Exemplos de antígenos protetores de agentes patogênicos bacterianos incluem os antígenos somáticos de *E. coli* enterotoxigênicas, tais como o antígeno CFA/I fimbriais e a subunidade B não tóxica da toxina termolábil; pertactina de *Bordetella pertussis*, a adenilato-ciclase-hemolisina de *B. pertussis*, um fragmento C da toxina do tétano de *Clostridium tetani*, OspA de *Borellia burgdorferi*, proteínas paracristalinas à superfície da camada de proteção de *Rickettsia prowazekii* e *Rickettsia typhi*, listeriolisina (também conhecido como "Llo "e" Hly "1) e/ou a superóxido dismutase (também conhecido como "SOD "e" p60 ") de *Listeria monocytogenes*, a urease de *Helicobacter pylori*, e o domínio de ligação ao receptor de toxina letal e/ou o antígeno protetor de *Bacillus anthrax*.

[0080] Exemplos de antígenos de armas biológicas ou

patógenos incluem, mas não estão limitados a, varíola, antraz, tularemia, peste, listeria, brucelose, hepatite, vaccinia, micobactérias, coxsackie, tuberculose, malária, erhlichiosis e meningite bacteriana.

[0081] Os parasitas patogênicos, a partir do qual os antígenos de parasitas são derivados, incluem, mas não estão limitados a, *Plasmodium* spp., tais como o *Plasmodium falciparum* (n° ATCC: 30145); *Tripanossoma* spp., tais como *Trypanosoma cruzi* (n° ATCC: 50797); *Giardia* spp., tais como *Giardia intestinalis* (n° ATCC: 30888D); *Boophilus* spp., *Babesia* spp., tais como *Babesia microti* (n° ATCC: 30221); *Entamoeba* spp., tais como *Entamoeba histolytica* (n° ATCC: 30015); *Eimeria* spp., tais como *Eimeria maxima* (n° ATCC 40357).; *Leishmania* spp., (ID de Taxonomia: 38568); *Schistosoma* spp., tais como *Schistosoma mansoni* (N° GenBank AZ301495); *Brugia* spp., tais como *Brugia malayi* (N° GenBank BE352806); *Fasciola* spp., tais como *Fasciola hepática* (N° GenBank AF286903); *Dirofilaria* spp., tal como *Dirofilaria immitis* (N° GenBank AF008300).; *Wuchereria* spp., tais como *Wuchereria bancrofti* (N° GenBank AF250996); e *Onchocerca* spp.; como *Onchocerca volvulus* (N° GenBank BE588251).

[0082] Como exemplos de antígenos de parasitas incluem, mas não estão limitados a, os antígenos do estágio de pré-eritrocitários do *Plasmodium* spp., tais como o antígeno circunsporozoito de *Plasmodium falciparum* (N° GenBank M22982) *P. vivax* (N° de acesso GenBank M20670); os antígenos da estágio de fígado de *Plasmodium* spp., tais como o antígeno de estágio de fígado 1 (tal como referida como LSA-1; N° GenBank AF086802); antígenos do estágio merozoito de *Plasmodium* spp.; tal como o antígeno de superfície de merozoito 1 (também referido como MSA-1 ou de MSP-1; N°

GenBank AF199410); os antígenos de superfície de *Entamoeba histolytica*, tais como a lectina específica de galactose (Nº de acesso GenBank M59850) ou a proteína rica em serina de *Entamoeba histolytica*; as proteínas de superfície de *Leishmania spp.*, como 63 kDa glicoproteína (gp63) de *Leishmania major* (Nº GenBank Y00647) ou a glicoproteína de 46 kDa (gp46) de *Leishmania major*; paramiosina de *Brugia malayi* (Nº GenBank U77590), a isomerase triose-fosfato de *Schistosoma mansoni* (Nº GenBank W06781), a proteína semelhante a globina secretada de *Trichostrongylus colubriformis* (Nº GenBank M63263); as glutationa-S-transferases de *Fasciola hepatica* (Nº GenBank M77682); *Schistosoma bovis* (Nº GenBank M77682); *S. japonicum* (Nº GenBank U58012) e KLH de *Schistosoma japonicum* e *S. bovis* (Bashir, et al, supra)..

[0083] Exemplos de antígenos específicos de tumores incluem antígeno específico da próstata (PSA), TAG-72 e CEA; tirosinase humana (Nº GenBank M27160); proteína relacionada com a tirosinase (também referida como TRP; Nº GenBank AJ132933); e antígenos peptídicos específicos de tumores.

[0084] Como exemplos de antígenos de transplante incluem a molécula CD3 sobre as células T e antígenos de histocompatibilidade, tais como HLA A, HLA-B, HLA-C, HLA DR e HLA.

[0085] Exemplos de antígenos auto-imunes incluem a cadeia IAS β , que é útil em vacinas terapêuticas contra a encefalomielite auto-imune (Nº GenBank DB8762); descarboxilase do ácido glatâmico, o que é útil em vacinas terapêuticas contra a diabetes tipo 1 insulino-dependente (Nº GenBank NM013445); receptor de tirotrófina (TSNR), o

que é útil em vacinas terapêuticas contra a doença de Grave (Nº GenBank NM000369) e da proteína relacionada com a tirosinase 1, o que é útil em vacinas terapêuticas contra o vitiligo (Nº GenBank NM000550).

[0086] Fármacos anti-HIV que podem ser utilizados para a construção dos anticorpos ou fragmentos marcados destes incluem, mas não estão limitados a agentes antivirais, tais como inibidores de RT nucleosídeos, inibidores/antagonistas de CCR5, inibidores de entrada viral e os seus análogos funcionais. Especificamente, um agente antiviral pode ser inibidores de RT nucleosídeos, como a zidovudina (ZDV, AZT), Lamivudina (3TC), Estavudina (d4T), didanosina (ddI), zalcitabina (ddC), Abacavir (ABC), Emirivina (FTC), Tenofovir (TDF), Delaviradina (DLV), efavirenz (EFV), nevirapina (NVP), Saquinavir (SQV), Ritonavir (RTV), Indinavir (IDV), Nelfinavir (NFV), amprenavir (APV), Lopinavir (LPV), Atazanavir, Combivir (ZDV/3TC), Kaletra (RTV / LPV), Trizivir (ZDV/3TC/ABC);

[0087] Inibidores / antagonistas do CCR5, tais como SCH-C, SCH-D, PRO 140, TAK 779, TAK-220, análogos de RANTES, AK602, UK-427, 857, anticorpos monoclonais; e inibidores de entrada viral, tais como Fuzeon (T-20) (enfuvirtida), NB-2, NB-64, T-649, T-1249, C-SCH, SCH-D, PRO 140, TAK 779, TAK-220, análogos de RANTES, AK602, UK-427, 857; e análogos funcionais ou seus equivalentes.

[0088] Admite-se que muitas glicoproteínas de núcleo fucosilado e glicoproteínas não fucosiladas diferentes podem ser modificadas de acordo com os métodos da presente invenção, ou utilizadas como um agente terapêutico para a conjugação a um açúcar terminal, incluindo mas não se limitando a, hormônio adrenocorticotrópico (ACTH);

derivados do hormônio adrenocorticotrófico (por exemplo, ebitratide); angiotensina; da angiotensina II; asparaginase; peptídeos natriuréticos atriais; peptídeos atriais diuréticos de sódio; bacitracina; beta-endorfinas; fatores de coagulação sanguínea VII, VIII e IX; fator tímico sanguíneo (FTS); derivados do fator tímico sanguíneo; bombesina; fator morfogênico ósseo (BMP); proteína morfogênica óssea; bradicinina; ceruleína; polipeptídeo do gene da calcitonina (CGRF); calcitoninas; CCK-8; fatores de crescimento de células (por exemplo, EGF; TGF-alfa; TGF-beta; PDGF; EGF ácido; EGF básico); ceruleína; quimiocinas; colecistoquinina; colecistoquinina-8; colecistoquinina-pancreozimina (CCK-PZ); colistina; fatores estimuladores de colônias (por exemplo CSF; GCSF; GMCSF; MCSF); fator de liberação de corticotropina (CRF); citocinas; desmopressina; dinorfina; dipeptídeo; dismutase; dinorfina; eledoisina; endorfinas; endotelina; peptídeos endotelina-antagonista; endoterinas; encefalinas; derivados de encefalina; fator de crescimento epidérmico (EGF); eritropoietina (EPO); hormônio folículo-estimulante (FSH); galanina; polipeptídeo inibidor gástrico; polipeptídeo de liberação de gastrina (GRF); gastrinas; G-CSF; glucagon; glutatíona peroxidase; glutatio-peroxidase; gonadotrofinas (por exemplo, gonadotrofina coriônica humana e alfa e beta, subunidades das mesmas); gramicidina; gramicidinas; fator de crescimento (EGF); hormônio liberador de fator de crescimento (GRF); hormônios de crescimento; hormônio liberador do hormônio (LHRH); polipeptídeo natriurético arterial humano (h-ANP); lactogênio placentário humano; insulina; fatores de crescimento semelhantes à insulina (IGF-I; IGF-II); interferon; interferões (por exemplo,

alfa-beta-e gama-interferões); interleucinas (por exemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 e 12); polipeptídeo intestinal (VIP); kalícreína; quiotorfina; lulíberina; hormônio luteinizante (LH); hormônio liberador do hormônio luteinizante (LH-RH); cloreto de lisozima; hormônio estimulante de melanócitos (MSH); melanophore hormônio estimulante; melítina; motilina; muramílico; muramildipeptídeo; fator de crescimento do nervo (NGF); fatores nutricionais nervo (por exemplo, NT-3; NT-4; CNTF; GDNF; BDNF); neuropeptídeo Y; neurotensina; oxitocina; pancreastatina; polipeptídeo pancreático; pancreozimina; hormônio da paratireóide (PTH); pentagastrina; polipeptídeo YY; polipeptídeos de ativação ciclase pituitária (adenil PACAPs); plaquetas derivadas do fator de crescimento; polimixina B; prolactina; polipeptídeo que estimula a síntese de proteína; Proteína relacionada com PTH; relaxina; renina; secretina; fator timo soro; somatomedinas; somatostatinas derivados; superóxido dismutase; taftsin; tetragastrina; trombopoietina (TPO); fator humoral tímico (THF); timopoietina; timosina; timostimulina; hormônio liberador de hormônio da tireóide; hormônio estimulante da tireóide (TSH); hormônio liberador de tiotrofina (TRH); tripsina; tuftsina; fator de crescimento do tumor (TGF-alfa); fator de necrose tumoral (TNF); tirocidina; urogastrona; uroquinase; polipeptídeo intestinal vasoativo; e vasopressina.

[0089] glicoproteínas de núcleo fucosilado e não fucosiladas são importantes classes de biomoléculas que desempenham um papel crucial em muitos acontecimentos biológicos, tais como a adesão celular, metástase de tumores, infecções patogênicas, e resposta imune. Como

indicado aqui anteriormente, um dos principais problemas em estudos estruturais e funcionais de glicoproteínas fucosiladas ou não fucosiladas é a sua micro-heterogeneidade estrutural. Glicoproteínas fucosiladas ou não fucosiladas naturais e recombinantes são geralmente produzidas como uma mistura de glicoformas que diferem apenas na estrutura dos oligossacarídeos pendentes.

[0090] As glicoproteínas remodeladas, tais como anticorpos podem ser submetidas a outras modificações estruturais que são necessárias ou desejadas, incluindo, sem limitação, a transferência de glicosila, e a ligação seletiva (por exemplo, química clique, reação de Staudinger, etc), para introduzir o grupos funcionais adicionais ou etiquetas. Os grupos funcionais podem ser de qualquer tipo adequado, incluindo, sem limitação, as toxinas, os antígenos específicos (tais como alfa-Gal), espécies radioativas, espécies fotoativas, PEGs, etc A glicoproteína pode ser reagido cataliticamente em uma reação de cicloadição de "química clique" da funcionalidade de azida da glicoproteína com um alcino tendo a porção funcional de interesse. A azida e grupos funcionais alcino podem ser ligados nos respectivos componentes de ligação, e a glicoproteína pode ser funcionalizada com uma funcionalidade alcinilo e reagida com um composto funcionalizado por azida, incluindo a porção de interesse. Também será apreciado que outros pares de ligação podem ser concebidos para que a reação química clique.

[0091] Os anticorpos de núcleo fucosilado e não fucosilados ou seus fragmentos, produzidos de acordo com os métodos aqui descritos, podem ser usados para o diagnóstico e terapia. Cerca de dois terços das proteínas terapêuticas,

tais como os anticorpos monoclonais utilizados no mercado e/ou atualmente em ensaios clínicos são glicoproteínas. No entanto, a heterogeneidade estrutural em diferentes glicoformas de glicoproteínas naturais e recombinantes apresenta uma barreira importante no desenvolvimento de medicamentos à base de glicoproteínas, já que glicoformas diferentes podem ter diferentes atividades biológicas e controlar a glicosilação de uma glicoforma homogênea é extremamente difícil durante a expressão. A descoberta anterior da atividade de transglicosilação de uma classe de endoglicosidases representa um grande avanço no campo da engenharia de glicosilação para melhorar os potenciais terapêuticos e de diagnóstico das glicoproteínas e os mutantes de Endo-S da presente invenção são capazes de transglicosilar glicoproteínas de núcleo fucosilado e não fucosiladas naturais e recombinantes sem os aspectos negativos da hidrólise.

[0092] As características e vantagens da presente invenção são mais completamente ilustradas através dos seguintes exemplos não limitativos.

Exemplos

[0093] Geração de Mutantes EndoS Glicosintase e seu uso para Remodelação de glicosilação da Anticorpo Monoclonal Intacto Rituximab

[0094] Glicosintases foram anteriormente feitas a partir de várias endoglicosidases GH85 (ENGases), incluindo endoA, endoM, e endoD, por mutagênese dirigida ao local de uma resíduo de asparagina chave (Asn) responsável pela promoção de formação intermédia de íon oxazolinio durante a hidrólise (36. - 39, 43) é um endoS endoglicosidase pertencente à família das glicosídeo hidrolases 18 (GH18),

(40, 41), que é da mesma família de GH como EndoF1, EndoF2, e EndoF3 que foram recentemente mostrado que possuem atividade de transglicosilação (44). Com base no pressuposto de que a hidrólise catalisada por EndoS também passa por um mecanismo assistido por substrato envolvendo a formação de um intermediário íon oxazolinio, como demonstrado por outras endoglicosidases GA18, tais como EndoF3, (45) glicosintases potenciais de endoS foram criados por meio da identificação e a mutação do resíduo responsável pela promoção da formação de íons oxazolinio. Estudos estruturais e de mutagênese anteriores sobre EndoF3 demonstraram que um resíduo de ácido aspártico na posição 165 (D165), em vez de um resíduo de asparagina como nas enzimas da família GH85, é responsável por promover a formação de oxazolina e que o resíduo E167 é o ácido/base geral para hidrólise catalítica (45). O alinhamento de sequências de EndoS com EndoF3 (Figura 2), levou à identificação de dois resíduos chave em EndoS para a catálise: o resíduo D233 (correspondente a D165 em EndoF3) responsável por promover a formação de íons oxazolinio e o E235 resíduo (equivalente a E167 de EndoF3) como o resíduo ácido/base geral na hidrólise de glicano como mostrado na Figura 2. Funcionalmente, o resíduo D233 deve ser também equivalente a N171, N175, e N322 nas endoglicosidases GH85, endoA, endoM, e EndoD, respectivamente. Assim, após a abordagem para a criação de glicosintases endoA, endoM, e EndoD que procedem um mecanismo assistido por substrato via um intermediário de íon oxazolinio, (36-39) dois mutantes específicos, D233A (SEQ ID NO: 2) e D233Q (SEQ ID NO: 3), como mostrado na Figura 17, foram gerados por mutagênese dirigida ao local de EndoS (SEQ ID NO: 1). Estes mutantes,

assim como as EndoS do tipo selvagem, foram expressos em *Escherichia coli* em alto rendimento (30-40 mg/L), como uma proteína de fusão GST e purificou-se por meio de cromatografia de afinidade de glutathione.

[0095] O rituximab, um anticorpo monoclonal terapêutico, foi utilizado como um modelo de mAb para examinar a atividade de desglicosilação e atividade transglicosilação potencial das enzimas. Os principais glicanos Fc de rituximab comercial são oligossacarídeos de núcleo fucosilado biantenares de tipo complexo que transportam 0-2 porções de galactose nomeados glicoformas G0F, G1F e G2F, respectivamente, como revelado por análise de espectrometria de massa de Ionização e dessorção a laser assistida por matriz de tempo de voo (MALDI-TQF MS) dos N-glicanos liberados pela PNGase F, como mostrado na Figura 10. Tratamento de rituximab com a proteína de fusão GST-EndoS (aqui referida como EndoS do tipo selvagem ou EndoS) resultou em uma desglicosilação rápida para se obter os correspondentes Fc N-glicanos (com apenas uma GlcNAc na extremidade redutora), como mostrado na Figura 11, e o rituximab desglicosilado que porta a porção de dissacarídeo GlcNAc fucosilado (Fuc α 1,6GlcNAc) nos locais de glicosilação (N297). Estes resultados confirmam a atividade notável de Hidrólise de glicano Fc das endoS de tipo selvagem em IgG intacta, implicando a sua utilidade na primeira etapa para a remodelação da glicosilação de mAbs. O potencial de transglicosilação de EndoS e seus mutantes, em seguida, foi examinado usando o rituximab desglicosilado como o aceptor e vários oxazolininas glicano sintéticas como os substratos de doadores, como representado nas Figuras 3 A e B. O processo de remodelação de glicosilação foi

monitorizado por eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE) e espectrometria de massa de cromatografia líquida (LC-MS), tal como mostrado na Figura 4. A cadeia pesada e cadeia leve de rituximab apareceu a cerca de 50 kDa e cerca de 25 kDa, respectivamente, sob condições redutoras (a, pista 1, na Figura 4A). Após desglicosilação com EndoS de tipo selvagem, a cadeia pesada apareceu como uma única banda a aproximadamente 48 kDa, sugerindo que a remoção dos dois N-glicanos (cada um a partir de uma cadeia pesada) de rituximab (a, pista 2, na Figura 4A). A incubação do rituximab desglicosilado (1) e a oxazolina sialoglicano sintético (2) (ver Figura 3A para estruturas) (razão molar doador/aceptor, 50:1) com o mutante Endos-D233A deu um produto de transglicosilação (3), cuja cadeia pesada apareceu como uma banda única que era de cerca de 2 kDa maior do que a do rituximab desglicosilado (1) (a, pista 3, a Figura 4A). Este resultado sugere que um novo N-glicano foi ligado a cada uma das cadeias pesadas de Fc. A incubação de (1) e (2) com Endos-D233Q deu o mesmo produto de transglicosilação (a, pista 4, Figura 4A). Curiosamente, um transglicosilação essencialmente quantitativa para o domínio Fc do anticorpo intacto foi alcançado dentro de 1 h de incubação. Verificou-se que um tempo de incubação (10 h) não levam à hidrólise do produto de transglicosilação. Estes resultados indicam que os dois mutantes de EndoS são novas glicosintases eficazes que permitam a glicosilação de IgG intacta desglicosilada com o N-glicano de tipo complexo, sem a hidrólise do produto.

[0096] O transglicosilação foi ainda caracterizada por análise por LC-MS. A cadeia pesada e cadeia leve de

rituximab foram separadas sob uma condição de LC-MS, como se mostra na Figura 12. A desconvolução dos dados MS da cadeia leve deu uma massa de 23 044, o que era consistente com a massa calculada de cadeia leve de rituximab ($M = 23\ 042\ \text{Da}$) (47). A desconvolução dos dados de MS da cadeia pesada deu três espécies distintas m/z , 50508, 50670, e 50834, como mostra o gráfico B, na Figura 4 A, que estavam em boa concordância com a massa teórica de glicofomas cadeia pesada: G0F, $M = 50\ 515\ \text{Da}$; G1F, $M = 50\ 677\ \text{Da}$; e G2F, $M = 50\ 839\ \text{Da}$; respectivamente. (47) A espectrometria de massa de ionização de spray de elétrons deconvoluidos (ESI-MS) da cadeia pesada do rituximab desglicosilada (1) mostrou uma única espécie de 49 420, como mostra o gráfico C na Figura 4B, o qual condiz bem com uma cadeia pesada carregando uma porção dissacarídeo Fucol,6GlcNAc (calculado, $M = 49\ 420\ \text{Da}$). Após a remodelação de glicosilação, um único pico a 51426 foi observado a partir da cadeia pesada do produto de transglicosilação (3), com uma adição de 2,006 Da à cadeia pesada desglicosilada do rituximab, como mostra o gráfico d na Figura 4B. Este resultado indica a fixação de um sialoglicano da oxazolina açúcar correspondente (2) à cadeia pesada. A banda única em SDS-PAGE e espectros de MS puros do produto de transglicosilação sugerem claramente que a transglicosilação foi essencialmente quantitativa sobre os dois sítios de glicosilação do domínio Fc no rituximab (glicosilação incompleta de qualquer um dos dois locais do homodímero Fc resultaria na observação de cadeia pesado Fucol,6GlcNAc após a redução, $M = 49\ 420\ \text{Da}$). Para confirmar ainda que o N-glicano foi especificamente ligado ao GlcNAc do domínio Fc, o conjunto de N-glicanos foram

liberados a partir do rituximab glico-remodelado (3) por tratamento com PNGase F, que hidrolisa especificamente a ligação amida entre a ligação Asn -glicano. Os N-glicanos liberados foram marcadas pela marcação fluorescente 2-aminobenzamida (2-AB) e foram submetidas a cromatografia fluorescente líquida de alta eficiência (HPLC) e análise por MS. A análise por LC-MS revelou claramente que o N-glicano liberado era esperado o N-glicano tipo complexo biantenar portando núcleo de fucose e os ácidos siálicos terminais, que consistia em cerca de 92% de N-glicanos disialilados e cerca de 8% de N-glicanos monosialilados, tal como mostrado na Figura 13b. A composição de N-glicanos foi bem consistente com a relação encontrada na oxazolina N-glicano correspondentes (2) utilizada para a transglicosilação. Este resultado confirma que a transferência de N-glicanos foi especificamente ligado ao primer de GlcNAc no rituximab desglicosilado.

[0097] Os resultados apresentados no presente documento representam o primeiro relatório de remodelação de glicosilação de um anticorpo monoclonal IgG intacto, com uma transferência em bloco de um N-glicano natural de tipo complexo de tamanho completo ao domínio Fc através de um protocolo deglicosilação-reglicosilação altamente eficiente habilitado pelo uso combinado de EndoS e glicosintase baseado em EndoS. Após a conclusão da transglicosilação, o produto foi purificado por meio de uma cromatografia de afinidade de proteína A simples, dando a glicoforma homogênea bem definida. Deve-se salientar que o rituximab comercial contém apenas traços de glicoforma sialilada, como mostrado na Figura 13a. Uma vez que Fc e IgG sialiladas foram propostas como tendo atividade anti-

inflamatória, o rituximab modificado por glicoengenharia portando Fc N-glicanos totalmente sialilados podem ter uma função anti-inflamatória, assim potencialmente a expandir a sua cobertura terapêutica de tratamento do câncer para o tratamento de doenças auto-imunes. (21, 22)

[0098] Além da oxazolina N-glicanos de tipo complexo sialilada (2), os mutantes EndoS foram igualmente eficientes para usar a oxazolina de núcleo de Man3GlcNAc (4) (48) e o N3Man3GlcNAc oxazolina etiquetada com azido (6) (49) para glicoengenharia de rituximab, levando à formação das correspondentes glicoformas homogêneas, (5) e (7), respectivamente, como mostrado na Figura 3A. O ESI-MS deconvolvido da cadeia pesada do produto de transglicosilação (5) mostrou uma única espécie de 50 112, como mostra o gráfico e na Figura 4C, que correspondeu bem com a massa molecular calculada ($M = 50\ 109$ Da) da cadeia pesada de rituximab carregando um glicano Man3GlcNAc2. Da mesma forma, o ESI-MS deconvolvido da cadeia pesada de produto de transglicosilação (7) mostrou uma única espécie de 50 143, tal como mostrado no gráfico E na Figura 4C, que estava em boa concordância com a massa molecular calculada ($M = 50\ 134$ Da) da cadeia pesada de rituximab portando um N3Man3GlcNAc2 glicano. Novamente, estes resultados indicam que a transglicosilação é essencialmente quantitativa. Deve notar-se que a diminuição da razão molar de doador/aceptor de 25:1 ainda resultou na transformação eficiente, implicando a eficiência notável transglicosilação dos mutantes endoS glicosintase. Em particular, a introdução seletiva de funcionalidade azida no núcleo da Fc de N-glicanos em anticorpos monoclonais intactos permitirá mais modificações específicas de local de anticorpos através da

química clique, (50, 51) que pode ser utilizada para fins de etiquetagem e de direcionamento, ou para expandir a diversidade de glicoformas anticorpos para estudos da relação estrutura-atividade.

[0099] EndoS de tipo selvagem também foi testado para transglicosilação de rituximab deglicosilato (1) com as oxazolininas glicano (2 e 4) sob as mesmas condições que os mutantes com EndoS e observou-se que apenas a formação transitória dos produtos transglicosilação correspondentes foi encontrado como monitorizado por LC-MS, provavelmente devido à hidrólise rápida *in situ* dos produtos pela enzima do tipo selvagem. Recentemente, Scanlan, Davis e colaboradores relataram um estudo independente sobre a especificidade de substrato de EndoS e demonstrou que EndoS de tipo selvagem poderia usar Man3GlcNAc oxazolina para transglicosilação eficiente de IgG desglicosilada. (42) Para fazer face a esta aparente discrepância de observações, a eficiência de transglicosilação de EndoS de tipo selvagem foi reavaliada a uma temperatura inferior (4°C) utilizando uma quantidade muito menor de enzima, seguindo o relatório recente (42). Usando esta condição modificada, transglicosilação significativa foi observada para a rituximab desglicosilada (1) com o complexo oxazolina açúcar (2) pelos endoS de tipo selvagem no período de incubação inicial, mas o produto foi gradualmente hidrolisado quando a incubação continuou, como mostrado na Figura 14. Assim, a condição de reação deve ser cuidadosamente controlada a fim de prender o produto de transglicosilação quando de EndoS tipo selvagem é usada. Para aplicação prática, os mutantes glicosintase EndoS devem ser a escolha para transglicosilação eficiente e

completa, uma vez que são desprovidos de produto atividade hidrolítica.

[00100] Glicoengenharia de Rituximab para fornecer glicoforma G2 Não fucosilada e galactosilada

[00101] Para a terapia anticâncer, glicoformas de IgG não fucosiladas são desejáveis, uma vez que foi previamente demonstrado que mAbs com baixa teor de fucose do FC N-glicanos mostrou atividade ADCC melhorada in vitro e maior eficácia anticâncer in vivo, especialmente para aqueles pacientes portadores do alelo F158 de baixa afinidade do receptor FcγIIIa. (16-19, 52) no método eficiente disponível para transformar eficientemente um mAb fucosilado existente (a principal glicoforma de mAb recombinante produzido em células de mamífero) a um mAb não fucosilado. Para resolver esse problema, uma série de α -fucosidases disponíveis comercialmente foram testadas, mas nenhum pode remover o α 1,6-fucose no rituximab intacto, ver esquema nas Figuras 5 A e B. Estes resultados implicam que a porção α 1,6-fucose pode ser protegida pelo domínio Fc e/ou o N-glicano complexo, tornando-os inacessíveis para α -fucosidases. Foi teorizado que, após deglicosilação, a glicoforma Fuc(α 1,6)GlcNAc resultante de rituximab poderia ser mais acessível a α -fucosidases. Por conseguinte, a atividade de várias α -fucosidases disponíveis comercialmente foi testada no rituximab desglicosilado (1) que carrega apenas a porção Fuc(α 1,6)GlcNAc. Verificou-se que uma α -fucosidase inespecífica de rim bovino tinha uma atividade moderada e foi capaz de remover o resíduo de fucose a partir do rituximab desglicosilado (1) para dar o rituximab contendo GlcNAc (8) (ver Figuras 15 A e B). Apesar de que uma quantidade relativamente grande de α -

fucosidase e um tempo de reação prolongado foram necessários para alcançar uma defucosilação completa do rituximab EndoS-desglicosilada devido à atividade moderada de a α -fucosidase, a descoberta desta atividade α -fucosidase fornece uma forma alternativa para obter o precursor defucosilado rituximab (8) para mais glicoengenharia.

[00102] Em seguida, determinou-se que as glicosintases EndoS-D233A e EndoS-D233Q também foram eficientes para reconhecer o GlcNAc não fucosilado em (8) para a transglicosilação com uma oxazolina N-glicano sialilada (9) (38) para fornecer a glicofoma G2 homogênea, não fucosilada (10) em uma conversão essencialmente quantitativa, Figura 5. O produto foi purificado por cromatografia de afinidade de proteína A. A identidade e pureza do produto modificada por glicoengenharia (10) foram confirmadas por SDS-PAGE e análise por LC-MS, como se mostra na Figura 6. O rituximab defucosilado (8) mostrou uma única espécie de 49 274 (figura 6b), o que confirma a remoção da fucose (calculado para a cadeia pesada de GlcNAc-rituximab, $M = 49\,274$ Da). O ESI-MS deconvolvido da cadeia pesada do produto de transglicosilação (10) apareceu como uma única espécie de 50 695 (Figura 6c), o que correspondeu bem com a massa molecular calculada ($M = 50\,693$ Da) de cadeia pesada de rituximab portando um N-glicano tipo complexo asialilado biantenar, $\text{Gal2GlcNAc2Man3GlcNAc2}$. Em um estudo comparativo, verificou-se também que, embora os mutantes D233A e D233Q reconheceram tanto o GlcNAc-rituximab fucosilado (1) como GlcNAc-rituximab não fucosilado (8) como aceptores para transglicosilação, os dois mutantes glicosintase preferiram o GlcNAc-GlcNAc-

rituximab fucosilado (1) como aceptor, com uma reação de transglicosilação mais rápida do que o aceptor não fucosilado (8) (dados não mostrados). Tomados em conjunto, estes resultados experimentais revelaram uma abordagem enzimática combinada para fazer a glicoforma homogênea não fucosilada e totalmente galactosilada a partir de anticorpos monoclonais comercialmente disponíveis. O rituximab não fucosilado e galactosilado resultante deverá ter funções efectoras ADCC e CDC melhoradas, tal como sugerido por estudos anteriormente. (2, 16-20, 52)

[00103] Glicoengenharia de Fc específica de local de IVIG para fornecer glicoformas IVIG totalmente Fc sialiladas

[00104] A remodelação de glicosilação bem sucedida de rituximab levou ao exame do método quimioenzimático para glicoengenharia de IVIG com o objetivo de aumentar a sua atividade anti-inflamatória. IVIG são frações de IgG agrupadas purificadas a partir do plasma de milhares de doadores saudáveis. Estudos recentes têm sugerido que uma glicoforma Fc menor, $\alpha 2,6$ -sialilada é a espécie ativa na IVIG que confere a atividade anti-inflamatória, como demonstrado em um modelo de rato com artrite reumatóide. (21, 22, 53, 54) Uma vez que as glicoformas Fc sialiladas são componentes secundários em IVIG, (55), a dependência de atividade anti-inflamatória de IVIG na sialilação de Fc terminal pode explicar em parte por que uma dose elevada (1-2 g/kg) de infusão de IVIG é necessária para conferir proteção. A sialilação direta de Fc e IVIG foi tentada usando $\alpha 1,6$ -sialiltransferase humana (ST6Gal-I), mas a eficiência foi baixa, e na maioria dos casos, apenas glicoformas monosialiladas foram obtidos como produtos principais. (22, 56) Além disso, cerca de 30 % dos domínios

FAB em IVIG são N-glicosiladas e o enriquecimento de lectina glicoformas Fc sialiladas de IVIG, seria menos eficaz quando os glicanos FAB são sialilados. (2, 57) Portanto, seria altamente desejável se glicoengenharia Fc-específica com N-glicanos sialilados pudessem ser alcançado sem alterar a glicosilação de FAB.

[00105] Verificou-se que endoS era capaz de desglicosilar seletivamente o domínio Fc de IVIG sem hidrolisar os N-glicanos aos domínios FAB sob condições suaves. Além disso, o domínio Fc de IVIG desglicosilada (11) poderia ser glicosilado seletivamente com uma oxazolina sialoglicano (2) pelo mutante EndoS-D233Q para dar o Fc IVIG totalmente sialilada (12), como mostrado na Figura 7. A glicoengenharia primeiro foi monitorada por análise de SDS-PAGE. A desglicosilação e reglicosilação de IVIG foram aparentes como se mostra na alteração do tamanho da banda da cadeia pesada, como mostrado na Figura 16. Para caracterizar ainda mais a seletividade de local da glicoengenharia de IVIG, os domínios de Fab e Fc foram desconectados por digestão por papaína. (58) O domínio Fc foi isolado por cromatografia de afinidade de proteína A e os domínios FAB deixados no fluxo de passagem foram isolados por cromatografia de exclusão de tamanho no sistema de cromatografia líquida de proteína rápida (FPLC). Em seguida, os N-glicanos de Fc e FAB foram liberados separadamente por tratamento com PNGase F, marcada com 2-aminobenzamida (2-AB), (59) e analisados por HPLC (detecção fluorescente e quantificação) e caracterização por MS. Os perfis FAB e Fc N-glicano antes e depois glicoengenharia de IVIG foram mostrados na Figura 8. Verificou-se que os padrões de glicosilação Fc de IVIG foram mais complexos do

que a glicosilação Fc de anticorpo monoclonal com rituximab. Além das glicoformas G0F, G1F e G2F como os principais componentes, havia uma quantidade significativa de glicoformas monosialiladas (picos 2 e 7) (aproximadamente 10%) e glicoformas contendo GlcNAc bissecional (picos 13-15) (5%) (Figura 8a). A glicosilação Fc após glicoengenharia (através de EndoS-deglicosilação e transglicosilação posterior com oxazolina sialoglicano (2) por EndoS-D233Q) mostrou os glicanos totalmente sialilados (picos 1 e 6) como as principais glicoformas (> 90%) (Figura 8b). Curiosamente, os padrões de glicosilação FAB foram semelhantes antes e depois do processo de glicoengenharia (comparar com a figura 8, c e d), exceto a geração de uma pequena quantidade da glicoforma totalmente sialilada (pico 6). Estes resultados indicam que o processo de remodelação de glicosilação à base de EndoS é altamente seletiva para os N-glicanos de Fc de anticorpos de IgG intactos, mesmo na presença de glicosilação de FAB. A seletividade notável e alta eficiência da atual abordagem de glicoengenharia de Fc fornecem uma nova via para transformar o IVIG comercial em preparação de IVIG totalmente Fc-sialiladas que se espera que exiba atividade anti-inflamatória aumentada, como demonstrado em estudos anteriores usando um modelo de camundongo. [21, 22, 53, 54)

[00106] Ligação do Rituximab Modificado por glicoengenharia para o Receptor Fcγ estimulador (FcγRIIIa) e do Receptor Fcγ Inibidor (FcγRIIb)

[00107] A afinidade das glicoformas remodeladas do rituximab para os respectivos receptores (FcγRHIIa-F158, FcγRIIIa-V158, e FcγRIIb) foi examinado por análise de

ressonância de plasmão de superfície (SPR). As glicoformas de rituximab foram imobilizadas por local específico em chips de uma proteína e os receptores de Fcγ em várias concentrações foram injetados como analitos, seguindo os procedimentos relatados recentemente (35). Como esperado, a glicoforma G2 não fucosilada mostrou melhoria significativa de afinidade tanto para os receptores FcγRIIIa de alta afinidade como de baixa afinidade, FcγRIIIa-F158 e FcγRIIIa-V158, quando comparado com o rituximab, disponível comercialmente, como mostrado na Figura 9. Os valores de K_d para a ligação da glicoforma G2 (10) para o FcγRIIIa-F158 e FcγRIIIa-V158 foram 123 ± 11 e 12 ± 2 nM, respectivamente, que foram obtidos através do ajuste dos dados de ligação com um modelo de estado estacionário 01:01 usando o software de avaliação BIAcore T100. Por outro lado, os valores de K_D para a ligação do rituximab comercial para o FcγRIIIa-F158 e FcγRIIIa-V158 foram estimados como sendo 1042 ± 155 e 252 ± 18 nM, respectivamente. Assim, a afinidade da glicoforma G2 modificada por glicoengenharia para os receptores Fcγ de baixa afinidade e de alta afinidade (FcγRIIIa-F158 e FcγRIIIa-V158) foi de cerca de 9 vezes e 20 vezes maior do que o rituximab comercial, respectivamente. Por outro lado, a glicoforma G2 e o rituximab comercial demonstraram afinidade comparável para o inibidor do receptor Fcγ FcγRIIb com os valores de K_D de $2,3 \pm 0,5$ e $2,0 \pm 0,7$ μM, respectivamente. Estes resultados revelam um ganho claro de funções benéficas para o rituximab modificado por glicoengenharia. Deve-se salientar que uma preparação eficiente de glicoformas FcγRIIIa de alta afinidade de ligação é clinicamente significativo para abordar a questão do polimorfismo receptor Fcγ encontrado

em pacientes com câncer que são menos ou não responsivos ao tratamento com anticorpos monoclonais comuns. Nestes pacientes, o alelo FcγRIIIa-F158 tem uma baixa afinidade para os mAbs terapêuticos, tais como rituximab, em comparação com o receptor de elevada afinidade, o alelo FcγRIIIa-V158. (52, 60, 61). Funções efetoras mediadas pelo receptor Fcγ foram também sugeridas ser um mecanismo importante para conseguir a imunidade protetora de anticorpos neutralizantes de HIV. (62) Assim, a abordagem glicoengenharia descrita no presente documento pode encontrar amplas aplicações na produção de várias glicoformas definidas de anticorpos monoclonais valiosos para os estudos funcionais, bem como para aplicações biomédicas.

[00108] Uma abordagem eficiente para glicoengenharia quimioenzimática de anticorpos IgG intactas é descrita no presente documento. As duas novas glicosintases baseados em EndoS geradas pelo local de mutagênese dirigida demonstram uma ampla especificidade de substrato capaz de transferir N-glicanos sialilados e asialilados e do tipo complexo, assim como núcleo de N-glicanos modificados seletivamente das oxazolinas glicanos correspondentes aos anticorpos intactos Fc-desglicosilados. Além disso, a abordagem de desglicosilação / reglicosilação é eficaz para ambos os anticorpos IgG, de núcleo fucosilado e não fucosilado quando um α -fucosidase é adequadamente combinada. Estas novas descobertas aumentam significativamente o alcance do método quimioenzimático e tornada possível uma transformação eficiente dos anticorpos monoclonais intactos em várias glicoformas bem definidas que são até aqui difícil de obter por métodos já existentes. Espera-se que

esta abordagem glicoengenharia possa facilitar o desenvolvimento de produtos biológicos biosimilares e/ou biomelhorados que possuem uma eficácia terapêutica e/ou obter novas funções.

Materiais e métodos

[00109] Anticorpo monoclonal rituximab (rituxan, Genentech Inc., South San Francisco, CA) e IVIG foram adquiridos através Premium Health Services Inc. (Columbia, MD). Sialoglicano oxazolina (2) e oxazolina de tipo asialoglicano complexo (5) foram sintetizados seguindo procedimento relatado anteriormente. (38, 46). α 1-fucosidase de rim bovino foi adquirida da Sigma (St. Louis, MO) e Prozyme (Hayward, CA). Endo-PN-acetilglucosaminidase de *Arthrobacter protophormiae* (endoA) e endo-PN-acetilglucosaminidase de *Mucor hiemalis* (endoM) e seus mutantes foram produzidos em excesso em *E. coli* seguindo os procedimentos relatados (38). PNGase F foi adquirido a partir de New England Biolabs (Ipswich, MA).

[00110] Cromatografia Líquida de Espectrometria de Massa (LC-MS)

[00111] A LC-MS foi realizada em um sistema LXQ (Thermo Scientific) com uma coluna Hypersil GOLD (1,9 μ m, 50 x 2,1 mm). As amostras de IgG foram tratadas com 0,5% de β -mercaptoetanol e aquecidas a 60°C durante 15 min, em seguida, submetida a medição LC-MS. A análise foi realizada a 60°C, efetuando a eluição com um gradiente linear de 10-40% de MeCN contendo 0,1% de ácido fórmico em 10 min a um caudal de 0,25 mL / min.

[00112] Espectrometria de Massa de ionização de Elétron spray de (ESI-MS) e Espectrometria de Massa de Ionização e dessecção a laser assistida por matriz de tempo de voo

(MALDI-TOF MS)

[00113] Os espectros ESI-MS foram medidos em um único espectrômetro de massa quádruplo Waters Micromass ZQ-4000. O MALDI-TOF MS foi realizada em um espectrômetro de massa Autoflex II MALDI-TOF (Bruker Daltonics, Billerica, MA). O instrumento foi calibrado usando o kit de calibração ProteoMass Peptide MALDI-MS (MSCAL2, Sigma / Aldirich). A matriz de ácido 2,5-di-hidroxibenzóico (DHB) foi utilizada para os glicanos neutros e 2',4',6'-trihidroxiacetofenona (THAP) foi utilizada para os glicanos ácidos.

[00114] Sobre-expressão e purificação de EndoS e Mutantes

[00115] EndoS de tipo selvagem foi produzida em excesso em *E. coli* e purificada de acordo com os procedimentos relatados anteriormente, (40, 63) usando o plasmídeo pGEX-EndoS que foi gentilmente oferecido pelo Dr. M. Collin (Universidade de Lund, Suécia). Os dois mutantes de EndoS, D233A e D233Q, foram gerados usando o kit de mutagênese dirigida ao local GeneArt (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante. O plasmídeo pGEX-EndoS foi utilizado como molde, e LA Taq polimerase (Takara, Japão) foi utilizada para a PCR. As mutações foram confirmadas por sequenciamento de ADN e transformado em BL21 (DE3). Os transformantes foram cultivados em meio Luria-Bertani que contém 100 mg/L de carbenicilina e induzidos com 0,1 mM de isopropil-PD-tiogalactopiranosídeo durante 16 h a 25°C. As células foram colhidas por centrifugação a 1700g durante 15 min a 4°C. O sedimento celular foi suspenso em solução salina tamponada com fosfato (pH 7,4) com lisozima e PMSF. A mistura de lise foi centrifugada a 16000g durante 20 min a 4°C. Após a centrifugação, o sobrenadante da lise celular foi aplicado a 3 mL de 50% de resina de glutational-

Sepharose 4B (GE Healthcare). As amostras foram incubadas a 25°C durante 60 min com agitação suave. A resina foi aplicada a uma coluna de 10 mL (PD-10 de GE Healthcare) e lavou-se cinco vezes com PBS. 500 µL de tampão de eluição de glutathione (50 mM Tris-HCl, glutathione 10 mM, pH 8,0) foi adicionado à coluna, incubou-se à temperatura ambiente durante 5 min, recolheu-se, e, em seguida, repetiu-se três vezes. As frações eluídas foram reunidas e submetidas a diálise contra tampão de fosfato de sódio (50 mM, pH 7,0) durante a noite a 4°C. As amostras de proteína foram então concentradas utilizando filtros Amicon de ultra centrifuga de 10 kDa (Millipore). As amostras de proteína concentradas foram analisadas por SDS-PAGE, e a concentração de proteína foi quantificada utilizando um espectrofotômetro 2000c Nano-Drop. O rendimento da produção excessiva dos endoS de tipo selvagem foi de aproximadamente 40 mg/L, e o rendimento para os mutantes foi de aproximadamente 30 mg/L.

[00116] Desglicosilação de Rituximab por EndoS de tipo selvagem para dar (Fucol,6) GlcNAc-Rituximab (1)

[00117] Rituximab comercial (20 mg) em tampão Tris-Cl (50 mM, pH 8,0, 2 mL) foi incubado com EndoS (30 µg) a 37°C durante 1 h. as análises LC-MS e de SDS-PAGE indicaram que a clivagem completa dos N-glicanos na cadeia pesada. A mistura de reação foi submetida a cromatografia de afinidade em uma coluna de proteína A- resina agarose (5 mL) que foi pré-equilibrada com um tampão Tris-Cl (20 mM, pH 8,0). A coluna foi lavada com Tris-Cl (20 mM, pH 8,0, 25 mL) e glicina-HCl (20 mM, pH 5,0, 20 mL), sucessivamente. A IgG ligada foi liberada com glicina-HCl (100 mM, pH 2,5, 20 mL), e as frações de eluição foram imediatamente neutralizadas com tampão Tris-Cl (1,0 M, pH 8,8). As

frações contendo os fragmentos Fc foram combinadas e concentradas por filtração centrífuga (filtro centrífugo Amicon Ultra, Millipore, Billerica, MA) para dar (Fuc α 1,6) GlcNAc-rituximab (1) (18 mg). LC-MS: calculado para a cadeia pesada de (Fuc α 1,6) GlcNAc-rituximab (1), $M = 49\ 420$ Da, (47) encontrado (m/z), 49 420 (dados de desconvolução).

[00118] Transglicosilação de (Fuc α 1, 6) GlcNAc-Rituximab (1) com Sialoglicano de oxazolina (2) por Mutantes de EndoS D233A ou D233Q

[00119] Uma solução de (Fuc α 1,6) GlcNAc-rituximab (1) (10 mg) e sialoglicano-oxazolina (2) (10 mg) em tampão Tris (50 mM, pH 7,4, 2 ml) foi incubada com o mutante de EndoS D233A ou D233Q (200 μ g), a 30°C. Foram recolhidas amostras em intervalos e foram analisadas por LC-MS. Após 2-3 h, a monitorização LC-MS indicou a reação completa de (Fuc α 1,6) GlcNAc-rituximab (1) para dar o produto de transglicosilação (3) que porta os N-glicanos completamente sialilados. A mistura de reação foi submetida a uma cromatografia de afinidade em uma coluna de agarose-proteína A de acordo com o procedimento descrito acima. As frações contendo o produto foram combinadas e concentradas por ultracentrifugação para dar o rituximab sialilado (3) (11 mg, quantitativo). LC-MS: calculado para a cadeia pesada de (3) que porta o N-glicano totalmente sialilado de, $M = 51\ 421$ Da; encontrado (m/z), 51 426 (dados de desconvolução).

[00120] Transglicosilação de (Fuc α 1,6) GlcNAc-Rituximab (1) com Man3GlcNAc oxazolina (4) e Man3GlcNAc oxazolina etiquetada com azida (6) por endoS-D233Q

[00121] A transglicosilação foi realizada como descrito

para a preparação de (3) para dar os produtos correspondentes. A análise por LC-MS de rituximab modificado por glicoengenharia (5 e 7): calculado para a cadeia pesada de (5) que porta o Man3GlcNAc2 N-glicanos fucosilados, $M = 50\ 109$ Da; encontrado (m/z), 50 112 (dados de desconvolução); calculado para a cadeia pesada de (7) portando o azido-Man3GlcNAc2 N-glicano fucosilado, $M = 50\ 134$ Da; encontrado (m/z), 50 143 (dados de desconvolução).

[00122] Defucosilação de (Fuc α 1,6) GlcNAc-Rituximab (1) por uma Fucosidase de rim bovino

[00123] Uma solução de (Fuc α 1,6) GlcNAc-rituximab (1) (2 mg) em tampão fosfato (50 mM, pH 5,5, 200 μ l) contendo azida de sódio a 0,05 foi incubada com o fucosidase de rim bovino (Prozyme, 5 U) a 37°C. Foram recolhidas amostras em intervalos e foram analisados por LC-MS. Após 20 dias, o acompanhamento LC-MS indicou o defucosilação completa de (Fuc α 1,6) GlcNAc-rituximab (1) para dar o produto, GlcNAc-rituximab (2). A mistura de reação foi submetida a cromatografia de afinidade em uma coluna de proteína A, seguindo o procedimento descrito acima. As frações contendo o produto foram combinadas e concentradas por ultracentrifugação para dar GlcNAc-rituximab (2) (2 mg, quantitativo). LC-MS: calculado para a cadeia pesada de GlcNAc-rituximab (2) portador de uma porção GlcNAc, $M = 49\ 274$ Da; encontrado (m/z), 49 274 (dados de desconvolução).

[00124] Transglicosilação de GlcNAc-Rituximab (4) com Glicano oxazolina de tipo complexo Asialilado (5) por D233Q Mutant

[00125] Uma solução de GlcNAc-rituximab (4) (2 mg) e oxazolina (5) (5 mg) em tampão Tris (50 mM, pH 7,4, 0,5 mL) foi incubada com o endoS-D233Q (200 μ g) a 37°C. Foram

recolhidas amostras em intervalos e foram analisados por LC-MS. Após 2 h, a monitorização LC-MS indicou a reação completa de 4 para se obter o produto de transglicosilação correspondente (6). A mistura de reação foi submetida a cromatografia de afinidade em uma coluna de proteína A. As frações contendo o produto foram combinadas e concentradas por ultracentrifugação para dar a glicofoma não fucosilada de rituximab (6) (2 mg, quantitativo). LC-MS: calculado para a cadeia pesada de (6) que porta o N-glicano não fucosilado, $M = 50\ 693$ Da; encontrado (m/z), 50 695 (dados de desconvolução).

[00126] Desglicosilação sítio específica no Fc Domínio de IVIG por EndoS

[00127] IVIG comercial (20 mg) em tampão Tris-Cl (50 mM, pH 8,0, 2 ml) foi incubada com EndoS (SEQ ID NO: 1) (30 pg), a 37°C durante 1 h. O resíduo foi sujeito a cromatografia de afinidade em uma coluna de proteína A para se obter o (Fuc α 1,6) GlcNAc-IGIV (20 mg, quantitativo), em que os N-glicanos de Fc foram removidos, deixando a GlcNAc α 1,6-fucosilado nos locais N297.

[00128] Transglicosilação de (Fuc α 1,6) GlcNAc-IVIG com oxazolina Sialoglicano (2) por D233Q Mutant

[00129] Uma solução de ((Fuc α 1,6) GlcNAc-IGIV (3 mg) e sialoglicano-oxazolina (2) (3 mg) em tampão Tris (50 mM, pH 7,4, 2 ml) foi incubada com o mutante D233Q (SEQ ID NO: 2) (60 pg), a 30°C. Após 2 h, a análise de SDS-PAGE indicou a reação completa de (Fuc α 1,6) GlcNAc-TVIG para dar o produto de transglicosilação. A mistura de reação foi submetida a cromatografia de afinidade em uma coluna de proteína A para proporcionar o IVIG remodelado-glico (3 mg, quantitativo), em que os N-glicanos de Fc foram remodelados para os N-

glicanos de tipo complexo totalmente sialilados.

[00130] Experimentos de ligação de Ressonância plasmônica de Superfície (SPR)

[00131] A ligação entre as diferentes glicoformas de receptores de IgG e Fcγ foi medida por ressonância plasmônica de superfície (SPR), utilizando um instrumento Biacore T100 (GE Healthcare, EUA). Uma proteína de 5000 RU foi imobilizado em um chip de biossensor CM5 (GE Healthcare) utilizando uma química de acoplamento de amina primária padrão a pH 4,5 para capturar as diferentes glicoformas de IgG. Uma célula de fluxo de referência foi preparada de modo semelhante, sem injeção de proteína A. Cada glicoforma individual de IgG em tampão HBS-P (HEPES 10 mM pH 7,4, NaCl 0,15 M, 0,05% v/v de tensioativo P20) foi injetado a 10 µL/min à proteína A de superfície e atingiu o nível de captura de 150 RU. A diluição em série de receptores FcγIIIa e FcγIIb foi injetada em 10 µL/min. Depois de cada ciclo, a superfície foi regenerada através da injeção de 10 mM de HCl a 10 µL/min durante 30 s. Os dados foram ajustado em um modelo de ligação 01:01 Langmuir usando software de avaliação BIAcore T100 para obter os dados de constante de equilíbrio (KD).

[00133]

Referências

[00134] Os conteúdos de todas as referências aqui citadas são incorporadas no presente documento por referência para todos os fins.

[00135] 1. Adams, G. P.; Weiner, L. M., Monoclonal antibody therapy of cancer. Nat. Biotechnol. 2005, 23, 1147-1157.

[00136] 2. Jefferis, R., Glycosylation as a strategy to

improve antibody-based therapeutics. *Nat. Rev. Drug Discovery* 2009, 8, 226- 234.

[00137] 3. Aggarwal, S., What's fueling the biotech engine-2010 to 2011. *Nat. Biotechnol.* 2011, 29, 1083- 1089.

[00138] 4. Nimmeijahn, F.; Ravetch, J. V., Fcγ receptors as regulators of immune responses. *Nat. Rev. Immunol.* 2008, 8, 34- 47.

[00139] 5. Takahashi, N.; Nakagawa, H.; Fujikawa, K.; Kawamura, Y.; Tomiya, N., Three-dimensional elution mapping of pyridylaminated N-linked neutral and sialyl oligosaccharides. *Anal. Biochem.* 1995, 226, 139-146.

[00140] 6. Wormald, M. R.; Rudd, P. M.; Harvey, D. J.; Chang, S. C.; Scruggs, I. G.; Dwek, R. A., Variations in Oligosaccharide-Protein Interactions in Immunoglobulin G Determine the Site-Specific Glycosylation Profiles and Modulate the Dynamic Motion of the Fc Oligosaccharides. *Biochemistry* 1997, 36, 1370- 1380.

[00141] 7. Jefferis, R., Glycosylation of Recombinant Antibody Therapeutics. *Biotechnol. Prog.* 2005, 21, 11-16.

[00142] 8. Sonderrmann, P.; Huber, R.; Oosthuizen, V.; Jacob, U., The 3.2-Å crystal structure of the human IgG1 Fc fragment-FcγR1 complex. *Nature* 2000, 406, 267- 273.

[00143] 9. Krapp, S.; Mimura, Y.; Jefferis, R.; Huber, R.; Sonderrmann, P., Structural Analysis of Human IgG-Fc Glycoforms Reveals a Correlation Between Glycosylation and Structural Integrity. *J. Mol. Biol.* 2003, 325, 979- 989.

[00144] 10. Crispin, M.; Bowden, T. A.; Coles, C. H.; Harlos, K.; Aricescu, A. R.; Harvey, D. J.; Stuart, D. I.; Jones, E. Y., Carbohydrate and Domain Architecture of an Immature Antibody Glycoform Exhibiting Enhanced Effector Functions. *J. Mol. Biol.* 2009, 387, 1061- 1066.

- [00145] 11. Ferrara, C.; Grau, S.; Jager, C.; Sondermann, P.; Brunker, P.; Waldhauer, I.; Hennig, M.; Ruf, A.; Rufer, A. C.; Stihle, M.; Umana, P.; Benz, J., Unique carbohydrate- carbohydrate interactions are required for high affinity binding between FcγRIII and antibodies lacking core fucose. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2011, 108, 12669- 12674.
- [00146] 12. Yamaguchi, Y.; Nishimura, M.; Nagano, M.; Yagi, H.; Sasakawa, R.; Uchida, R.; Shitara, K.; Kato, K., Glycoform-dependent conformational alteration of the Fc region of human immunoglobulin G1 as revealed by NMR spectroscopy. *Biochem. Biophys. Acta* 2006, 1760, 693- 700.
- [00147] 13. Matsumiya, S.; Yamaguchi, Y.; Saito, J.; Nagano, M.; Sasakawa, H.; Otaki, S.; Satoh, M.; Shitara, K.; Kato, K., Structural Comparison of Fucosylated and Nonfucosylated Fc Fragments of Human Immunoglobulin G1. *J. Mol. Biol.* 2007, 368, 767- 779.
- [00148] 14. Barb, A. W.; Prestegard, NMR analysis demonstrates immunoglobulin G N- glycans are accessible and dynamic. *Nat. Chem. Biol.* 2011, 7, 147- 153.
- [00149] 15. Nimmeijahn, F.; Ravetch, J. V., Anti-inflammatory actions of intravenous immunoglobulin. *Annu. Rev. Immunol.* 2008, 26, 513-533.
- [00150] 16. Shields, R. L.; Lai, J.; Keck, R.; O'Connell, L. Y.; Hong, K.; Meng, Y. G.; Weikert, S. H.; Presta, L. G., Lack of fucose on human IgG1 N-linked oligosaccharide improves binding to human FcγRIIIA and antibody-dependent cellular toxicity. *J. Biol. Chem.* 2002, 277, 26733- 26740.
- [00151] 17. Shinkawa, T.; Nakamura, K.; Yamane, N.; Shoji-Hosaka, E.; Kanda, Y.; Sakurada, M.; Uchida, K.; Anazawa, H.; Satoh, M.; Yamasaki, M.; Hanai, N.; Shitara,

K., The Absence of Fucose but Not the Presence of Galactose or Bisecting N-Acetylglucosamine of Human IgG1 Complex-type Oligosaccharides Shows the Critical Role of Enhancing Antibody- dependent Cellular Cytotoxicity. J. Biol. Chem. 2003, 278, 3466- 3473.

[00152] 18. Niwa, R.; Shoji-Hosaka, E.; Sakurada, M.; Shinkawa, T.; Uchida, K.; Nakamura, K.; Matsushima, K.; Ueda, R.; Hanai, N.; Shitara, K., Defucosylated Chimeric Anti-CC Chemokine Receptor 4 IgG1 with Enhanced Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity Shows Potent Therapeutic Activity to T-Cell Leukemia and Lymphoma. Cancer Res. 2004, 64,2127-2133.

[00153] 19. Strome, S. E.; Sausville, E. A.; Mann, D., A mechanistic perspective of monoclonal antibodies in cancer therapy beyond target-related effects. Oncologist 2007, 12, 1084- 1095.

[00154] 20. Jefferis, R, Glycosylation of antibody therapeutics: optimisation for purpose. Methods Mol. Biol. 2009, 483, 223- 238.

[00155] 21. Kaneko, Y.; Nimmexjahn, F.; Ravetch, J. V., Anti-Inflammatory Activity of Immunoglobulin G Resulting from Fc Sialylation. Science 2006, 313, 670- 673.

[00156] 22. Anthony, R. M.; Nimmeijahn, F.; Ashline, D. J.; Reinhold, V. N.; Paulson, J. C.; Ravetch, J. V., Recapitulation of IVIG Anti-Inflammatory Activity with a Recombinant IgG Fc. Science 2008, 320, 373- 376.

[00157] 23. Anthony, R. M.; Wermeling, F.; Karlsson, M. C.; Ravetch, J. V., Identification of a receptor required for the anti-inflammatory activity of IVIG. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2008, 105, 19571- 19578.

- [00158] 24. Umana, P.; Jean-Mairet, J.; Moudry, R.; Amstutz, H.; Bailey, J. E., Engineered glycoforms of an antineuroblastoma IgG1 with optimized antibody-dependent cellular cytotoxic activity. *Nat. Biotechnol.* 1999, 17, 176- 180.
- [00159] 25. Yamane-Ohnuki, N.; Kinoshita, S.; Inoue-Urakubo, M.; Kusunoki, M.; Iida, S.; Nakaño, R.; Wakitani, M.; Niwa, R.; Sakurada, M.; Uchida, K.; Shitara, K.; Satoh, M., Establishment of FUT8 knockout Chinese hamster ovary cells: An ideal host cell line for producing completely defucosylated antibodies with enhanced antibody-dependent cellular cytotoxicity. *Biotechnol. Bioeng.* 2004, 87, 614-622.
- [00160] 26. Stanley, P.; Sundaram, S.; Tang, J.; Shi, S., Molecular analysis of three gain-of-function CHO mutants that add the bisecting GlcNAc to N-glycans. *Glycobiology* 2005, 15, 43-53.
- [00161] 27. Cox, K. M.; Sterling, J. D.; Regan, J. T.; Gasdaska, J. R.; Frantz, K. K.; Peele, C. G.; Black, A.; Passmore, D.; Moldovan-Loomis, C.; Srinivasan, M.; Cuison, S.; Cardarelli, P. M.; Dickey, L. F., Glycan optimization of a human monoclonal antibody in the aquatic plant *Lemna minor*. *Nat. Biotechnol.* 2006, 24, 1591- 1597.
- [00162] 28. Strasser, R.; Castilho, A.; Stadlmann, J.; Kunert, R.; Quendler, H.; Gattlinger, P.; Jez, J.; Rademacher, T.; Altmann, F.; Mach, L.; Steinkellner, H. J., Improved Virus Neutralization by Plant-produced Anti-HIV Antibodies with a Homogeneous B1,4- Galactosylated N-Glycan Profile. *Biol. Chem.* 2009, 284, 20479- 20485.
- [00163] 29. Li, H.; Sethuraman, N.; Stadheim, T. A.; Zha, D.; Prinz, B.; Bailew, N.; Bobrowicz, P.; Choi, B. K.;

Cook, W. J.; Cukan, M.; Houston-Cummings, N. R.; Davidson, B.; Gong, B.; Hamilton, S. R.; Hoopes, J. P.; Jiang, Y.; Kim, N.; Mansfield, R.; Nett, J. H.; Rios, S.; Strawbridge, R.; Wildt, S.; Gemgross, T. U., Optimization of humanized IgGs in glycoengineered *Pichia pastoris*. *Nat. Biotechnol.* 2006, 24, 210-215.

[00164] 30. Zhou, Q.; Shankara, S.; Roy, A.; Qiu, H.; Estes, S.; McVie-Wylie, A.; Culm-Merdek, K.; Park, A.; Pan, C.; Edmunds, T., Development of a simple and rapid method for producing non-fucosylated oligomannose containing antibodies with increased effector function. *Biotechnol. Bioeng.* 2008, 99, 652- 665.

[00165] 31. Schiestl, M.; Stangler, T.; Torella, C.; Cepeljnik, T.; Toll, H.; Grau, R., Acceptable changes in quality attributes of glycosylated biopharmaceuticals. *Nat. Biotechnol.* 2011,29,310-312.

[00166] 32. Wang, L. X.; Lomino, J. V., Emerging Technologies for Making Glycan- Defined Glycoproteins. *ACS Chem. Biol.* 2012, 7, 110- 122.

[00167] 33. Wang, L. X., The amazing transglycosylation activity of endo-P-N- acetylglucosaminidases. *Trends Glycosci. Glycotechnol.* 2011, 23, 33- 52.

[00168] 34. Wei, Y.; Li, C.; Huang, W.; Li, B.; Strome, S.; Wang, L. X., Glycoengineering of Human IgG1-Fc through Combined Yeast Expression and in Vitro Chemoenzymatic Glycosylation. *Biochemistry* 2008, 47, 10294- 10304.

[00169] 35. Zou, G.; Ochiai, H.; Huang, W.; Yang, Q.; Li, C.; Wang, L. X., Chemoenzymatic Synthesis and Fcγ Receptor Binding of Homogeneous Glycoforms of Antibody Fc Domain. Presence of a Bisecting Sugar Moiety Enhances the Affinity of Fc to Fcγ111a Receptor. *J. Am. Chem. Soc.* 2011, 133,

18975- 18991.

[00170] 36. Fan, S. Q.; Huang, W.; Wang, L. X., Remarkable Transglycosylation Activity of Glycosynthase Mutants of Endo-D, an Endo-p-N-acetylglucosaminidase from *Streptococcus pneumonia*. *J. Biol. Chem.* 2012, 287, 11272-11281.

[00171] 37. Umekawa, M.; Li, C.; Higashiyama, T.; Huang, W.; Ashida, H.; Yamamoto, K. ; Wang, L. X., Efficient glycosynthase mutant derived from *Mucor hiemalis* endo-P-N- acetylglucosaminidase capable of transferring oligosaccharide from both sugar oxazoline and natural N-glycan. *J. Biol. Chem.* 2010, 285, 511- 521.

[00172] 38. Huang, W.; Li, C.; Li, B.; Umekawa, M.; Yamamoto, K.; Zhang, X.; Wang, L. X., Glycosynthases Enable a Highly Efficient Chemoenzymatic Synthesis of N- Glycoproteins Carrying Intact Natural N-Glycans. *J. Am. Chem. Soc.* 2009, 131, 2214- 2223.

[00173] 39. Umekawa, M.; Huang, W.; Li, B.; Fujita, K.; Ashida, H.; Wang, L. X.; Yamamoto, K., Mutants of *Mucor hiemalis* Endo-P-N-acetylglucosaminidase Show Enhanced Transglycosylation and Glycosynthase-like Activities. *J. Biol. Chem.* 2008, 283, 4469- 4479.

[00174] 40. Collin, M.; Olsen, A., EndoS, a novel secreted protein from *Streptococcus pyogenes* with endoglycosidase activity on human IgG. *EMBO J.* 2001, 20, 3046- 3055.

[00175] 41. Allhom, M.; Olsen, A.; Collin, M., EndoS from *Streptococcus pyogenes* is hydrolyzed by the cysteine proteinase SpeB and requires glutamic acid 235 and tryptophans for IgG glycan-hydrolyzing activity. *BMC*

Microbiol. 2008, 8, 3.

[00176] 42. Goodfellow, J. J.; Baruah, K.; Yamamoto, K.; Bonomelli, C.; Krishna, B.; Harvey, D. J.; Crispin, M.; Scanlan, C. N.; Davis, B. G., An Endoglycosidase with Alternative Glycan Specificity Allows Broadened Glycoprotein Remodelling. J. Am. Chem. Soc. 2012, 134, 8030- 8033.

[00177] 43. Umekawa, M.; Higashiyama, T.; Koga, Y.; Tanaka, T.; Noguchi, M.; Kobayashi, A.; Shoda, S.; Huang, W.; Wang, L. X.; Ashida, H.; Yamamoto, K., Efficient transfer of sialo-oligosaccharide onto proteins by combined use of a glycosynthase-like mutant of *Mucor hiemalis* endoglycosidase and synthetic sialo-complex-type sugar oxazoline. Biochim. Biophys. Acta 2010, 1800, 1203- 1209.

[00178] 44. Huang, W.; Li, J.; Wang, L. X., Unusual Transglycosylation Activity of *Flavobacterium meningosepticum* Endoglycosidases Enables Convergent Chemoenzymatic Synthesis of Core Fucosylated Complex N-Glycopeptides. ChemBioChem 2011, 12, 932- 941.

[00179] 45. Waddling, C. A.; Plummer, T. H., Jr.; Tarentino, A. L.; Van Roey, P., Structural Basis for the Substrate Specificity of Endo-P-N-acetylglucosaminidase F3. Biochemistry 2000, 39, 7878- 7885.

[00180] 46. Huang, W.; Yang, Q.; Umekawa, M.; Yamamoto, K.; Wang, L. X., *Arthrobacter* Endo-P-N-Acetylglucosaminidase Shows Transglycosylation Activity on Complex-Type N-Glycan Oxazolines: One-Pot Conversion of Ribonuclease B to Sialylated Ribonuclease C. ChemBioChem 2010, 11, 1350- 1355.

[00181] 47. Wan, H. Z.; Kaneshiro, S.; Frenz, J.; Cacia, J., Rapid method for monitoring galactosylation levels

during recombinant antibody production by electrospray mass spectrometry with selective-ion monitoring. *J. Chromatogr., A* 2001, 913, 437- 446.

[00182] 48. Li, B.; Zeng, Y.; Hauser, S.; Song, H.; Wang, L. X., Highly Efficient Endoglycosidase-Catalyzed Synthesis of Glycopeptides Using Oligosaccharide Oxazolines as Donor Substrates. *J. Am. Chem. Soc.* 2005, 127, 9692- 9693.

[00183] 49. Ochiai, H.; Huang, W.; Wang, L. X., Expeditions Chemoenzymatic. *J. Am. Chem. Soc.* 2008, 130, 13790- 13803.

[00184] 50. Sletten, E. M.; Bertozzi, C. R., From Mechanism to Mouse: A Tale of Two Bioorthogonal Reactions. *Acc. Chem. Res.* 2011, 44, 666- 676.

[00185] 51. Best, M. D., Click Chemistry and Bioorthogonal Reactions: Unprecedented Selectivity in the Labeling of Biological Molecules. *Biochemistry* 2009, 48, 6571- 6584.

[00186] 52. Cartron, G.; Dacheux, L.; Salles, G.; Solal-Celigny, P.; Bardos, P.; Colombat, P.; Warier, H., Therapeutic activity of a humanized anti-CD20 monoclonal antibody and polymorphism in IgG Fc receptor FcγRIIIa gene. *Blood* 2002, 99, 754- 758.

[00187] 53. Sazinsky, S. L.; Ott, R. G.; Silver, N. W.; Tidor, B.; Ravetch, J. V.; Wittrup, K. D., Aglycosylated immunoglobulin G1 variants productively engage activating Fc receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2008, 105, 20167-20172.

[00188] 54. Anthony, R. M.; Kobayashi, T.; Wermeling, F.; Ravetch, J. V., Intravenous gammaglobulin suppresses inflammation through a novel TH2 pathway. *Nature* 2011, 475, 110-113.

- [00189] 55. Huhn, C.; Selman, M. H.; Ruhaak, L. R.; Deelder, A. M.; Wührer, M., IgG glycosylation analysis. *Proteomics* 2009, 9, 882- 913.
- [00190] 56. Barb, A. W.; Brady, E. K.; Prestegard, J. H., Branch-Specific Sialylation of IgG-Fc Glycans by ST6Gal-I. *Biochemistry* 2009, 48, 9705- 9707.
- [00191] 57. Guhr, T.; Bloem, J.; Derksen, N. I.; Wührer, M.; Koenderman, A. H.; Aalberse, R. C.; Rispen, T., Enrichment of sialylated IgG by lectin fractionation does not enhance the efficacy of immunoglobulin G in a murine model of immune thrombocytopenia. *PLoSOne* 2011, 6, e21246.
- [00192] 58. Raju, T. S.; Scallon, B., Glycosylation in the Fc domain of IgG increases resistance to proteolytic cleavage by papain. *J. Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2006, 341, 797- 803.
- [00193] 59. Guile, G. R.; Rudd, P. M.; Wing, D. R.; Prime, S. B.; Dwek, R. A., A rapid high-resolution high-performance liquid chromatographic method for separating glycan mixtures and analyzing oligosaccharide profiles. *Anal. Biochem.* 1996, 240, 210-226.
- [00194] 60. Johnson, P.; Glennie, M., The mechanisms of action of rituximab in the elimination of tumor cells. *Semin. Oncol.* 2003, 30, 3- 8.
- [00195] 61. Koene, H. R.; Kleijer, M.; Algra, J.; Roos, D.; von dem Borne, A. E.; de Haas, M., FcγRIIIa-158V/F polymorphism influences the binding of IgG by natural killer cell FcγRIIIa, independently of the FcγRIIIa-48L/R/H phenotype. *Blood* 1997, 90, 1109- 1114.
- [00196] 62. Hessel, A. J.; Hangartner, L.; Hunter, M.; Havenith, C. E.; Beurskens, F. J.; Bakker, J. M.; Lanigan,

C. M.; Landucci, G.; Forthal, D. N.; Parren, P. W.; Marx, P. A.; Burton, D. R., Fc receptor but not complement binding is important in antibody protection against HIV. Nature 2007, 449, 101- 104.

[00197] 63. Collin, M.; Olsen, A., Effect of SpeB and EndoS from *Streptococcus pyogenes* on human immunoglobulins. Infect. Immun. 2001, 69, 7187- 7189.

REIVINDICAÇÕES

1. Método de preparação de um anticorpo de núcleo fucosilado ou não fucosilado ou um fragmento Fc do mesmo tendo uma porção oligossacarídeo predeterminada, **caracterizado pelo** fato de que o método compreende:

proporcionar um anticorpo IgG ou um fragmento IgG-Fc, que compreende um acceptor de GlcNAc de núcleo fucosilado ou não fucosilado; e

enzimaticamente reagir o acceptor de GlcNAc de núcleo fucosilado ou não fucosilado com um doador de oligossacarídeo ativado utilizando um mutante de *Streptococcus pyogenes* Endoglicosidase-S Asp233, em que o doador de oligossacarídeo ativado é uma oxazolina oligossacarídeo sintética ou oxazolina sialilada, em que o mutante Endoglicosidase-S é selecionado a partir de um mutante que compreende uma mutação dirigida ao local D233Q (SEQ ID NO: 2) ou D233A (SEQ ID NO: 3), em que o doador de oligossacarídeo ativado porta uma porção oligossacarídeo ativado que compreende um número e tipo predeterminados de resíduos de açúcar, no qual através de uma reação enzimática, a porção de oligossacarídeo ativado é ligada de forma covalente ao acceptor de GlcNAc de núcleo fucosilado ou não fucosilado, preparando-se assim o anticorpo fucosilado ou não fucosilado ou fragmento Fc com a porção de oligossacarídeo predeterminada.

2. Método de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pelo** fato de que a oxazolina oligossacarídeo sintética é um di-, tri-, tetra-, penta-, hexil-, hepta-, octil-, nona-, -deca ou undecassacarídeo oxazolina.

3. Método de acordo com a reivindicação 1 ou 2,

caracterizado pelo fato de que o núcleo fucosilado GlcNAc-acceptor é uma alfa-1-6-fucosil-GlcNAc contendo anticorpo ou fragmento Fc.

4. Método de acordo com qualquer das reivindicações anteriores, **caracterizado pelo** fato de que o anticorpo de núcleo fucosilado ou não fucosilado é um anticorpo monoclonal selecionado a partir do grupo que consiste em ibalizumab, cetuximab, rituximab, muromonab-CD3, abciximab, daclizumab, basiliximab, palivizumab, infliximab, trastuzumab, gemtuzumab, ozogamicin, alemtuzumab, ibritumomab tiuxetan, adalimumab, omalizumab, tositumomab, I-131 tositumomab, efalizumab, bevacizumab, panitumumab, pertuzumab, natalizumab, etanercept, volociximab, um anti-CD80 mAb, um anti-CD23 mAb, alacizumab, pegol, eraptuzumab, ipilimumab, iratumumab, matuzumab, tremilimumab, zanolimumab, adecatumumab, oregovomab, nimotuzumab, briakinumab, denosumab, fontolizumab, daclizumab, golimumab, ustekinumab, ocrelizumab, ofatumumab, belimumab, epratuzumab, plozalizumab, visilizumab, tocilizumab, ocrerlizumab, certolizumab pegol, eculizumab, pexelizumab, abciximab, ranibizimumab, mepolizumab e stamulumab.

5. Método de acordo com a reivindicação 1, em que o doador ativado de oligossacarídeo é uma oxazolina de oligossacarídeo sintética, **caracterizado** pelo fato de que adicionalmente compreende:

(a) proporcionar um anticorpo IgG com núcleo fucosilado ou não fucosilado ou um fragmento IgG-Fc, que compreende N-glicanos heterogêneos ou indesejáveis; e

(b) remover os N-glicanos heterogêneos ou indesejados por uma enzima selecionada a partir de Endo S ou Endo-A para formar o anticorpo IgG ou fragmento IgG-Fc

compreendendo o acceptor de GlcNAc com núcleo fucosilados ou não fucosilado.

6. Método de acordo com a reivindicação 5, **caracterizado** pelo fato de que a enzima usada para remover os N-glicanos heterogêneos ou indesejados é Endo S.

7. Composição **caracterizada pelo** fato de que compreende pelo menos um mutante *Streptococcus pyogenes* Endo-S Asp-233 selecionado a partir do grupo que consiste em D233Q (SEQ ED NO: 2) e D233A (SEQ ID No: 3).

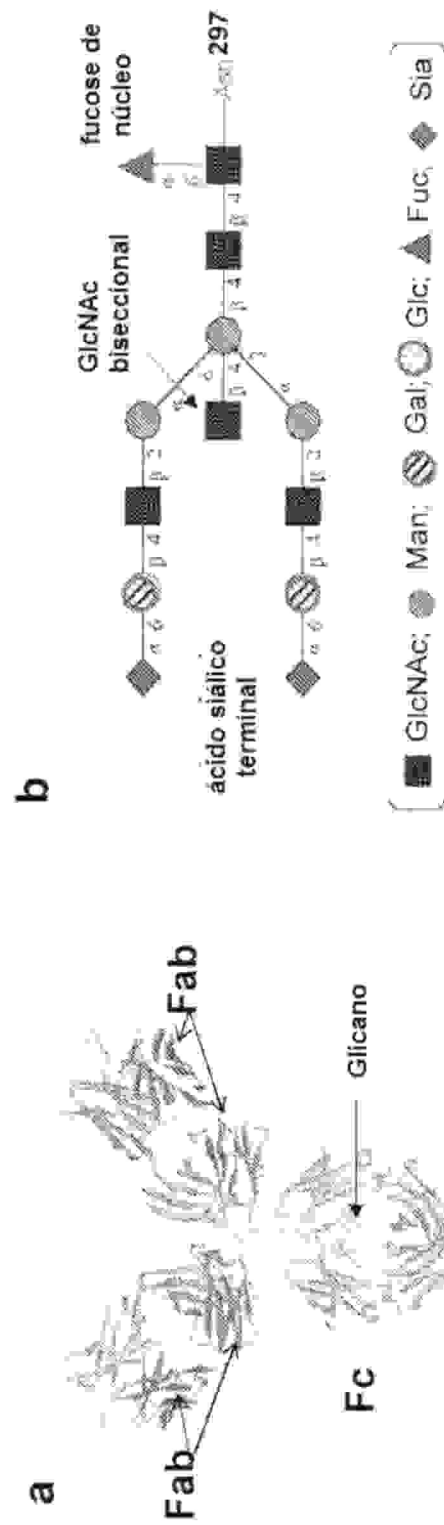


Figura 1

EndoS 181 RTIPWRFLAGGDNNGIAEDTSKYFNTFEGNKALAKAI VDEYVVKYNLDGLDVDEHDSIP 240
EndoF3 84 QNIDDDVSWQSSKPGGFASAAAYG-----DAIKSIVIDKKKLDGISLDIENS-- 169

Figura 2

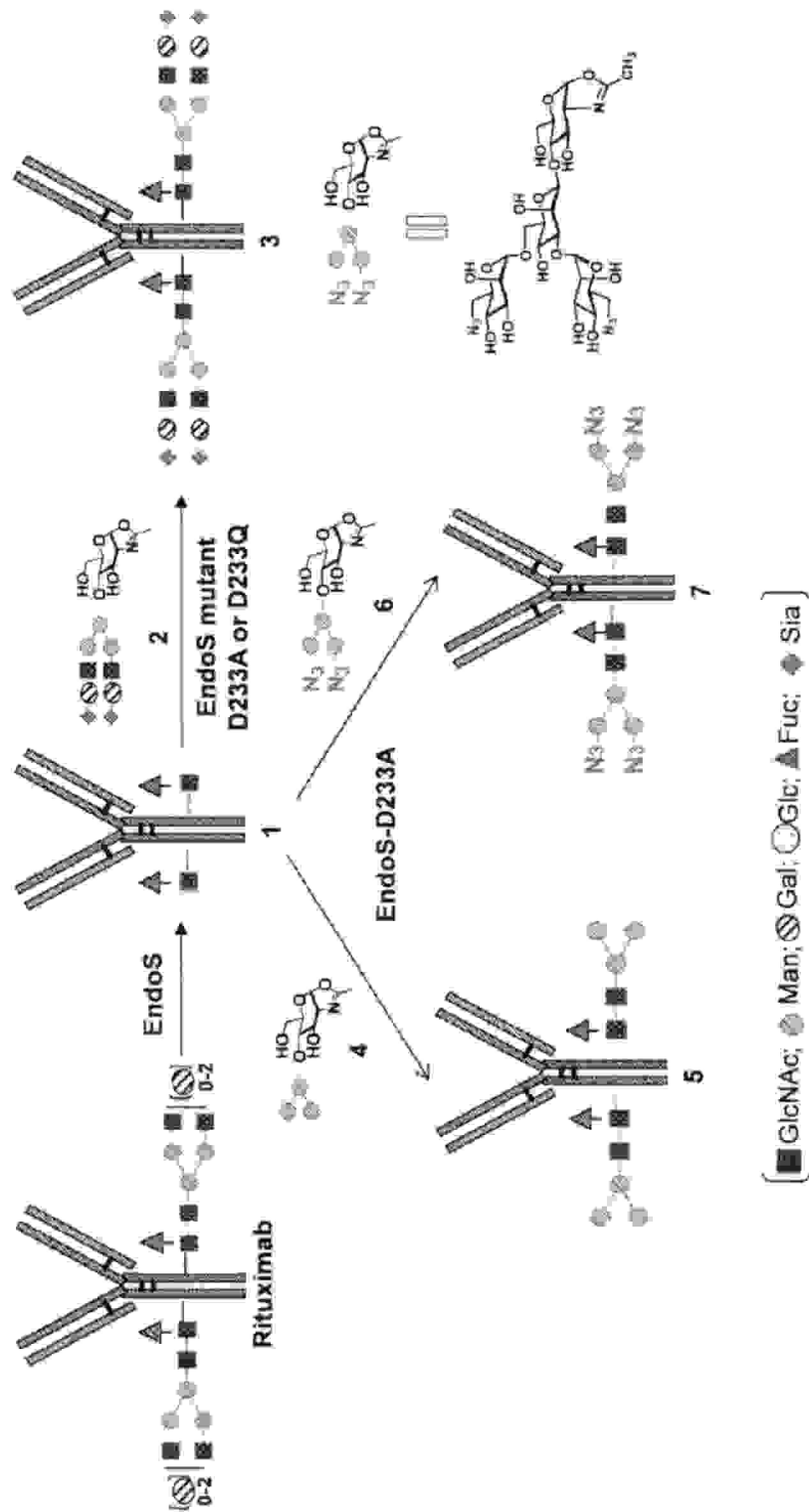


Figura 3A

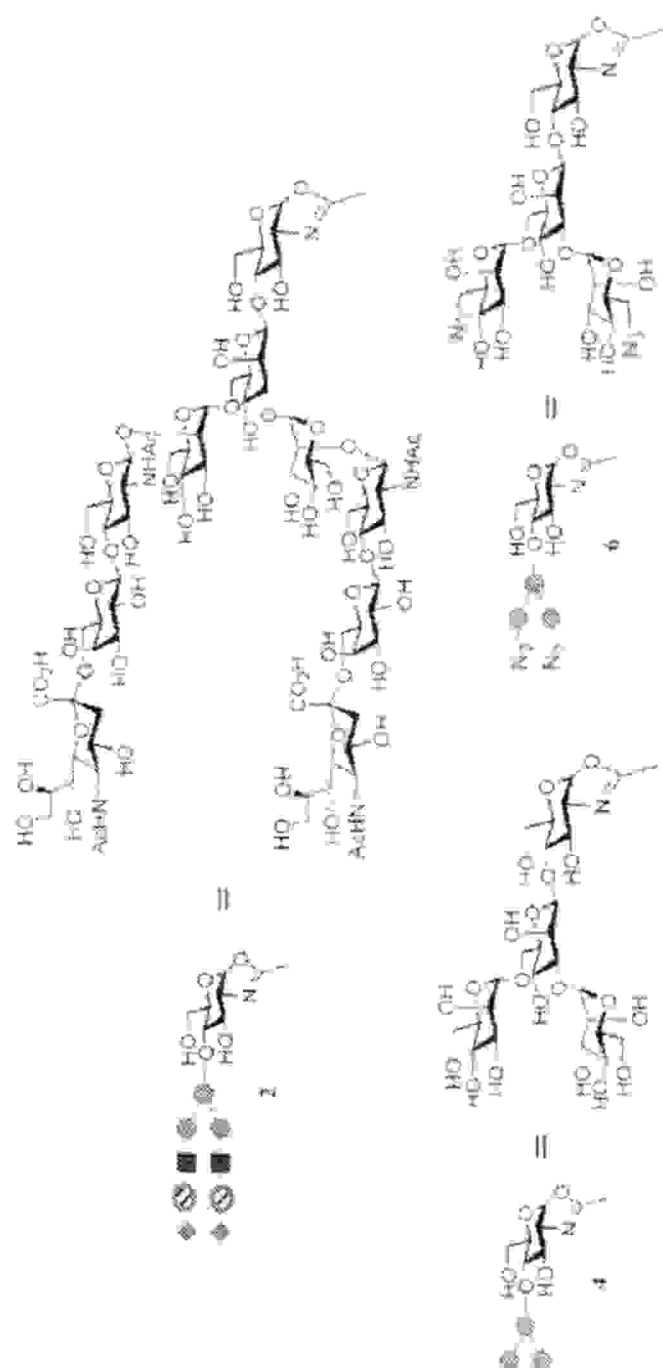


Figura 3B

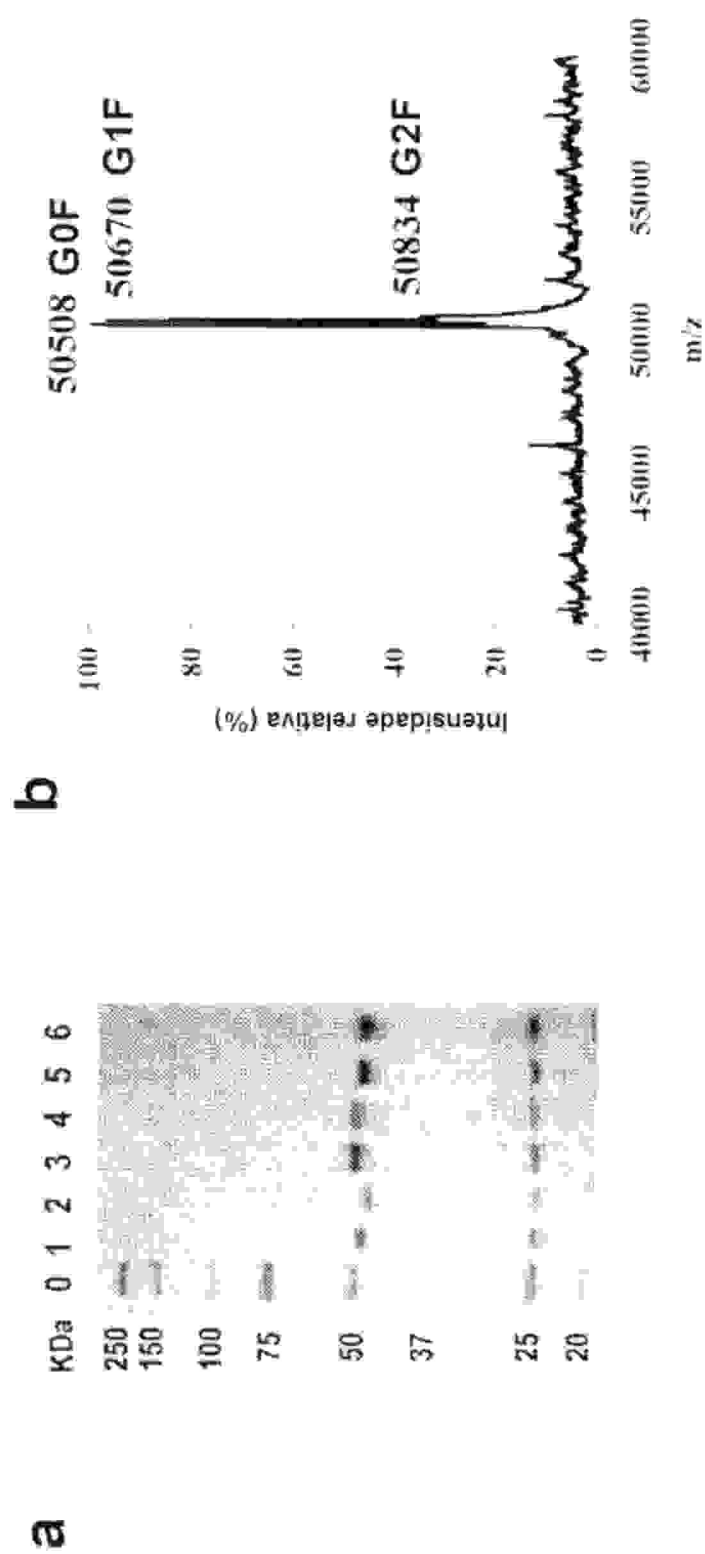


Figura 4A

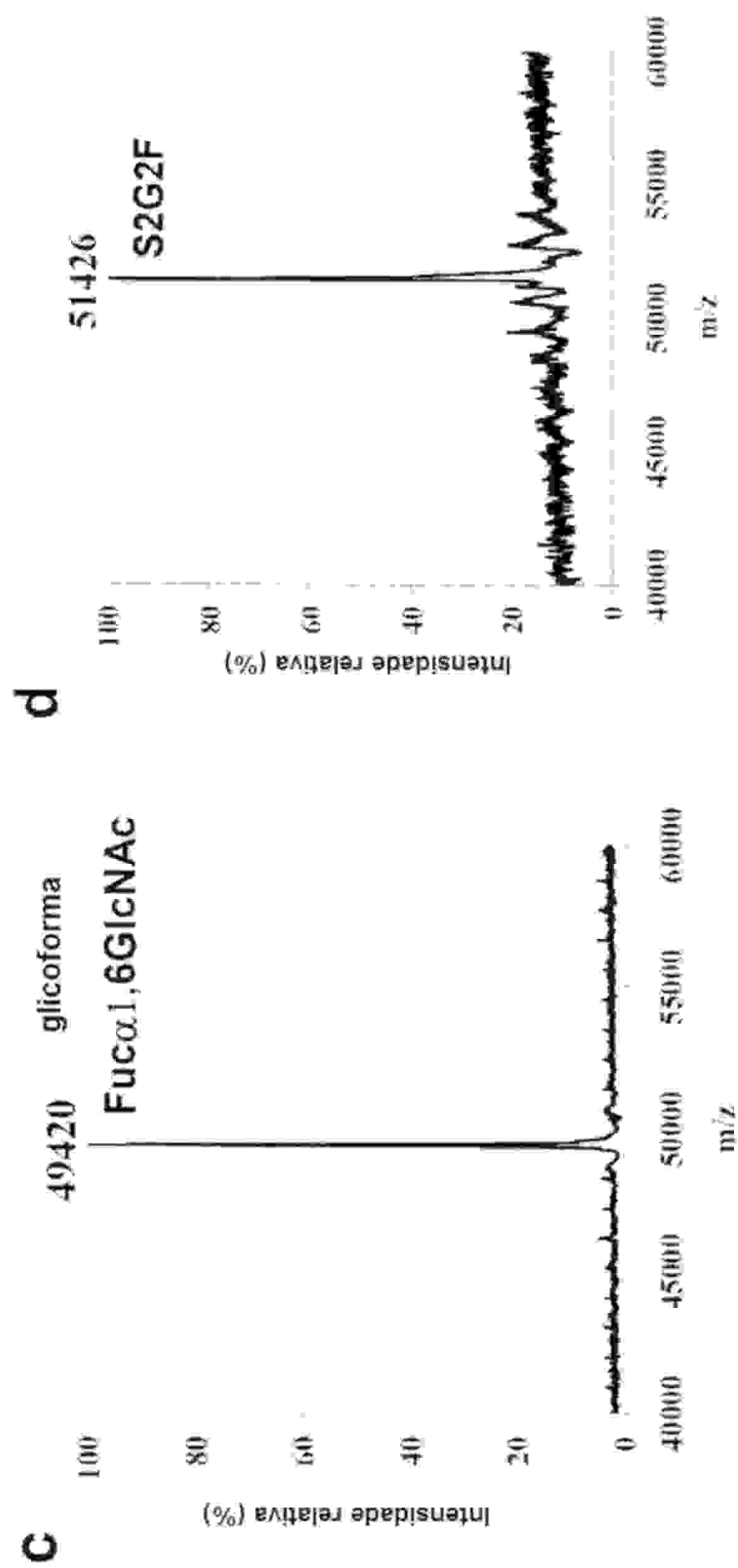


Figura 4B

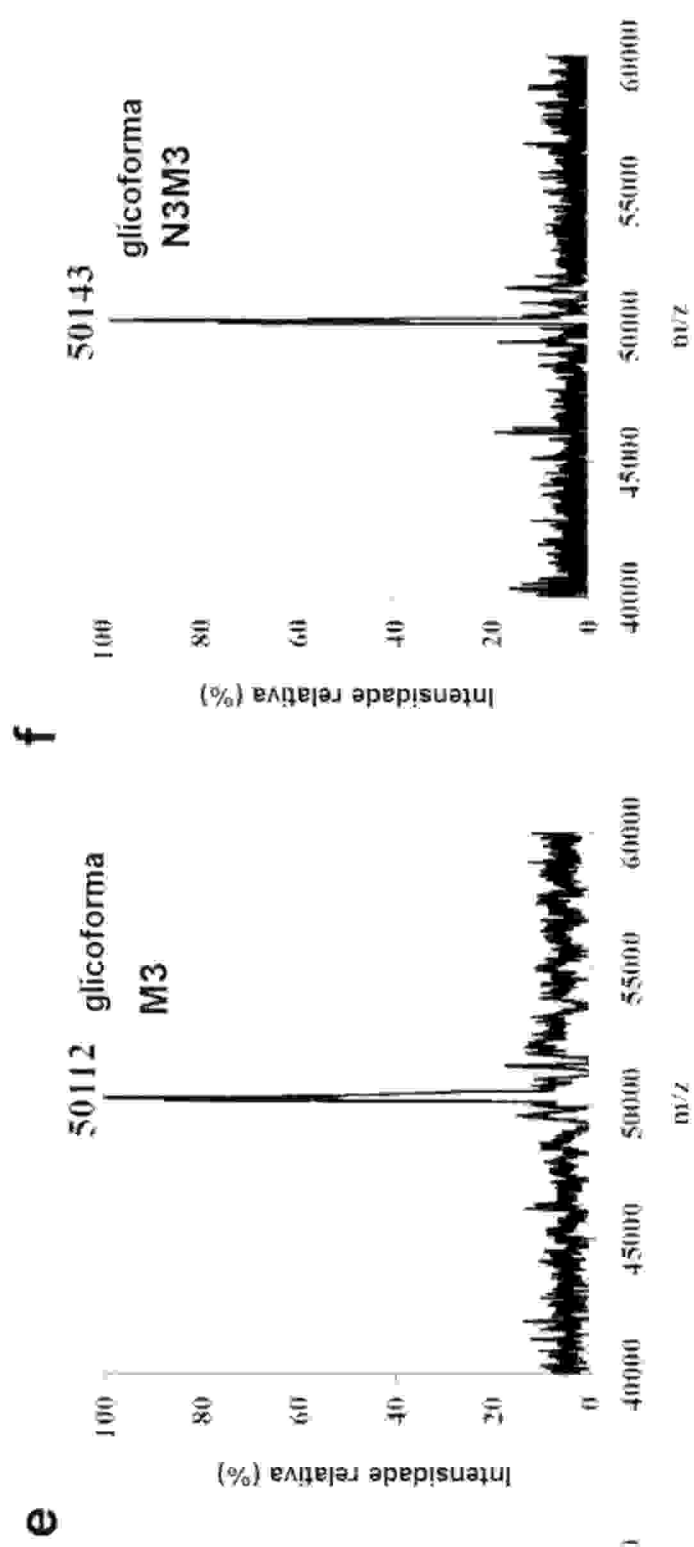


Figura 4C

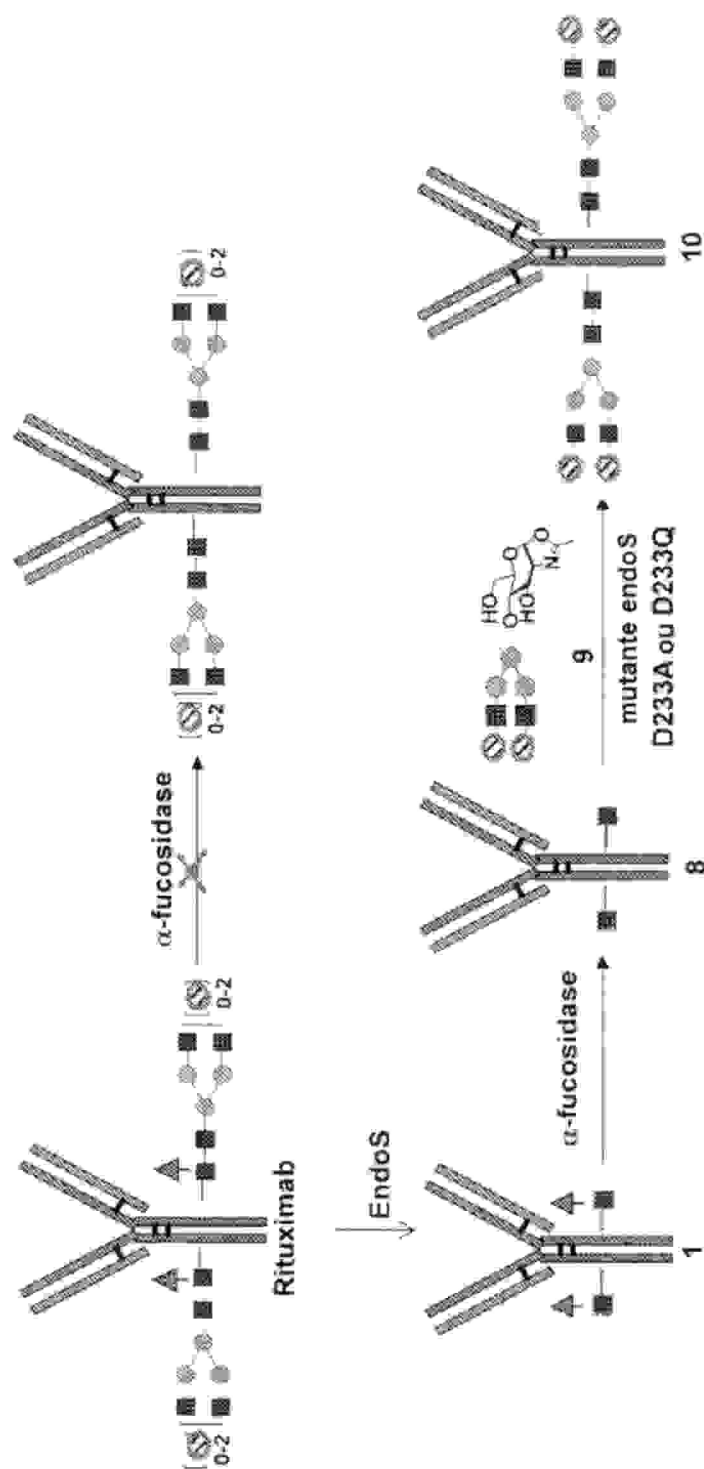
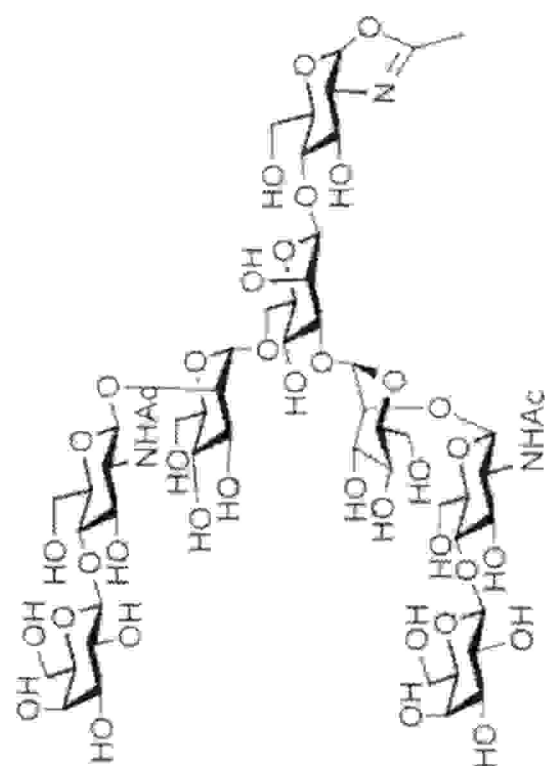
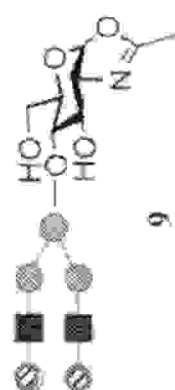


Figura 5 A



II



9

Figure 5B

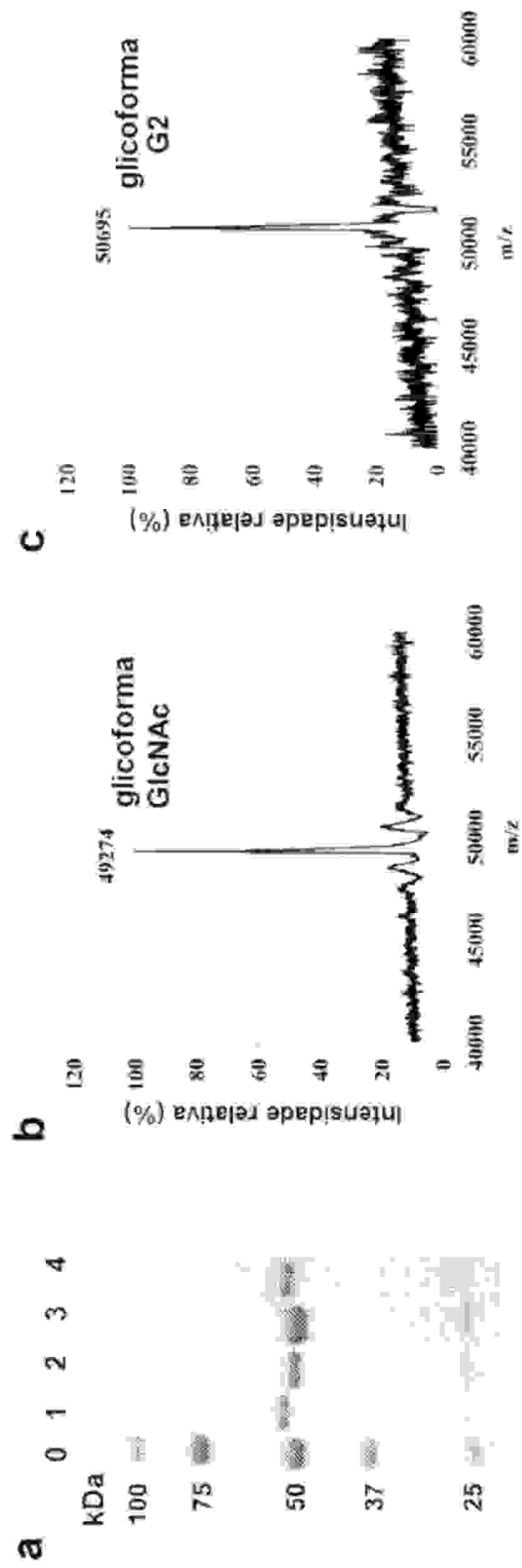


Figura 6

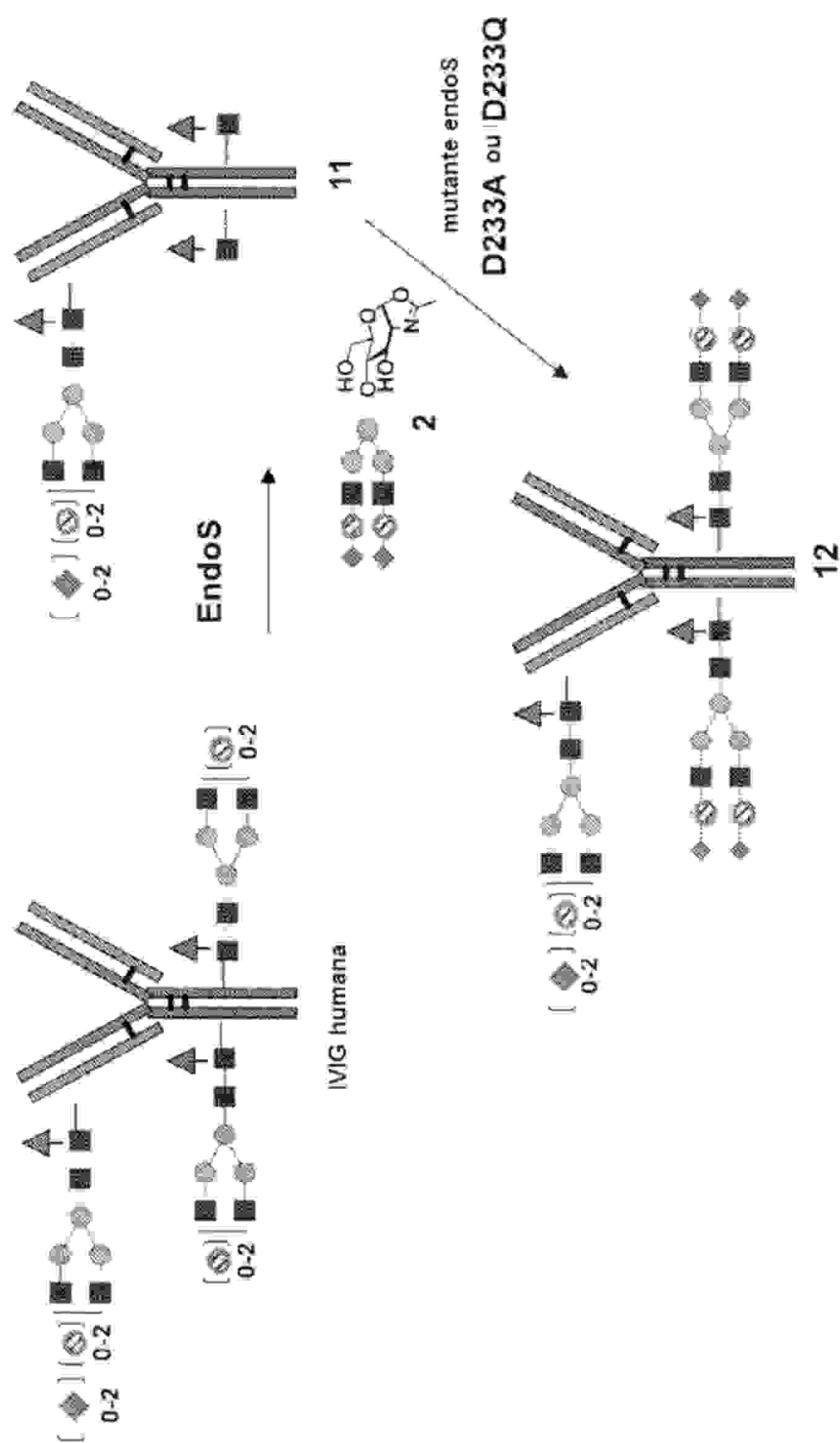


Figura 7

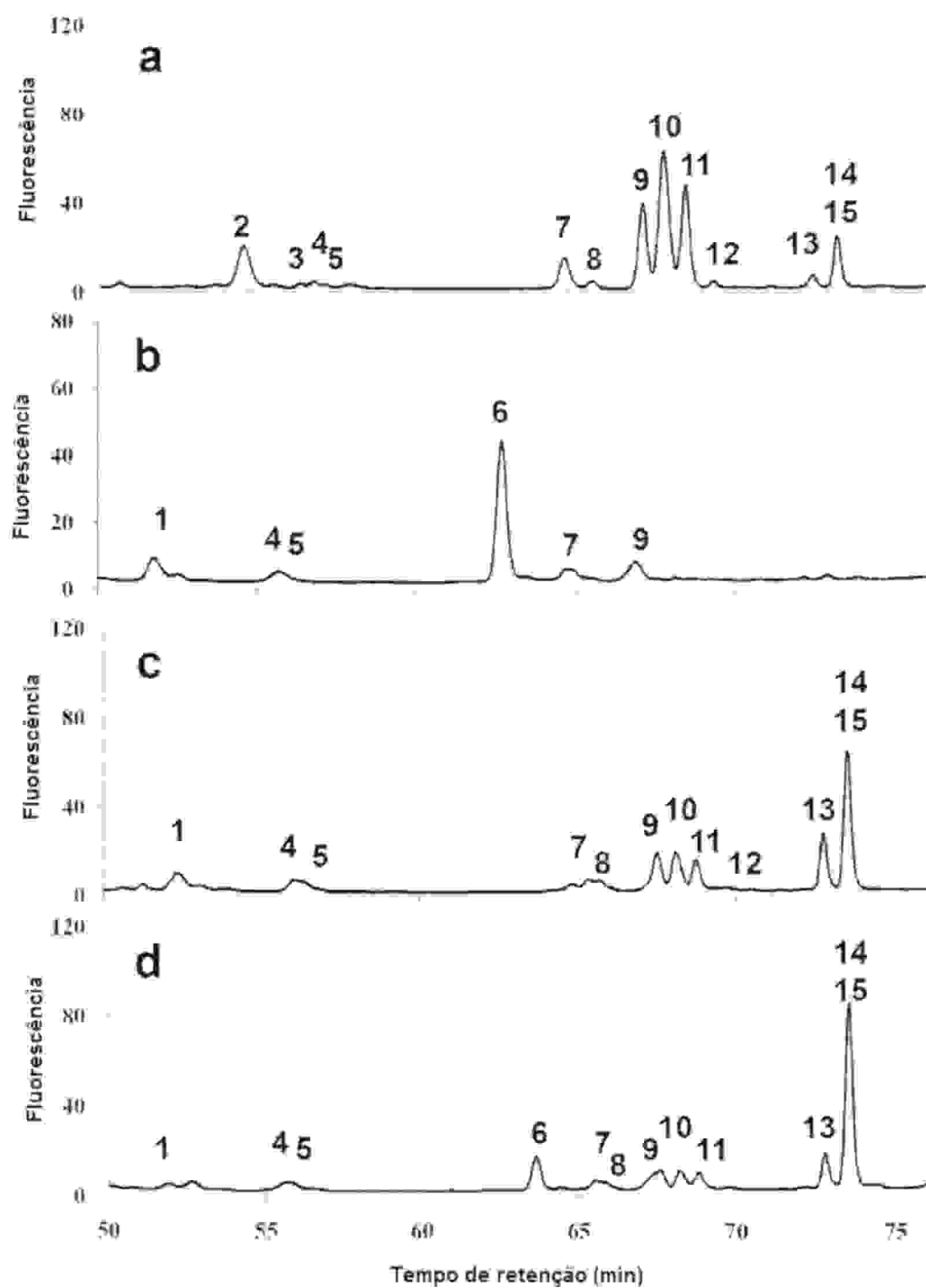


Figura 8

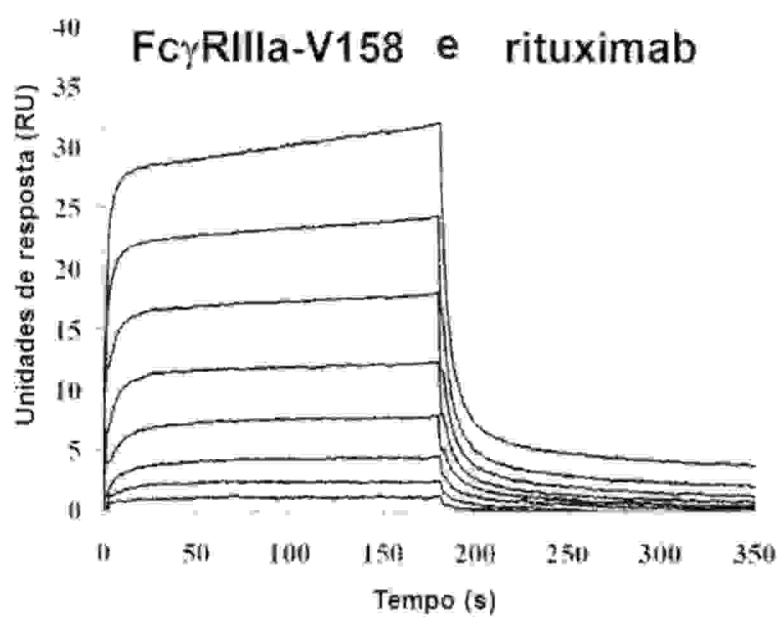
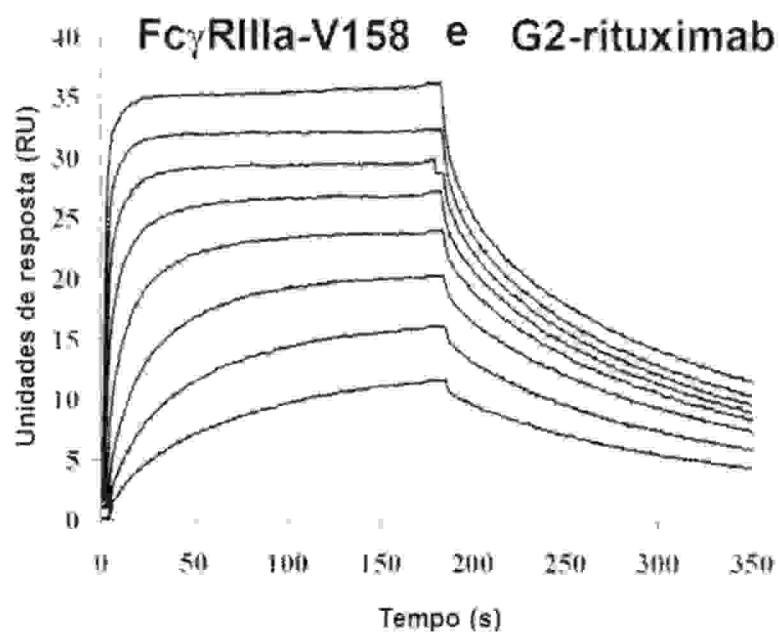


Figura 9A

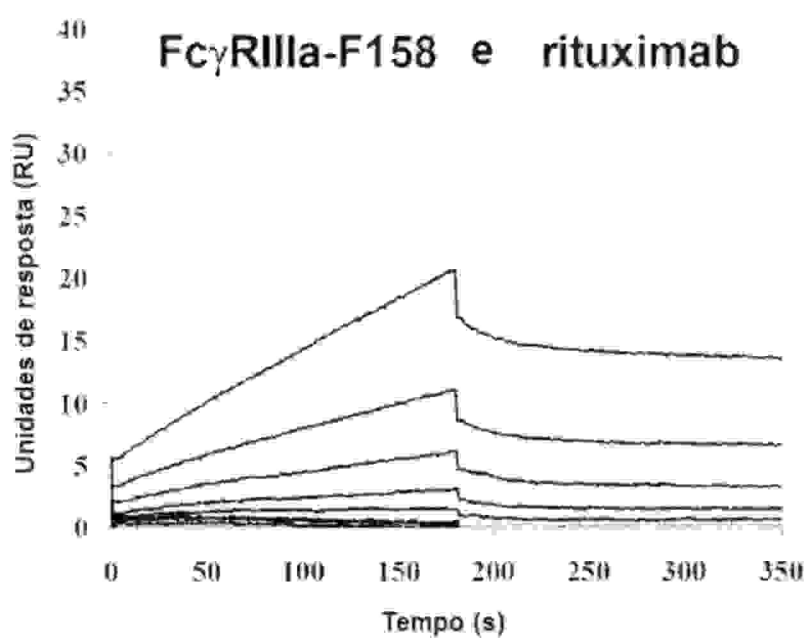
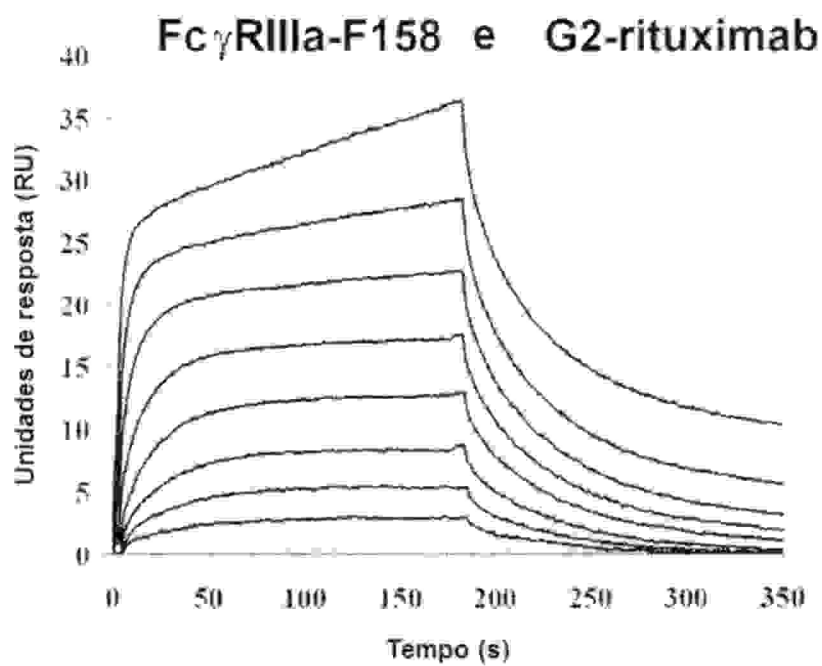


Figura 9B

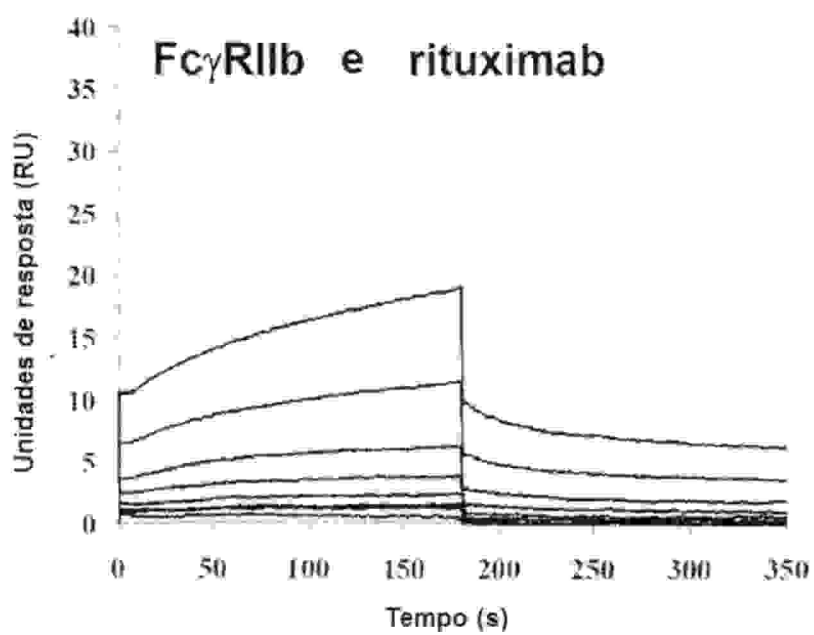
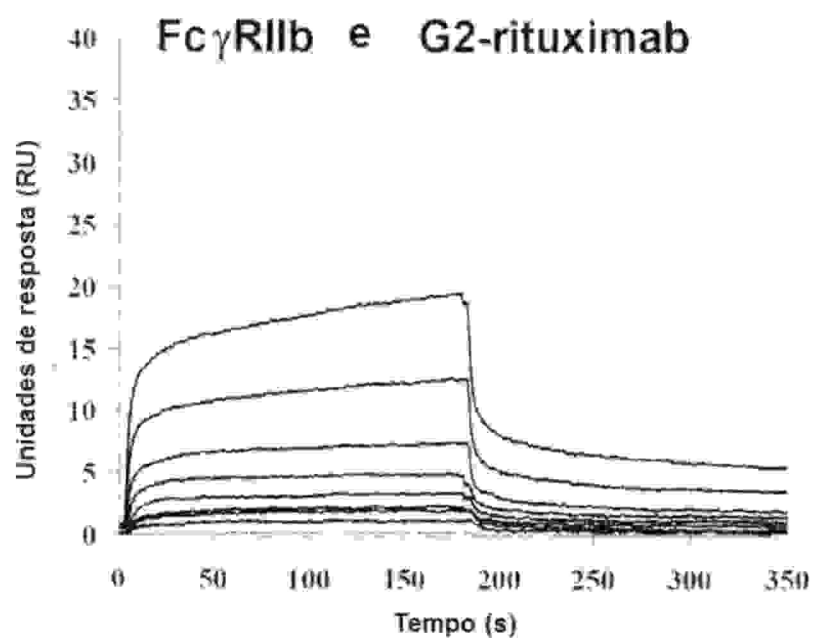


Figura 9C

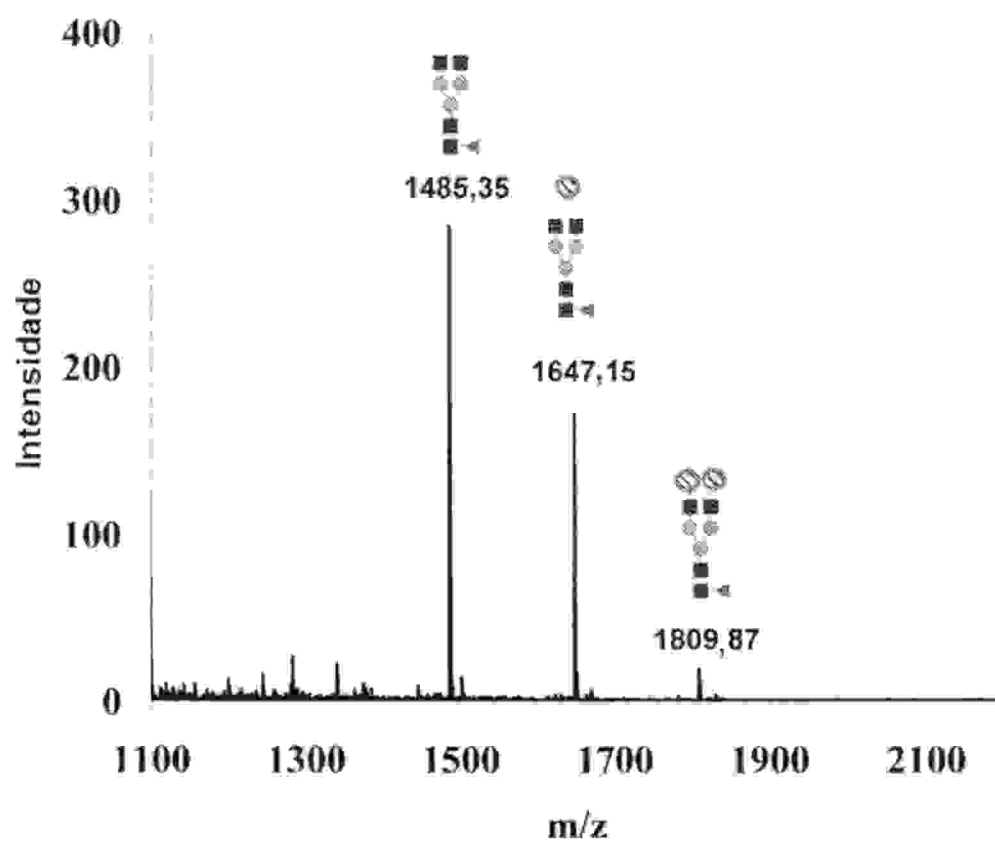


Figura 10

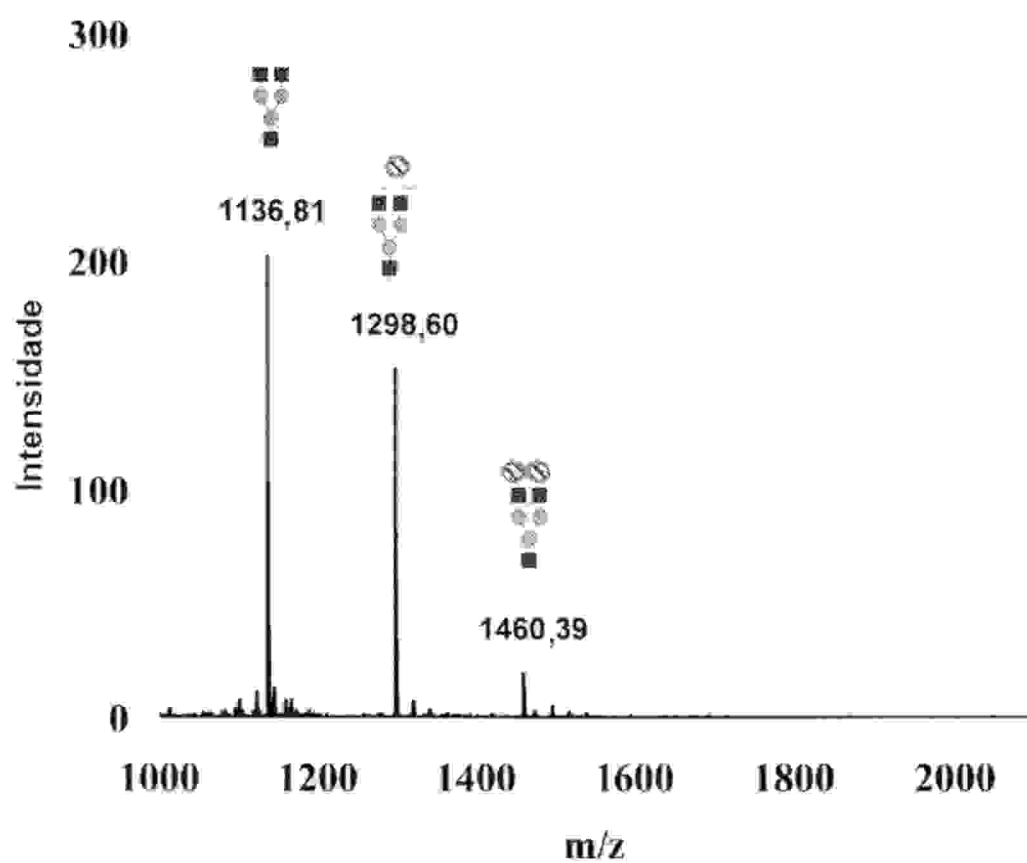


Figura 11

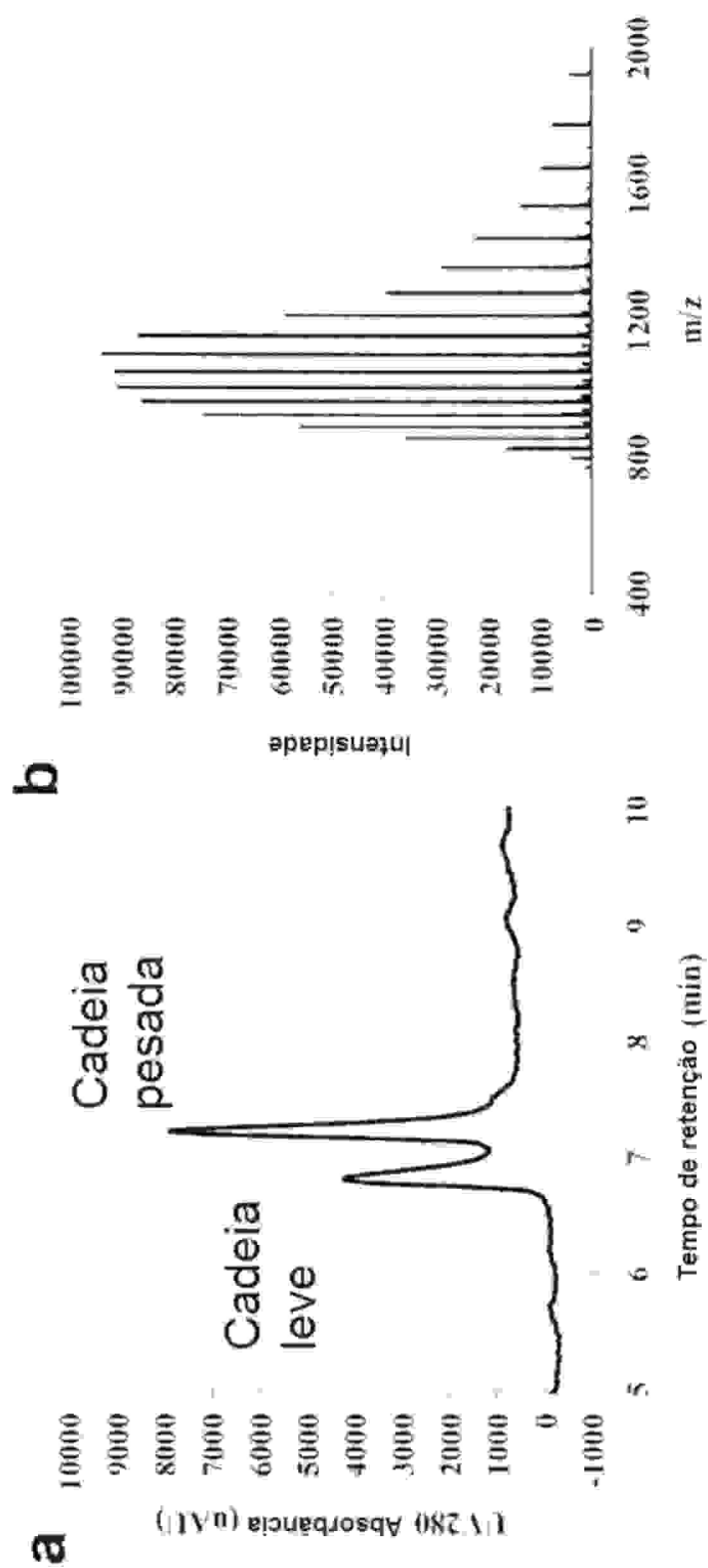


Figura 12 A

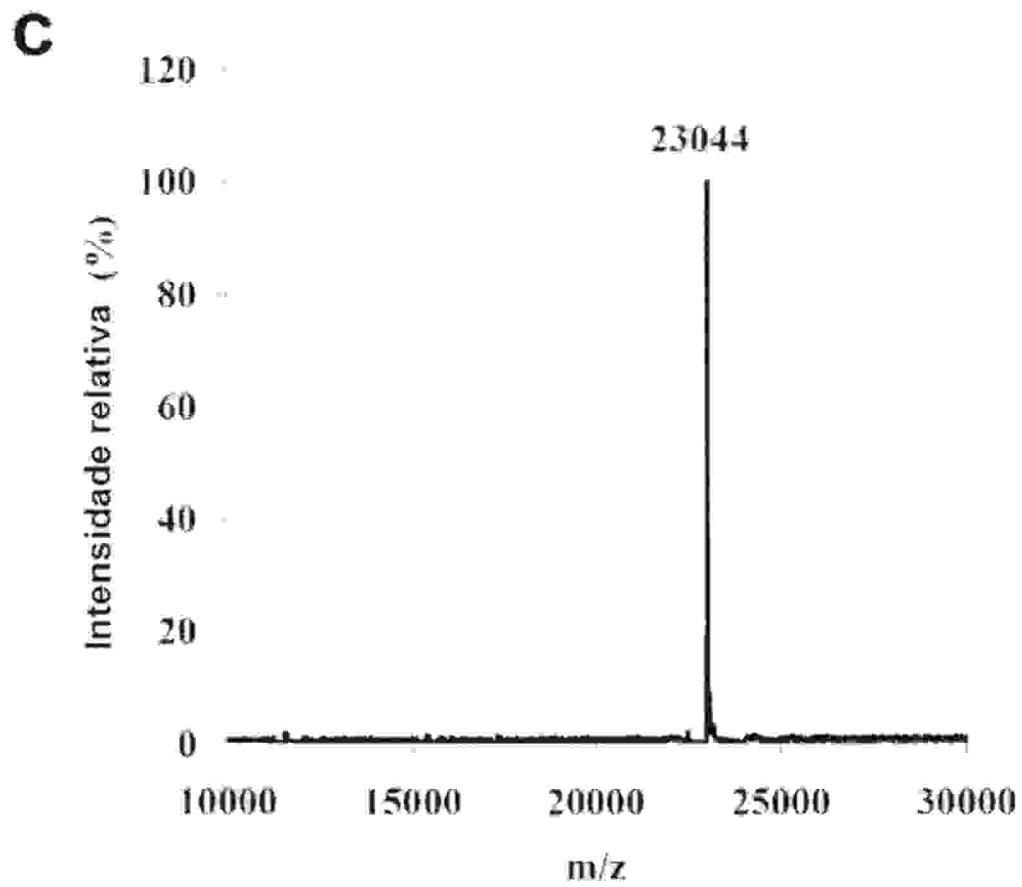


Figura 12 B

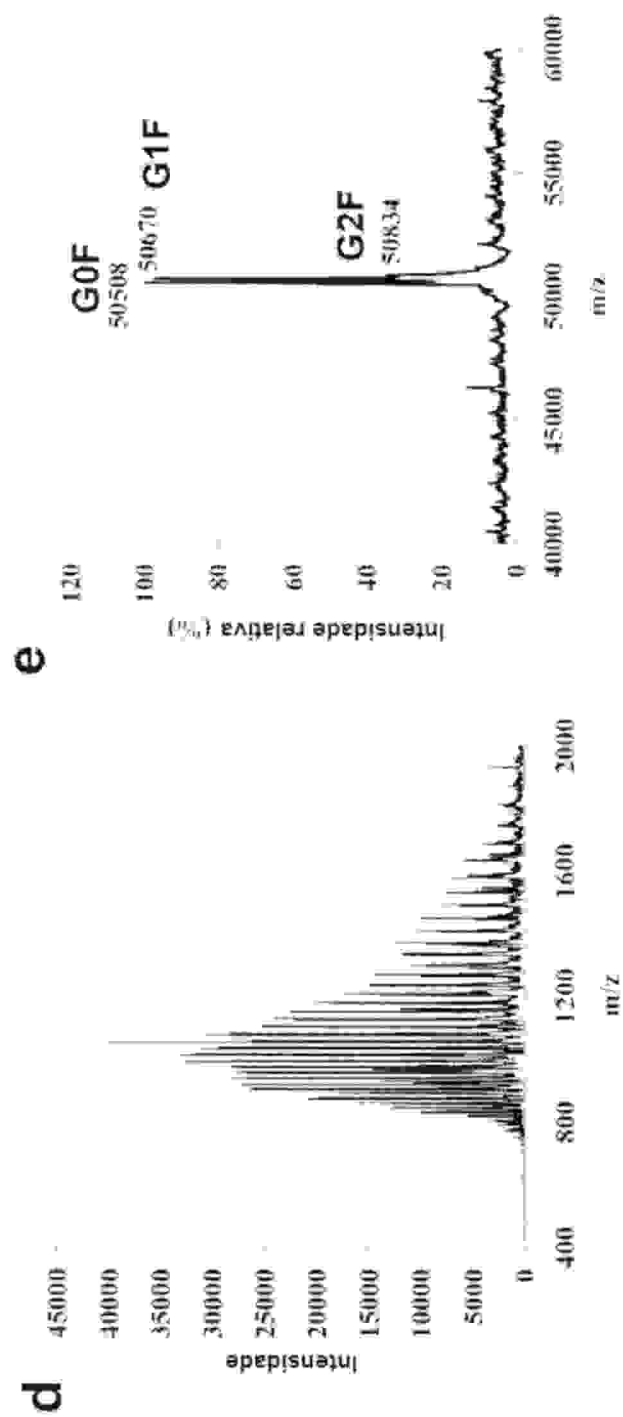


Figura 12 C

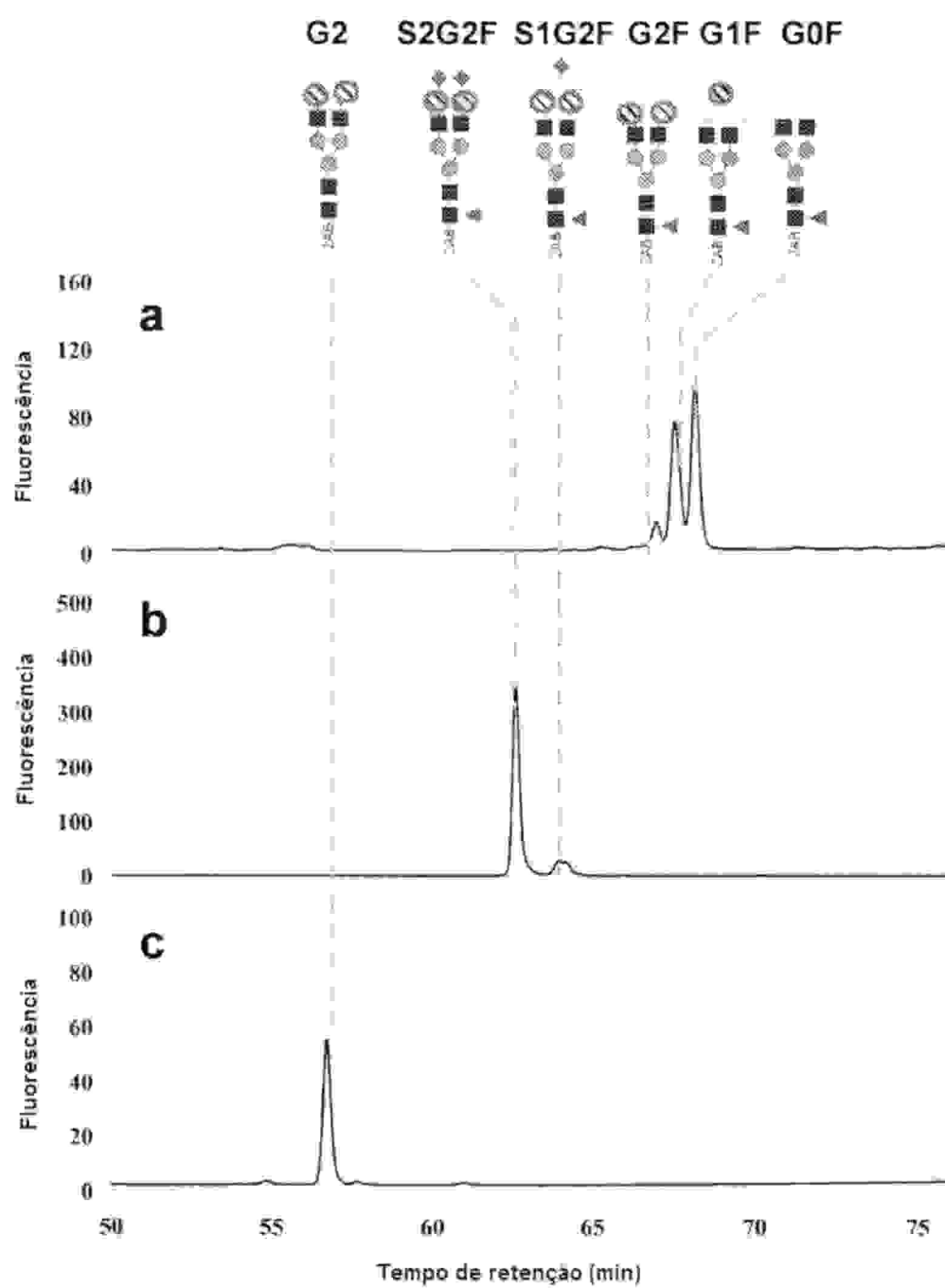


Figura 13

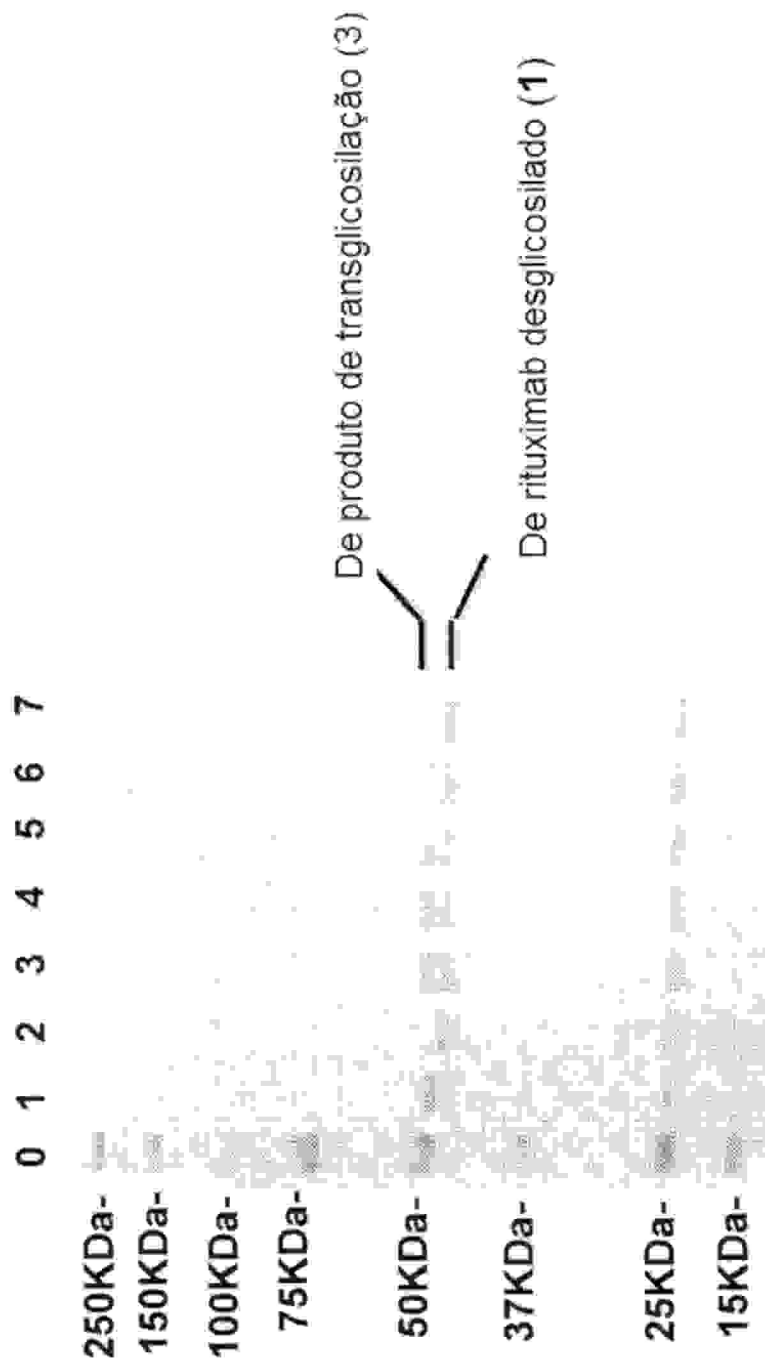


Figura 14

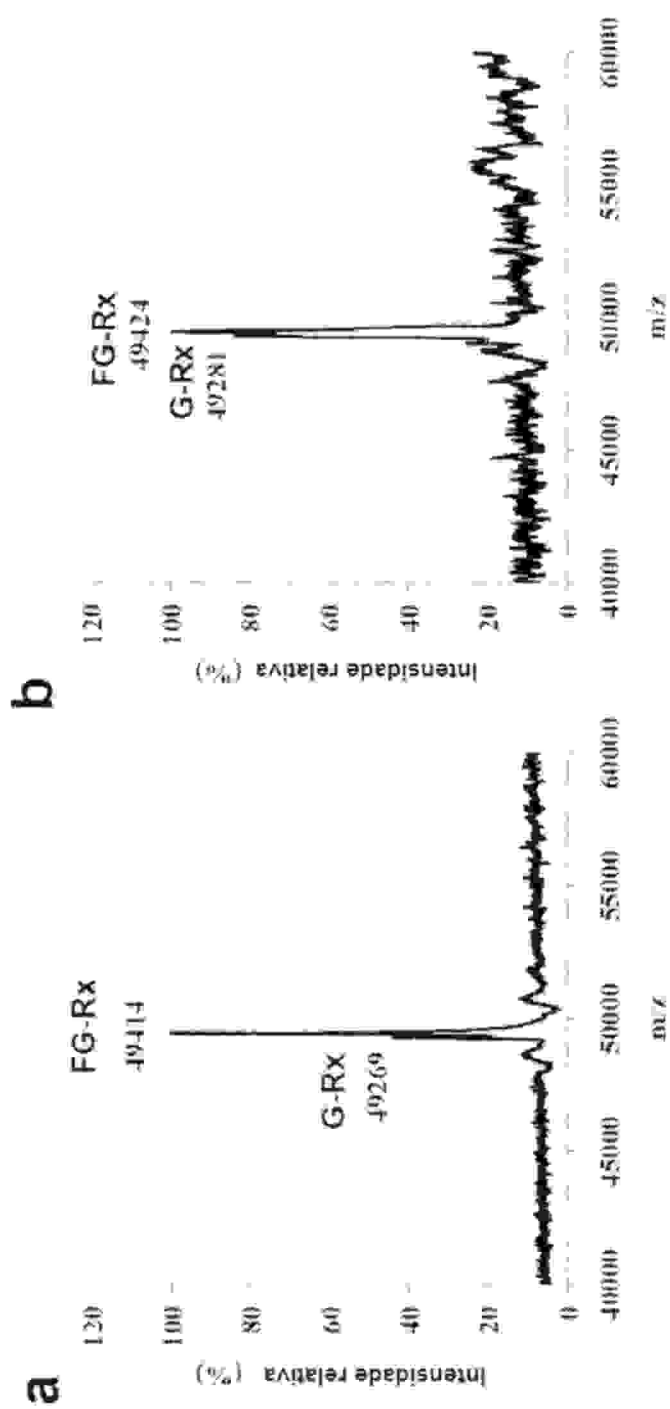


Figura 15 A

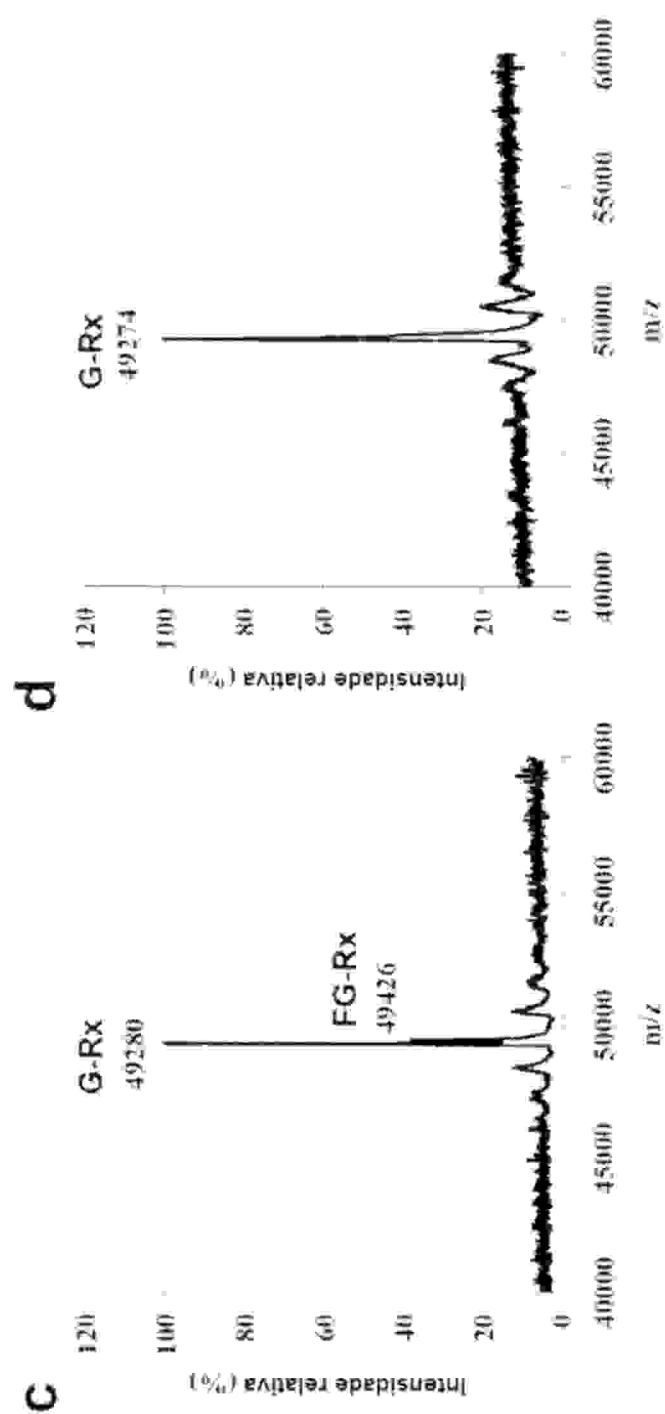


Figura 15 B

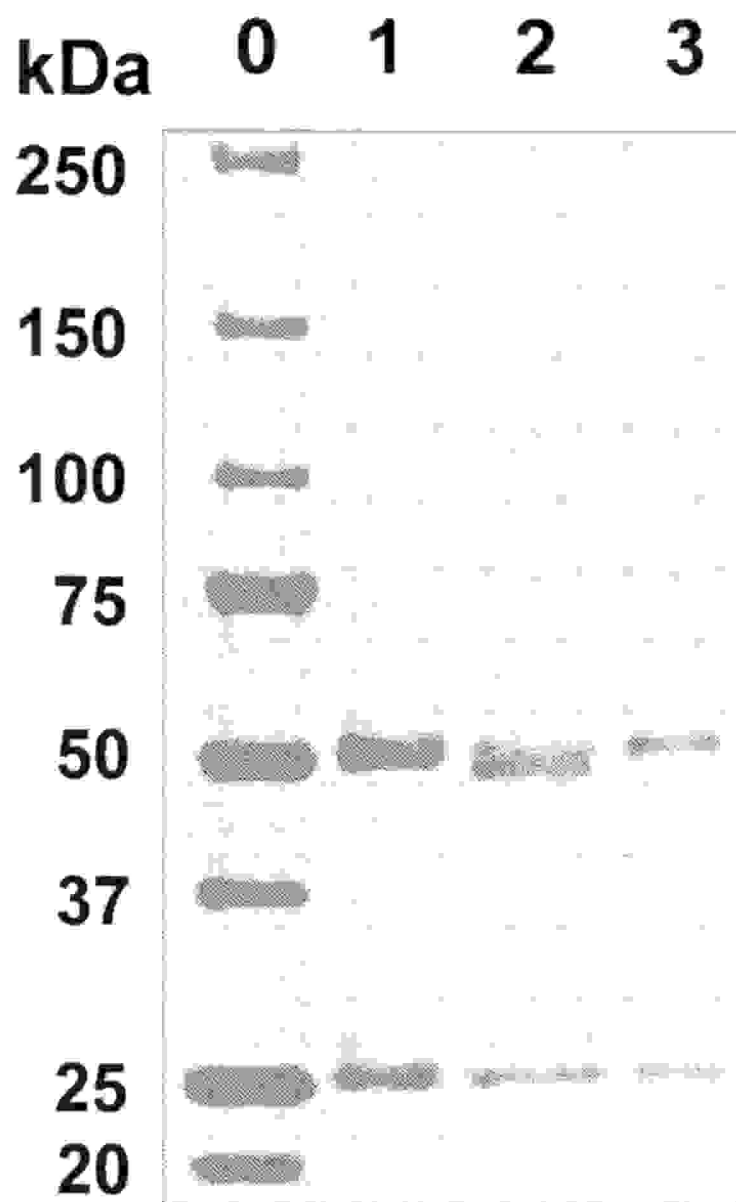


Figura 16

A

MDKHLVLRKRT LGCVCAATLM GAALATHHDS LNTVKAEEKT VQVQKGLPSI DSLHYLSENS
 KKEFKEELSK AGQESQKVKE ILAKAQQADK QAQELAKMKI PEKIPMKPLH GPLYGGYFRT
 WHDKTSDPTE KDKVNSMGEL PKEVDLAFIF HDWTKDYSLF WKELATKHVP KLNKQGTRVI
 RTIPWRFLAG GDNSGIAEDT SKYPNTPEGN KALAKAIVDE YVYKYNLDGL DVQVEHDSIP
 KVDKKEDTAG VERSIQVFEE IGKLGPKGV DKSRLFIMDS TYMADKNPLI ERGAPYINLL
 LVQVYGSQGE KGGWEPVSNR PEKTMEERWQ GYSKYIRPEQ YMIGFSFYEE NAQEGNLWYD
 INSRKDEDKA NGINTDITGT RAERYARWQP KTGGVKGKGF SYAIDRDGVA HQPKKYAKQK
 EFKDATDNIF HSDYSVSKAL KTVMLKDKSY DLIDEKDFPD KALREAVMAQ VGTRKGDLER
 FNGTLRLDNP AIQSLEGLNK FKKLAQLDLI GLSRITKLDL SVLPANMKPG KDTLETVLET
 YKKDNKEEPA TIPPVSLKVS GLTGLKELDL SGFDRETLAG LDAATLTSLE KVDISGNKLD
 LAPGTENRQI FDTMLSTISN HVGSNEQTVK FDKQKPTGHI PDIYKTSR LPVANEKVDL
 QSQLLFGTVT NQGTLINEA DYKAYQNHKI AGRSFVDSNY HYNFKVSYE NYTVKVTDS
 LGTTTDTKLA TDKEETYKVD FFSPADKTKA VHTAKVIVGD EKTMMVNLAE GATVIGGSAD
 PVNARKVFDG QLGSETDNIS LGWDSKQSII FKLKEDGLIK HWRFND SAR NPETTNKPIQ
 EASLQIFNIK DYNLDNLEN PNKFDDEKYW ITVDITYSAQG ERATAFSNTL NNITSKYWRV
 VFDTKGDRYS SPVPELQIL GYPLPNADTI MKTVTTAKEL SQQKDKFSQK MLDELKIKEM
 ALETSLNSKI FDTVAINANA GVLKDCIEKR QLLKK

B

MDKHLVLRKRT LGCVCAATLM GAALATHHDS LNTVKAEEKT VQVQKGLPSI DSLHYLSENS
 KKEFKEELSK AGQESQKVKE ILAKAQQADK QAQELAKMKI PEKIPMKPLH GPLYGGYFRT
 WHDKTSDPTE KDKVNSMGEL PKEVDLAFIF HDWTKDYSLF WKELATKHVP KLNKQGTRVI
 RTIPWRFLAG GDNSGIAEDT SKYPNTPEGN KALAKAIVDE YVYKYNLDGL DVAVEHDSIP
 KVDKKEDTAG VERSIQVFEE IGKLGPKGV DKSRLFIMDS TYMADKNPLI ERGAPYINLL
 LVQVYGSQGE KGGWEPVSNR PEKTMEERWQ GYSKYIRPEQ YMIGFSFYEE NAQEGNLWYD
 INSRKDEDKA NGINTDITGT RAERYARWQP KTGGVKGKGF SYAIDRDGVA HQPKKYAKQK
 EFKDATDNIF HSDYSVSKAL KTVMLKDKSY DLIDEKDFPD KALREAVMAQ VGTRKGDLER
 FNGTLRLDNP AIQSLEGLNK FKKLAQLDLI GLSRITKLDL SVLPANMKPG KDTLETVLET
 YKKDNKEEPA TIPPVSLKVS GLTGLKELDL SGFDRETLAG LDAATLTSLE KVDISGNKLD
 LAPGTENRQI FDTMLSTISN HVGSNEQTVK FDKQKPTGHI PDIYKTSR LPVANEKVDL
 QSQLLFGTVT NQGTLINEA DYKAYQNHKI AGRSFVDSNY HYNFKVSYE NYTVKVTDS
 LGTTTDTKLA TDKEETYKVD FFSPADKTKA VHTAKVIVGD EKTMMVNLAE GATVIGGSAD
 PVNARKVFDG QLGSETDNIS LGWDSKQSII FKLKEDGLIK HWRFND SAR NPETTNKPIQ
 EASLQIFNIK DYNLDNLEN PNKFDDEKYW ITVDITYSAQG ERATAFSNTL NNITSKYWRV
 VFDTKGDRYS SPVPELQIL GYPLPNADTI MKTVTTAKEL SQQKDKFSQK MLDELKIKEM
 ALETSLNSKI FDTVAINANA GVLKDCIEKR QLLKK

Figure 17