



República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

(21) **PI0616242-8 A2**



(22) Data de Depósito: 08/09/2006
(43) Data da Publicação: 14/06/2011
(RPI 2110)

(51) *Int.Cl.:*
C07K 1/30 2006.01
C07K 1/36 2006.01

(54) Título: **FLOCULAÇÃO DE PROTEÍNA USANDO SAIS**

(30) Prioridade Unionista: 15/09/2005 US 60/717,838

(73) Titular(es): WYETH

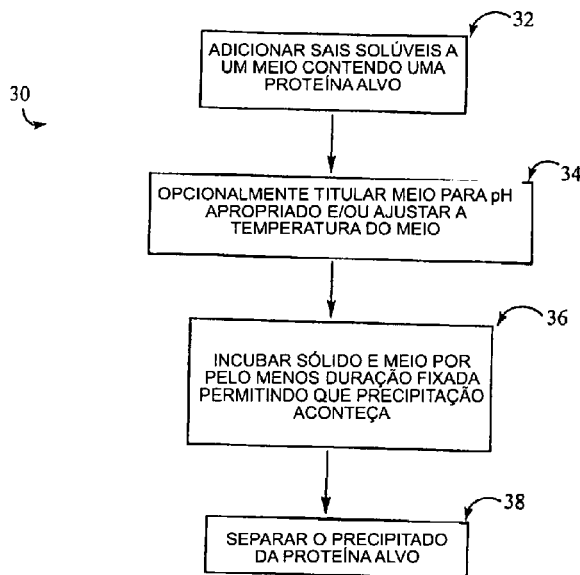
(72) Inventor(es): JONATHAN L. COFFMAN, RUSSELL I. SHPRITZER, STEVEN M. VICIK

(74) Procurador(es): Dannemann, Siemsen, Bigler & Ipanema Moreira

(86) Pedido Internacional: PCT US2006035025 de 08/09/2006

(87) Publicação Internacional: WO 2007/035283 de 29/03/2007

(57) Resumo: FLOCULAÇÃO DE PROTEÍNA USANDO SAIS. Métodos de separação, por exemplo, para isolar uma proteína recombinante, são revelados. Em algumas implementações, um método inclui formação de um sólido contendo um primeiro cátion e um primeiro ânion em um meio contendo uma proteína, e separação do sólido da proteína.



Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "**FLOCULAÇÃO DE PROTEÍNA USANDO SAIS**".

REFERÊNCIA CRUZADA A PEDIDOS RELACIONADOS

O presente pedido reivindica o benefício de Pedido Provisório dos
5 Estados Unidos Nº 60/717.838 depositado em 15 de setembro de 2005, que
é aqui incorporado a título de referência em sua totalidade.

CAMPO DA TÉCNICA

A invenção refere-se a métodos de separação, por exemplo, métodos de recuperação de um produto purificado a partir de um fluido incluindo impurezas tal como uma ou mais impurezas solúveis, células, restos celulares ou impurezas insolúveis.
10

ANTECEDENTES

Dentro da indústria da biotecnologia, a purificação de proteínas em uma escala comercial é um desafio importante para o desenvolvimento de proteínas recombinantes para propósitos terapêuticos e de diagnóstico. Problemas relacionados ao rendimento, pureza e produtividade total desafiam o setor de fabricação. Com o advento de tecnologia de proteína recombinante, uma proteína de interesse pode ser produzida usando linhagens de célula hospedeira eucariótica cultivada engenheiradas para expressar um
15 gene codificando a proteína. O que pode resultar de um processo de cultura de célula hospedeira, no entanto, é uma mistura da proteína desejada junto com impurezas que são ou derivadas da própria proteína, tal como variantes de proteína, ou da célula hospedeira, tal como proteínas de célula hospedeira, DNA e restos celulares. O uso da proteína recombinante desejada para
20 aplicações farmacêuticas pode ser contingente em ser capaz de recuperar confiavelmente níveis adequados da proteína a partir dessas impurezas. Tecnologia recombinante pode também produzir proteínas que não são encontradas na natureza, por exemplo, proteínas mutantes novas, proteínas de fusão ou proteínas com seqüências de sinal heterólogas que direcionam a
25 secreção da proteína para o meio. Proteínas recombinantes podem ser expressas em muitos tipos de célula eucariótica, incluindo células de Ovário de Hamster Chinês (CHO), rim de hamster Chinês (BHK), células mieloma NS0
30

e células de levedura *Pichia pastoris*.

Tipicamente, para produzir uma proteína recombinante, um vetor de DNA recombinante é criado, o qual contém um gene que codifica a proteína a ser expressa com seqüências apropriadas para direcionar a transcrição e tradução do gene no tipo de célula desejado. O vetor pode também conter seqüências tal como marcadores selecionáveis ou contra-selecionáveis, por exemplo, genes de resistência a fármaco, e/ou seqüências desenvolvidas para promover a retenção estável das seqüências de expressão de proteína. Para células de mamífero, vetores de plasmídeo e virais, por exemplo, vetores retrovirais, podem ser usados.

Seguindo a criação do vetor, o vetor é então introduzido nas células. O vetor pode ser transfectado como DNA nu usando métodos padrão, por exemplo, lipofecção, fosfato de cálcio, DEAE-dextrano, eletroporação ou biolística (pistola de gene). Vetores virais podem ser introduzidos através de infecção com partículas virais. As células são então avaliadas ou selecionadas quanto àquelas que contêm o vetor.

Células que contêm o vetor e expressam a proteína recombinante podem ser cultivadas em um meio líquido ou em um apoio sólido, e a proteína isolada da cultura celular. Densidade de célula de mamífero varia entre 10^6 células/mL a 2×10^7 células por mL ou mais. A maioria das proteínas é secretada. Concentrações de proteína secretada podem variar entre 4 mg/L a 10 g/L. No entanto, se a proteína for produzida intracelularmente, as células são quebradas para liberar a proteína, enquanto se a proteína for secretada, ela pode ser isolada do meio de crescimento ou do apoio seguindo remoção das células e restos celulares. A proteína isolada pode ser então purificada.

Métodos de purificação de proteína biofarmacêuticos convencionais usados para remover células e restos celulares incluem centrifugação, microfiltração e filtros de profundidade. Auxiliares de filtro, tal como terra diatomácea, podem ser usados para aumentar o desempenho dessas etapas, mas eles não são sempre eficazes e algumas vezes se ligam significativamente ao produto de interesse. Seu uso pode também requerer a adição

de um sólido ou uma suspensão homogênea que pode ser desafiadora como parte de operações biofarmacêuticas em larga escala.

Floculantes poliméricos podem ser usados para auxiliar na clarificação de correntes de processo de cultura de célula de mamífero, mas eles podem ter limitações. Por exemplo, preparações de sulfato de protamina tipicamente usadas como auxiliares de processamento são limitadas em aplicações devido a preocupações sobre inativação da proteína de interesse ou perda de produto devido à precipitação (Scopes, 1987). Reagente de alta qualidade, tal como aquele vendido para uso médico, pode ser caro. Em certos casos, remoção para níveis muito baixos pode requerer validação para assegurar que não haja quaisquer efeitos inesperados em pacientes. Por exemplo, a quitosana não é um reagente bem definido e há preocupações com relação ao seu desempenho consistente em uso de rotina em aplicações de clarificação. Polímeros carregados múltiplos, tal como DEAE dextrano, polímeros baseados em acrilamida freqüentemente usados em tratamento de água de refugio (NALCO *Water Handbook*, Capítulo 8) e polietileno amina (PEI) foram considerados para uso em aplicações de clarificação. Com relação aos dois últimos tipos de polímeros, os reagentes de acrilamida têm o potencial para contaminação com reagentes tóxicos e polietileno amina, enquanto um reagente de clarificação altamente eficaz, é freqüentemente contaminado com quantidades variáveis de monômero de etilenoimina, um agente de câncer suspeito (Scawen e outros). Além disso, muitos desses polímeros, incluindo PEI, tendem a se ligar quase que irreversivelmente a muitas resinas cromatográficas, deste modo limitando opções de processamento a jusante. As preocupações reguladoras e de reuso de matérias-primas associadas com esses polímeros têm limitado sua aplicação principalmente a estudos acadêmicos.

Floculantes baseados em não-polímero, tal como alume e sais de ferro, têm sido utilizados na indústria de tratamento de água de refugio (NALCO *Water Handbook*). Essas substâncias podem parecer ser não-úteis em processamento de produtos de proteína porque elas podem se ligar ao

produto de proteína ou podem catalisar reações químicas resultando em modificações da proteína que poderiam afetar segurança ou eficácia.

SUMÁRIO

5 A invenção refere-se a métodos de separação. Os métodos de separação podem ser usados para isolar uma proteína, tal como uma proteína recombinante, de um fluido contendo impurezas tal como uma ou mais impurezas solúveis, impurezas insolúveis, células ou restos celulares.

10 Em um aspecto, a invenção refere-se a métodos de separação que incluem adição a um fluido de uma ou mais (por exemplo, duas ou mais) soluções solúveis que podem formar um precipitado que auxilia na remoção de impurezas. O precipitado pode se associar mais fortemente com impurezas e menos fortemente com um produto alvo. A(s) solução(ões) pode(m) incluir cátions solúveis, por exemplo, íons de metal e/ou ânions solúveis que são capazes de interagir com, por exemplo, particulatos, material coloidal, 15 restos celulares ou células, e formar um precipitado insolúvel, por exemplo, quando misturados juntos. O precipitado resultante pode ser clarificado ou removido usando técnicas de separação sólido-líquido, tal como microfiltração, filtração em profundidade ou centrifugação. O fluido tratado pode ter um nível de impureza reduzido em comparação com fluido não-tratado processado 20 similarmente.

Impurezas podem ser relacionadas com aqueles elementos encontrados em suspensão dentro do fluido. Em algumas modalidades, as impurezas incluem material coloidal, material particulado, células, restos de célula tal como fragmentos de membrana e outros complexos celulares 25 grandes que são insolúveis sob condições de processamento típicas. Impurezas podem também referir-se a componentes celulares que permanecem solúveis sob condições de processamento típicas. DNA, proteínas de célula hospedeira e fosfolípidos são exemplos de componentes celulares que estão presentes em solução durante clarificação. Adicionalmente, impurezas 30 relacionadas a produto solúvel, tal como isoformas inativas ou espécies agregadas, podem estar presentes.

Os níveis de impureza podem ser avaliados através de uma variedade de métodos. Um método que provê uma medida da quantidade de restos no fluido é a medição nefalométrica de turvação. Alternativamente, o nível de restos pode ser avaliado medindo a área de filtro de membrana requerida para processar um volume conhecido do fluido. Impurezas específicas podem ser também solúveis no fluido requerendo testes bioquímicos específicos para avaliar. Níveis de DNA podem ser medidos usando métodos baseados em fluormétrica, tal como usando o corante comercialmente disponível Picogreen (Invitrogen, Número do Produto P-7581). Abordagens alternativas incluem métodos de hibridização, tal como técnicas *slot-blot*, ou reações de cadeia de polimerase (métodos de PCR). Níveis de proteína de célula hospedeira podem ser avaliados através de métodos de eletroforese de gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), cromatografia de fase reversa ou ensaio imunoabsorvente ligado à enzima (ELISA). Fosfolipídeos podem ser analisados através de cromatografia de camada fina ou cromatografia líquida de alto desempenho.

O precipitado resultante pode interagir com ambas impurezas em solução e impurezas solúveis e esta interação pode diminuir os níveis dessas impurezas no fluido purificado. Como resultado, os métodos de separação podem prover economias de custo e/ou tempo, bem como qualidade de produto maior, por exemplo, para um processo industrial que usa cultura de célula de mamífero para a produção de proteínas recombinantes.

Em outro aspecto, a invenção refere-se a um aumento no desempenho de etapas cromatográficas subseqüentes, por exemplo, o desempenho de uma etapa cromatográfica de Proteína A. A cromatografia de Proteína A é tipicamente realizada através de aplicação direta de meio condicionado livre de célula à resina onde a proteína A de *Staphylococcus aureus* foi imobilizada. A resina é subseqüentemente lavada com uma solução aquosa de pH neutro (aproximadamente pH 6-8) e proteína ligada é freqüentemente eluída com um tampão ácido. Antes do processamento subseqüente, o grupo de eluato é ajustado para pH neutro. O grupo de eluato da proteína A freqüentemente precipita quando da neutralização, especialmente quando cul-

turas celulares de alta densidade são usadas para a carga. De acordo com a invenção, remoção de proteína de célula hospedeira pela etapa da Proteína A é maior do que a carga que foi tratada com um metal e um ânion em comparação com um fluido não-tratado. Em modalidades, a precipitação do pico de Proteína A quando da neutralização é freqüentemente menos quando o fluido da carga foi tratado com um cátion e um ânion provendo um aperfeiçoamento no processamento.

Em outro aspecto, a invenção refere-se à seleção de dois agentes solúveis que, quando misturados, formam um sólido que pode melhorar a pureza do fluido do processo com recuperação de produto alta sob condições apropriadas. Esses agentes podem incluir, mas não estão limitados a, cálcio, manganês, magnésio, alumínio, cobalto, níquel, carbonato, flúor, sulfeto, fosfato, silicato e alginatos. Esses compostos representam uma combinação de íons de metal multivalentes com ânions monovalentes, ou, alternativamente, ânions multivalentes ou polivalentes, que são os ligantes preferidos para o metal. Sais desses cátions e ânions, quando misturados sob condições apropriadas potencialmente para formar complexos que são moderadamente solúveis, podem ser de utilidade em aplicações de clarificação.

Em outro aspecto, a invenção refere-se a um método, incluindo formação de um sólido tendo um primeiro cátion e um primeiro ânion em um meio incluindo uma proteína; e separação do sólido da proteína.

Em outro aspecto, a invenção refere-se a um método, incluindo introdução de um primeiro cátion e um primeiro ânion em um meio tendo uma proteína; precipitação de um sólido tendo o primeiro cátion e o primeiro ânion; e separação do sólido da proteína.

Os métodos descritos aqui podem ser usados para facilitar a filtração de uma ou mais impurezas a partir de um meio, por exemplo, um meio fluido (por exemplo, uma suspensão turva). Por exemplo, esses métodos podem ser usados em um meio tendo um ou mais agentes causadores de turvação que tornam as impurezas difíceis ou inconvenientes de remover usando métodos de filtração convencionais. Deste modo, em outro aspecto, a invenção refere-se a um método que inclui (i) formação de um sólido que

inclui um primeiro cátion e um primeiro ânion em um meio (por exemplo, um meio fluido) que inclui uma porção alvo (por exemplo, uma porção a ser purificada) e um ou mais agentes causadores de turvação tal como proteínas de célula hospedeira precipitadas ou agregadas, lipídeos, restos celulares, células inteiras, DNA precipitado ou o precipitado que se forma quando da neutralização de pico da Proteína A e (ii) separação do sólido e do(s) agente(s) causadores de turvação da solução através de, por exemplo, filtração. Em modalidades, o agente causador de turvação pode ser de origem não-celular, tal como material coloidal, material em partícula derivado de fontes ambientais tal como areia, terra, partículas finas de ácido inoxidável moído ou excipientes precipitados tal como antiespumante ou uréia. O meio (por exemplo, uma suspensão turva) pode ter uma turvação relativamente alta, tal como maior do que 5NTU conforme medido por um medidor de turvação, ou maior do que 100NTU ou maior do que 500NTU. Em algumas modalidades, a presença do sólido pode aumentar a capacidade de filtro do meio. Em algumas modalidades, a turvação do meio tratado (por exemplo, o meio após realização das etapas (i) e (ii)) pode ser menos do que o meio não-tratado. Em algumas modalidades, a porção alvo pode ser uma proteína (por exemplo, uma proteína solúvel, por exemplo, um anticorpo). O método pode incluir ainda recuperação da porção alvo a partir da solução após filtração.

Modalidades podem incluir uma ou mais das características que seguem.

O primeiro cátion pode ser cálcio, magnésio, estrôncio, alumínio, escândio, lântano, silício, titânio, zircônio, tório, manganês, cobalto, cobre, cromo, ferro, níquel zinco ou vanádio. O primeiro cátion pode ser cálcio.

O primeiro ânion pode ser fosfato, carbonato, cromato, tungstato, hidróxido, haleto, succinato, tartrato, citrato, sulfeto, molibdato, nitrato, flúor, silicato e alginato. O primeiro ânion pode ser fosfato.

O primeiro cálcio pode ser cálcio e o primeiro ânion pode ser fosfato.

O sólido pode ter uma constante de produto de solubilidade de não mais do que cerca de $10^{-4}M^2$.

O método pode ainda incluir introdução de a partir de cerca de 4 mM a cerca de 200 mM do primeiro cátion ou do primeiro ânion no meio.

O produto das concentrações do primeiro cátion e do primeiro ânion pode ser maior do que cerca de $10^{-5}M^2$, $10^{-4}M^2$ ou $2,7 \times 10^{-2}M^2$.

5 As concentrações do primeiro cátion e do primeiro ânion no meio podem ser diferentes.

As concentrações do primeiro cátion e do primeiro ânion no meio podem ser substancialmente as mesmas.

O método pode incluir ainda mudança do pH do meio.

10 O pH do meio pode ser mantido entre e de a partir de cerca de 5 a cerca de 9.

O método pode prover separação de pelo menos cerca de 50% da proteína no meio. O método pode prover separação de pelo menos cerca de 70% da proteína no meio.

15 O método pode incluir ainda diminuição da turvação clarificada do meio clarificado em pelo menos cerca de 30% com relação a um segundo meio clarificado idêntico ao meio e livre do sólido. O método pode incluir ainda diminuição da turvação do meio clarificado em pelo menos cerca de 50% com relação a um segundo meio clarificado idêntico ao meio e livre do sólido.

20 O meio pode incluir células. O meio pode incluir ainda células de mamífero. O meio pode incluir ainda células eucarióticas.

O método pode incluir ainda centrifugação do meio, filtração do meio através de uma membrana de microfiltração ou filtração do meio através de um filtro de profundidade.

25 O sólido pode incluir ainda uma segunda espécie de cátion ou um segundo ânion.

O meio que inclui a proteína, após o sólido ser formado e separado, pode ser aplicado a uma coluna de Proteína A e eluído para prover um pico eluído tendo uma turvação menor do que um pico similarmente eluído de um segundo meio idêntico ao primeiro meio e livre de formação do sólido.

30

O meio que inclui a proteína, após o sólido ser formado e separado, pode ser aplicado a uma coluna de Proteína A e eluído para prover um pico eluído tendo um nível de impureza solução menor do que um pico eluído de um segundo meio idêntico ao meio e livre de formação do sólido.

5 O primeiro cátion e o primeiro ânion podem ser introduzidos sequencialmente.

O primeiro cátion e o primeiro ânion podem ser introduzidos simultaneamente.

10 O método pode incluir introdução de concentrações diferentes do primeiro cátion e do primeiro ânion no meio ou introdução da mesma concentração do primeiro cátion e do primeiro ânion no meio.

O método pode incluir ainda ajuste da temperatura do meio.

15 A proteína pode ser uma proteína secretada. A proteína pode ser um anticorpo, um fragmento de ligação de antígeno de um anticorpo, um receptor solúvel, uma fusão de receptor, uma citocina, um fator de crescimento, uma enzima ou um fator de coagulação.

20 Em modalidades onde a proteína é um anticorpo ou um fragmento dele, ela pode incluir pelo menos uma, e tipicamente duas cadeias pesadas de comprimento integral, e tipicamente duas cadeias leves. Alternativamente, os anticorpos ou fragmentos deles podem incluir apenas um fragmento de ligação de antígeno (por exemplo, um Fab, F(ab')₂, Fv ou um fragmento Fc de cadeia simples). O anticorpo ou fragmento dele pode ser um anticorpo monoclonal ou de especificidade única. O anticorpo ou fragmento dele pode ser também um anticorpo humano, humanizado, quimérico, enxertado com CDR ou gerado *in vitro*. Em ainda outras modalidades, o anticorpo tem uma região constante de cadeia pesada escolhida de, por exemplo, IgG1, IgG2, IgG3 ou IgG4. Em outra modalidade, o anticorpo tem uma cadeia leve escolhida de, por exemplo, kappa ou lambda. Em uma modalidade, a região constante é alterada, por exemplo, mutada, para modificar as propriedades do anticorpo (por exemplo, para aumentar ou diminuir um ou mais de: ligação de receptor Fc, glicosilação de anticorpo, o número de resíduos cisteína, função de célula efetora ou função de complemento). Tipica-

25

30

mente, o anticorpo ou fragmento dele se liga especificamente a um antígeno predeterminado, por exemplo, um antígeno associado com um distúrbio, por exemplo, um distúrbio neurodegenerativo, metabólico, inflamatório, auto-imune e/ou um maligno. Anticorpos exemplares que podem ser separados
5 pelos métodos da invenção incluem, mas não estão limitados a, anticorpos contra um peptídeo A β , interleucina-13 (IL-13), interleucina-22 (IL-22), 5T4 e fator-8 de crescimento e diferenciação (GDF-8).

Outros aspectos, características e vantagens ficarão aparente a partir da descrição das suas implementações preferidas e a partir das reivindicações.
10

DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

A FIGURA 1 é um fluxograma de uma modalidade de um método de separação.

A FIGURA 2 é uma representação gráfica que mostra o efeito de escala e método de mistura sobre a floculação.
15

A FIGURA 3 é uma representação gráfica que mostra o efeito de velocidade de mistura sobre a floculação.

A FIGURA 4 é um sumário gráfico de cinco experimentos de floculação de escala piloto.

A FIGURA 5 é um sumário gráfico que mostra mudanças em % de recuperação de anticorpo ao longo do tempo para cada um dos cinco experimentos de floculação de escala piloto sumarizados na FIGURA 4.
20

DESCRIÇÃO DETALHADA

Com referência à FIGURA 1, um método 30 para separação de
25 uma proteína alvo, tal como uma proteína recombinante, é mostrado. O método 30 inclui adição de sais solúveis (tal como um sal contendo cálcio e um sal contendo fosfato) a um fluido contendo a proteína (etapa 32) e impurezas (que podem incluir, mas não estão limitadas a, restos celulares, células, DNA, proteína de célula hospedeira e impurezas relacionadas a produto tal
30 como espécies isoformas ou agregadas). As soluções de sal podem conter agentes de tamponamento para minimizar as mudanças de pH ou otimizar o pH no fluido quando da mistura das soluções de sal. Quando do contato (por

exemplo, mistura), os sais solúveis freqüentemente começam a reagir para formarem um precipitado insolúvel (tal como um fosfato de cálcio sólido) que pode sedimentar no meio. Conforme mostrado na FIGURA 1, o meio pode ser subseqüentemente titulado para um pH predeterminado e a temperatura

5 ajustada (etapa 34), conforme necessário, para aumentar a precipitação. O precipitado de sedimentação também sedimenta as células e os restos, e potencialmente outras impurezas, enquanto a proteína alvo permanece essencialmente solúvel no fluido. A suspensão de fluido é incubada sob condições apropriadas por uma duração fixada a fim de promover precipitação e

10 otimizar clarificação enquanto mantendo altos níveis de recuperação de proteína alvo (etapa 36). Subseqüentemente, o precipitado é separado do fluido contendo a proteína alvo (etapa 38). Esta operação pode acontecer em uma variedade de maneiras incluindo sedimentação por gravidade, centrifugação ou filtração onde alternativas para filtração incluem filtração em fluxo tan-

15 gencial, filtração em profundidade, filtração através de meio carregado, filtração em almofada onde terra diatomácea é um componente do meio. A quantidade de cátion e ânion adicionada ao meio pode não ser suficiente para permitir sedimentação por gravidade da precipitação ou de restos, mas pode ainda facilitar filtração através da ação como um auxiliar de filtro. A

20 separação sólido-líquido pode incluir processamento através de uma série de opções acima mencionadas, tipicamente culminando com passagem de fluido através de um filtro com uma taxa de tamanho de poro nominal baixa (tal como 0,45, 0,2 ou 0,1 μM), que pode ser considerada esterilizante em grau. O fluido clarificado pelos métodos de floculação descritos aqui pode

25 requerer menos áreas de filtração, ou como parte da clarificação primária ou após uma etapa de separação sólido-líquido inicial tal como centrifugação. Além disso, a turvação do filtro pós-almofada e de grau pós-esterilização pode ser significativamente reduzida comparado com um controle não-floculado.

30 Tipicamente, purificação subseqüente pode proceder através de uma série de etapas cromatográficas, embora outros métodos de purificação, tal como cristalização e precipitação, possam ser concebidos. Após cla-

rificação usando o método descrito, o desempenho da primeira etapa cromatografia, que para anticorpos é freqüentemente uma coluna de Proteína A, pode ser aumentado. A remoção geral de impurezas derivadas de célula, incluindo proteína de célula hospedeira, pode ser maior do que quando tratamento de floculação não é conduzido. Em muitos casos, pico de grupo de eluato de Proteína A neutralizado também tem menos precipitação conforme comparado com o controle não-tratado. Este nível menor de precipitação pode requerer menos área de filtro ou pode reduzir o tempo de processamento necessário. O nível menor de precipitação também indica a remoção de uma impureza indesejada.

Sem desejar ser limitado pela teoria, acredita-se que o precipitado insolúvel aumente a separação da proteína ao seletivamente se associar com as células, restos celulares e outras impurezas da corrente de processo enquanto não significativamente interagindo com a proteína. Um exemplo não-limitante do processo de remoção de impureza tomado como hipótese é mostrado na equação (1) abaixo:

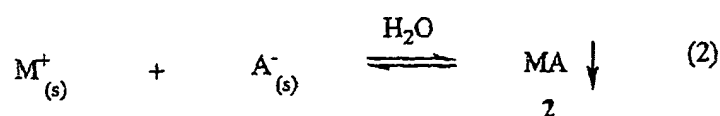


Com referência à equação (1), M^+ é um cátion solúvel (isto é, "(s)"), e A^- é um ânion solúvel que pode interagir com M^+ para formar um sal ou complexo insolúvel; os círculos sombreados e cheios representam cada um uma impureza solúvel ou insolúvel; **1** é um precipitado insolúvel que inclui o sal ou complexo de cátion-ânion e impurezas associadas com eles (**1** é algumas vezes referido aqui como o "complexo ou sal final" ou "sólido tendo um primeiro cátion e um primeiro ânion"; e a seta apontando para baixo indica que **1** está em forma precipitada. Por exemplo, fosfato de cálcio pode interagir ionicamente e/ou através de quelação com DNA, proteína de célula hospedeira e restos celulares, enquanto não interagindo significativamente com a proteína alvo. Esta seletividade permite que a proteína permaneça no

sobrenadante, e, subseqüentemente, seja prontamente separada do meio e outros componentes do meio condicionado.

Ainda com referência à FIGURA 1, o método de separação 30 inclui introdução de um primeiro sal solúvel e um segundo sal solúvel em um meio (etapa 32). O meio pode ser, por exemplo, uma solução aquosa condi-
 5 cionada onde uma proteína recombinante foi formada. O primeiro sal solúvel inclui um primeiro cátion e o segundo sal solúvel inclui um primeiro ânion. Quando do contato, o primeiro cátion e o primeiro ânion são capazes de inte-
 10 ragir no meio e podem começar a formar um precipitado insolúvel. O ambiente do fluido pode ser ajustado em qualquer momento no pH ou temperatura para otimizar condições de precipitação (por exemplo, etapa 34) e a solu-
 ção é incubada por uma duração fixada para permitir que o sistema equilibre completamente (etapa 36).

Em geral, qualquer combinação de cátion (por exemplo, um pri-
 15 meiro cátion)/ânion (por exemplo, um primeiro ânion) pode ser selecionada, que seja capaz de formar um sal ou complexo relativamente insolúvel no fluido contendo o produto de interesse. Em modalidades, tais sais ou com-
 20 plexos podem ser identificados como sendo insolúveis, moderadamente solu-
 lúveis, praticamente insolúveis, muito levemente insolúveis ou levemente
 25 insolúveis em uma solução comparável com o fluido contendo o produto de interesse. Combinações de cátion/ânion exemplares incluem aquelas onde o cátion selecionado (por exemplo, um primeiro cátion, por exemplo, M^+ na equação 2 abaixo) e o ânion selecionado (por exemplo, um primeiro ânion, por exemplo, A^- na equação 2 abaixo) são capazes de formar um sal ou complexo (por exemplo, MA na equação 2 abaixo) que é relativamente inso-
 lúvel em água:



em que "(s)" e a seta apontando para baixo são conforme definido com relação à equação (1). Em muitos casos, caracterização de solubilidade em água conforme descrito em *The Merck Index* ou no *The Handbook of Physics*

and Chemistry ou outras referências similares serve como um indicador apropriado de desempenho potencial.

Em algumas modalidades, o cátion selecionado e o ânion selecionado são capazes de formar um sal ou complexo tendo uma constante de produto de solubilidade (K_{sp}) em água de a partir de cerca de $1 \times 10^{-4} M^2$ a cerca de $1 \times 10^{-50} M^2$ (por exemplo, de a partir de cerca de $1 \times 10^{-5} M^2$ a cerca de $1 \times 10^{-50} M^2$, de a partir de cerca de $1 \times 10^{-6} M^2$ a cerca de $1 \times 10^{-50} M^2$, de a partir de cerca de $1 \times 10^{-4} M^2$ a cerca de $1 \times 10^{-40} M^2$). Em algumas modalidades, cátions e ânions exemplares podem ser identificados como uma constante de produto de solubilidade (K_{sp}) entre o primeiro cátion e o primeiro ânion ($[cátion/ \times [ânion]]$) de menos do que cerca de $10^{-4} M^2$, por exemplo, e de preferência abaixo de cerca de $10^{-5} M^2$ ou $10^{-6} M^2$. Substâncias com valores K_{sp} de menos do que $10^{-4} M^2$ podem ser utilizadas nos métodos uma vez que essas substâncias, quando da mistura com o cátion e o ânion, podem resultar em uma solução final de no máximo 10 mM de cada; adição do cátion ou ânion em excesso de 10 mM pode resultar em precipitação e subsequente floculação. Substâncias com valores K_{sp} maiores do que aqueles listados acima podem ser usadas, no entanto, uma quantidade excessiva de cátion e ânion pode ser necessária para formar o sólido.

O cátion (por exemplo, um primeiro cátion) pode ser um metal alcalino-terroso, um metal de transição ou um elemento de grupo principal. Esses elementos podem ser classificados em ácidos duros, ácidos *borderline* ou ácidos moles. Exemplos de primeiros cátions incluem cálcio (Ca^{2+}), magnésio (Mg^{2+}), estrôncio (Sr^{2+}), alumínio (Al^{3+}), cobre (Cu(I) ou Cu(II)), escândio (Sc^{3+}), lântano (La^{3+}), silício (Si^{4+}), titânio (Ti(III) ou Ti(IV)), tório, zircônio, manganês (Mn(II) ou Mn(III)), cobalto (Co(II) ou Co(III)), cromo (Cr(II) ou Cr(III)), ferro (Fe(II) ou Fe(III)), níquel (Ni^{2+}), zinco (Zn^{2+}) e vanádio (V(III), V(IV) ou V(V)). Esses representam os ácidos duros e *borderline*. O primeiro ânion pode ser uma espécie atômica ou uma espécie molecular. Em algumas modalidades, o primeiro cátion pode ser Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn(II), Co(II) ou Ni^{2+} . Em certas modalidades, o primeiro cátion pode ser Ca^{2+} .

Exemplos de primeiros ânions incluem ânions que são os ligantes preferidos para o íon de metal usado. Para o ácido duro e os ácidos *border-line*, os ânions podem incluir fluoreto, fosfato, carbonato, silicato, cromato, tungstato, hidróxido, sulfeto, nitrato, molibdato, succinato, tartarato e citrato, e até certo ponto sulfatos e percloratos (vide *Aquatic Chemistry*, Editores W. Stumm e J.S. Morgan, J. Wiley (1981), p. 343; e R.G. Pearson, *J. Amer. Chem. Soc.*, v. 85, p. 3533 (1963)). Em algumas modalidades, o primeiro ânion pode ser fosfato, sulfito, carbonato, fluoreto, molibdato ou silicato. Em certas modalidades, o primeiro ânion pode ser fosfato.

Em algumas modalidades, o primeiro cátion pode ser Ca^{2+} e o primeiro ânion pode ser fosfato, sulfeto, carbonato, fluoreto, molibdato ou silicato. Em certas modalidades, o primeiro cátion pode ser Ca^{2+} e o primeiro ânion pode ser fosfato.

Em algumas modalidades, o primeiro cátion pode ser Mg^{2+} , Mn(II) , Co(II) ou Ni^{2+} e o primeiro ânion pode ser fosfato, carbonato ou fluoreto.

A concentração inicial para cada um dos primeiro cátion e primeiro ânion (isto é, a concentração do primeiro cátion e do primeiro ânion que é introduzida no meio (antes do início da precipitação)) pode variar de a partir de cerca de 2 milimolares a cerca de 200 milimolares (por exemplo, de a partir de cerca de 3 milimolares a cerca de 200 milimolares, de a partir de cerca de 4 milimolares a cerca de 200 milimolares, de a partir de cerca de 5 milimolares a cerca de 200 milimolares, de a partir de cerca de 4 milimolares a cerca de 100 milimolares, de a partir de cerca de 4 milimolares a cerca de 50 milimolares, de a partir de cerca de 4 milimolares a cerca de 40 milimolares, de a partir de cerca de 4 milimolares a cerca de 30 milimolares, de a partir de cerca de 4 milimolares a cerca de 10 milimolares, de a partir de cerca de 10 milimolares a cerca de 80 milimolares, de a partir de cerca de 10 milimolares a cerca de 40 milimolares, de a partir de cerca de 10 milimolares a cerca de 30 milimolares, de a partir de cerca de 20 milimolares a cerca de 80 milimolares, de a partir de cerca de 20 milimolares a cerca de 40 milimolares, por exemplo, cerca de 4 mili-

molares, cerca de 6 milimolares, cerca de 10 milimolares, cerca de 13,3 milimolares, cerca de 16 milimolares, cerca de 20 milimolares, cerca de 24 milimolares, cerca de 30 milimolares, cerca de 33,3 milimolares, cerca de 40 milimolares, cerca de 50 milimolares ou cerca de 80 milimolares) dependendo da solubilidade do complexo final. Em certas modalidades, a concentração do primeiro cátion introduzido no meio (antes do início da precipitação) pode ser cerca de 6 milimolares, cerca de 10 milimolares, cerca de 20 milimolares, cerca de 24 milimolares, cerca de 30 milimolares, cerca de 40 milimolares, cerca de 50 milimolares ou cerca de 80 milimolares. Em certas modalidades, a concentração do primeiro ânion introduzido no meio (antes do início da precipitação) pode ser 4 milimolares, cerca de 10 milimolares, cerca de 13,3 milimolares, cerca de 16 milimolares, cerca de 20 milimolares, cerca de 24 milimolares, cerca de 30 milimolares, cerca de 40 milimolares, cerca de 50 milimolares ou cerca de 80 milimolares. Por exemplo, a concentração do primeiro cátion introduzido no meio (antes do início da precipitação) pode ser cerca de 30 milimolares e a concentração do primeiro ânion introduzido no meio (antes do início da precipitação) pode ser cerca de 20 milimolares. Como outro exemplo, a concentração do primeiro cátion introduzido no meio (antes do início da precipitação) pode ser cerca de 24 milimolares e a concentração do primeiro ânion introduzido no meio (antes do início da precipitação) pode ser cerca de 16 milimolares.

Em algumas modalidades, o produto das concentrações iniciais descritas acima do primeiro cátion e do primeiro ânion pode ser de a partir de cerca de $4 \times 10^{-6} M^2$ a cerca de $4 \times 10^{-2} M^2$ (por exemplo, de a partir de cerca de $1,6 \times 10^{-5} M^2$ a cerca de $4 \times 10^{-2} M^2$, de a partir de cerca de $2,5 \times 10^{-5} M^2$ a cerca de $4 \times 10^{-2} M^2$, de a partir de cerca de $1,6 \times 10^{-5} M^2$ a cerca de $6 \times 10^{-2} M^2$ ou de a partir de cerca de $2,5 \times 10^{-5} M^2$ a cerca de $6,4 \times 10^{-3} M^2$). Em algumas modalidades, o produto das concentrações iniciais acima descritas do primeiro cátion e do primeiro ânion pode ser maior do que cerca de $1 \times 10^{-5} M^2$, maior do que cerca de $2 \times 10^{-5} M^2$, maior do que cerca de $1 \times 10^{-4} M^2$, maior do que cerca de $2 \times 10^{-4} M^2$, maior do que cerca de $10 \times 10^{-4} M^2$ ou maior do que cerca de $2,7 \times 10^{-2} M^2$. Em algumas modalidades, essas

concentrações podem resultar em precipitação significativa do sal insolúvel junto com as impurezas. Concentrações que são muito altas podem resultar em volume sólido de mais do que cerca de 10% do volume de fluido total. Concentrações em excesso de 500 mM de cátion ou ânion com constantes de solubilidade baixas podem dar volumes sólidos grandes. Recuperação de produto adequada a partir de um volume de sólido grande pode ser difícil usando técnicas de separação sólido-líquido padrão. Exemplos de precipitados incluem fosfato de cálcio, sulfeto de cálcio, carbonato de cálcio, fluoreto de cálcio, silicato de cálcio, molibdato de cálcio, carbonato de magnésio, fosfato de magnésio, fluoreto de magnésio, fosfato de manganês, carbonato de manganês, fosfato de cobalto, fosfato de níquel e carbonato de níquel.

Em algumas modalidades, a K_{sp} do sal ou complexo final no meio de fluido (por exemplo, 1 na equação (1), isto é, o precipitado insolúvel que inclui o sal ou complexo de cátion-ânion e impurezas associadas com ele) pode ser de a partir de cerca de $1 \times 10^{-4} M^2$ a cerca de $1 \times 10^{-50} M^2$ (por exemplo, de a partir de cerca de $1 \times 10^{-5} M^2$ a cerca de $1 \times 10^{-50} M^2$, de a partir de cerca de $1 \times 10^{-6} M^2$ a cerca de $1 \times 10^{-50} M^2$, de a partir de cerca de $1 \times 10^{-4} M^2$ a cerca de $1 \times 10^{-40} M^2$). Em algumas modalidades, a K_{sp} do sal ou complexo final no meio fluido pode ser menos do que cerca de $10^{-4} M^2$, por exemplo, e de preferência, menos do que cerca de $10^{-5} M^2$ ou $10^{-6} M^2$. Por exemplo, na amostra Nº 2 anti-IL13 com 40 mM de cálcio e 20 mM de fosfato na Tabela 1, o sobrenadante após centrifugação (isto é, após precipitação) continha 8,19 mM de cálcio e 1,04 mM de fosfato. Este nível de cálcio e fosfato solúveis corresponde a uma K_{sp} de $8,5 \times 10^{-6} M^2$. Na amostra Nº 1 anti-AB com 80 mM de cálcio e 20 mM de fosfato na Tabela 1, o sobrenadante após centrifugação continha 22,2 mM de cálcio e 0,4 mM de fosfato. Este nível de cálcio e fosfato solúveis corresponde a uma K_{sp} de $8,4 \times 10^{-6} M^2$.

Em algumas modalidades, o K_{sp} do sal ou complexo final no meio fluido (por exemplo, 1 na equação (1)) pode ser diferente (por exemplo, maior do que) a K_{sp} do próprio sal ou complexo de cátion-ânion (isto é, quaisquer impurezas associadas, por exemplo, 2 na equação (2))) em água. Por exemplo, com referências às equações (1) e (2), a K_{sp} de, por exemplo, 1

(por exemplo, MA = fosfato de cálcio) no fluido pode ser diferente da (por exemplo, maior do que) K_{sp} do próprio fosfato de cálcio em água (por exemplo, 2 na equação (2) onde MA = fosfato de cálcio).

Outras implementações de formação do precipitado podem ser realizadas. Por exemplo, o primeiro cátion e o primeiro ânion podem ser introduzidos no meio substancialmente simultaneamente ou sequencialmente. Em implementações onde o primeiro cátion é cálcio e o primeiro ânion é sulfeto, introdução do sulfeto no meio antes da introdução do cálcio no meio pode aumentar a precipitação de impurezas (Exemplo 2). As concentrações do primeiro cátion e do primeiro ânion podem ser substancialmente iguais ou diferentes (ricas em cátion ou rico em ânion). Por exemplo, a concentração de um íon pode ser cerca de 1,5 vez, cerca de duas vezes, cerca de três vezes, cerca de quatro vezes ou cerca de 5 vezes maior do que a concentração do outro íon. Em algumas implementações, mais de um cátion e/ou mais de um ânion é introduzido no meio. A concentração total de cátions pode variar de a partir de cerca de 5 milimolares a cerca de 200 milimolares, como pode a concentração total dos ânions. Onde soluções poliméricas forem usadas, a concentração, em mM, pode ser substancialmente menor com base no peso molecular do polímero; a concentração pode ao invés depender do peso molecular do monômero. Em outras implementações, apenas um ou mais cátions ou apenas um ou mais ânions é/são introduzidos no meio. Por exemplo, quando o meio contendo a proteína já inclui ânion(s) ou cátion(s) capaz(es) de formar um precipitado, então o(s) cátion ou ânion(s) apropriado(s), respectivamente, pode(m) ser adicionado(s) para formar o precipitado. Alternativamente, íons podem ser adicionados para reagir com os íons já no meio para formar um primeiro precipitado, e combinação(ões) de cátion/ânion adicional(ais) pode(m) ser adicionada(s) no meio para formar outro(s) precipitado(s).

Conforme mostrado na FIGURA 1, o método pode incluir opcionalmente titulação do meio para um pH apropriado e/ou ajuste da temperatura (etapa 34).

Em algumas modalidades, o pH do meio pode ser ajustado para um pH predeterminado para aumentar precipitação (etapa 34). O pH do meio pode ser aumentado ou diminuído, por exemplo, através de titulação com uma base (por exemplo, NaOH) ou um ácido, tal como ácido fosfórico ou ácido clorídrico. O pH predeterminado pode ser uma função do(s), por exemplo, cátion(s) e ânion(s) no meio, outros materiais no meio e/ou a composição do meio. O pH predeterminado pode variar de a partir de cerca de cinco a cerca de nove, por exemplo, de a partir de cerca de 6,5 a cerca de 9.

Em outras modalidades, o pH do meio não é ajustado.

Em algumas modalidades, o meio pode ser aquecido ou esfriado para otimizar o desempenho (etapa 34). Como com ajuste do pH, a temperatura e o tempo pelos quais o meio é aquecido ou incubado podem ser uma função do(s), por exemplo, cátion(s) e ânion(s) no meio, outros materiais no meio e/ou a composição do meio.

O meio pode ser incubado em temperatura ambiente ou aquecido até, por exemplo, cerca de 37°C. O período de incubação ou aquecimento (etapa 36) pode variar de a partir de cerca de uma hora a cerca de doze horas. Enquanto o meio está incubando ou aquecendo, o meio pode ser misturado (por exemplo, em baixas velocidades para reduzir cisalhamento dos materiais), ou o meio pode ser misturado por um período de tempo inicial e deixado sedimentar sem mistura de modo que o precipitado possa sedimentar, o que permite que o sobrenadante contendo proteína seja facilmente separado.

Em outras modalidades, o meio não é aquecido, por exemplo, se precipitação for suficiente para prover boa separação.

Em seguida, o meio é centrifugado (etapa 38) para ajudar a separar o precipitado do sobrenadante, que reduz a turvação do sobrenadante. Outros métodos de remoção de sólidos são possíveis, tal como filtração com profundidade ou microfiltração. Conforme ilustrado abaixo nos exemplos, a turvação do meio pode ser reduzida em pelo menos cerca de 30% com relação a uma solução controle não-tratada, onde nenhuma floculação aconteceu. Em algumas implementações, a turvação do meio é reduzida em

5 pelo menos cerca de 50%, pelo menos cerca de 80%, pelo menos cerca de 90%, pelo menos cerca de 95% ou pelo menos cerca de 98% ou mais. Conforme aqui usado, a turvação é medida usando um nefalômetro (tal como aqueles feitos pela HACH, Loveland, CO) de acordo com procedimentos padrão.

10 Após clarificação primária tal como através de centrifugação, remoção de restos adicionais pode acontecer através do uso de filtração (etapa 38). Conforme ilustrado abaixo nos exemplos, os métodos de separação descritos aqui podem prover rendimentos altos, com uma recuperação de proteína de pelo menos cerca de 50% (tal como pelo menos cerca de 60%, pelo menos cerca de 70%, pelo menos cerca de 80% ou pelo menos cerca de 90%). Conforme aqui usado, a recuperação é calculada como a massa da proteína alvo no grupo pós-tratado para a massa no grupo pré-tratamento. A massa de produto é o produto da concentração de proteína 15 alvo e volume onde concentração pode ser determinada através de uma variedade de métodos, tal como ensaios de cromatografia líquida de alto desempenho. Para proteínas alvo que são anticorpos, concentração pode ser freqüentemente determinada usando métodos de análise baseados em proteína A. Aqueles de habilidade na técnica de cultura de célula farmacêutica, 20 purificação ou metodologias de caracterização de proteína podem identificar métodos de ensaio adequados.

A proteína pode ser subsequente purificada, de acordo com métodos convencionais.

Proteínas ou Polipeptídeos

25 A presente invenção refere-se à separação de proteínas, por exemplo, proteínas solúveis ou secretadas, de um fluido. O termo "proteína", conforme aqui usado, refere-se a um ou mais polipeptídeos que podem funcionar como uma unidade. O termo "polipeptídeo" conforme aqui usado refere-se a uma cadeia seqüencial de aminoácidos ligados juntos através de 30 ligações peptídeo. O termo "polipeptídeo" é usado para se referir a uma cadeia de aminoácido de qualquer comprimento, mas uma pessoa de habilidade comum na técnica vai compreender que o termo não é limitado a cadeias

compridas e pode se referir a uma cadeia mínima compreendendo dois aminoácidos ligados juntos através de uma ligação peptídica. Se um único polipeptídeo puder funcionar como uma unidade, os termos "polipeptídeo" e "proteína" podem ser usados intercomutavelmente.

5 Em certas modalidades, as proteínas são produzidas recombinantemente. Os termos "proteína recombinantemente expressa" e "proteína recombinante" conforme aqui usados referem-se a um polipeptídeo expresso a partir de uma célula hospedeira que foi manipulada pela mão do homem para expressar este polipeptídeo. Em certas modalidades, a célula hospedeira é uma célula de mamífero. Em certas modalidades, esta manipulação pode compreender uma ou mais modificações genéticas. Por exemplo, as células hospedeiras podem ser geneticamente modificadas pela introdução de um ou mais genes heterólogos codificando o polipeptídeo a ser expresso. O polipeptídeo heterólogo recombinantemente expresso pode ser idêntico ou similar a polipeptídeos que são normalmente expressos na célula hospedeira. O polipeptídeo heterólogo recombinantemente expresso pode ser também estranho para a célula hospedeira, por exemplo, heterólogo para polipeptídeos normalmente expressos na célula hospedeira. Em certas modalidades, o polipeptídeo heterólogo recombinantemente expresso é quimérico. Por exemplo, porções de um polipeptídeo podem conter seqüências de aminoácido que são idênticas ou similares a polipeptídeos normalmente expressos na célula hospedeira, enquanto outras porções contêm seqüências de aminoácido que são estranhas para a célula hospedeira. Adicionalmente ou alternativamente, um polipeptídeo pode conter seqüências de aminoácido de a dois ou mais polipeptídeos diferentes que são ambos normalmente expressos na célula hospedeira. Ainda, um polipeptídeo pode conter seqüências de aminoácido de dois ou mais polipeptídeos que são ambos estranhos para a célula hospedeira. Em algumas modalidades, a célula hospedeira é geneticamente modificada pela ativação ou supra-regulação de um ou mais genes endógenos.

Qualquer proteína que possa desejavelmente ser separada de acordo com a presente invenção será freqüentemente selecionada com base

em uma atividade biológica ou química interessante ou útil. Por exemplo, a presente invenção pode ser empregada para separar qualquer anticorpo, receptor, citocina, fator de crescimento, enzima, fator de coagulação, hormônio, fator regulador, antígeno, agente de ligação, farmacologicamente ou comercialmente relevante, dentre outros. A lista de proteínas que segue que podem ser separadas de acordo com a presente invenção é meramente exemplar em natureza, e não pretende ser uma citação limitante. Uma pessoa de habilidade comum na técnica vai compreender que qualquer proteína pode ser expressa de acordo com a presente invenção e será capaz de selecionar a proteína particular a ser produzida com base conforme necessário.

Anticorpos e Fragmentos de Ligação

Anticorpos, também conhecidos como imunoglobulinas, são tipicamente proteínas glicosiladas tetraméricas compostas de duas cadeias leves (L) de aproximadamente 25 kDa cada uma e duas cadeias pesadas (H) de aproximadamente 50 kDa cada uma. Dois tipos de cadeia leve, chamadas lambda e kappa, podem ser encontrados em anticorpos. Dependendo da sequência de aminoácido do domínio constante de cadeias pesadas, imunoglobulinas podem ser atribuídas a cinco classes principais: A, D, E, G e M, e várias dessas podem ser divididas mais em subclasses (isótipos), por exemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2. Cada cadeia leve inclui um domínio variável (V) N-terminal (VL) e um domínio (C) constante (CL). Cada cadeia pesada inclui um domínio (V) N-terminal (VH), três ou quatro domínios C (CHs) e uma região de impedimento. O domínio CH mais próximo de VH é designado CH1. Os domínios VH e VL consistem em quatro regiões de sequências relativamente conservadas chamadas regiões de estrutura principal (FR1, FR2, FR3 e FR4), que formam um "scaffold" para três regiões de sequências hipervariáveis (regiões de determinação de complementaridade, CDRs). As CDRs contêm a maioria dos resíduos responsáveis pelas interações específicas do anticorpo com o antígeno. CDRs são referidas como CDR1, CDR2 e CDR3. Deste modo, constituintes de CDR na cadeia pesada são referidos como H1, H2 e H3, enquanto constituintes de CDR na cadeia leve são referidos como L1, L2 e L3. CDR3 é tipicamente a fonte maior de

diversidade molecular dentro do sítio de ligação de anticorpo. H3, por exemplo, pode ser tão curta quanto dois resíduos de aminoácido ou maior do que 26 aminoácidos. As estruturas de subunidade e configurações tridimensionais de classes diferentes de imunoglobulinas são bem conhecidas na técnica. Para uma revisão da estrutura de anticorpo vide *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Eds. Harlow e outros, 1988. Uma pessoa de habilidade na técnica vai reconhecer que cada estrutura de subunidade, por exemplo, uma estrutura CH, VH, CL, VL, CDR, FR, compreende fragmentos ativos, por exemplo, a porção da subunidade VH, VL ou CDR que se liga ao antígeno, isto é, o fragmento de ligação de antígeno, ou, por exemplo, a porção da subunidade CH que se liga a e/ou ativa, por exemplo, um receptor Fc e/ou complemento. As CDRs tipicamente referem-se às CDRs Kabat, conforme descrito em *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, US Department of Health and Human Services (1991), Eds. Kabat e outros. Outro padrão para caracterização do sítio de ligação de antígeno é referir-se às alças hipervariáveis conforme descrito por Chothia. Vide, por exemplo, Chothia, D. e outros (1992) *J. Mol. Biol.*, 227:799-817; e Tomlinson e outros (1995) *EMBO J.*, 14:4628-4638. Ainda outro padrão é a definição de AbM usada pelo *Oxford Molecular's AbM antibody modelling software*. Vide, geralmente, por exemplo, *Protein Sequence and Structure Analysis of Antibody Variable Domains*. Em: *Antibody Engineering Lab Manual* (Ed.: Duebel, S. e Kontermann, R., Springer-Verlag, Heidelberg). Modalidades descritas com relação a CDRs Kabat podem ser alternativamente implementadas usando relações descritas similares com relação alças hipervariáveis de Chothia ou às alças definidas por AbM.

Conforme aqui usado, o termo "anticorpo" inclui uma proteína compreendendo pelo menos um, tipicamente dois, domínios VH ou porções dele e/ou pelo menos um, e tipicamente dois, domínios VL ou porções dele. Em uma modalidade, o anticorpo é um tetrâmero de duas cadeias de imunoglobulina pesadas e duas cadeias de imunoglobulina leves, onde as cadeias de imunoglobulina pesadas e leves são interconectadas através de, por exemplo, ligações dissulfeto. Os anticorpos, ou porções deles, podem ser ob-

5 tidos a partir de uma origem, incluindo, mas não limitado a, roedor, primata (por exemplo, primata humano ou não-humano), camelídeo (por exemplo, camelo ou lhama), bem como recombinantemente produzidos, por exemplo, quiméricos, humanizados e/ou gerados *in vitro*, conforme descrito em mais detalhes aqui.

Exemplos de fragmentos de ligação compreendidos no termo "fragmento de ligação de antígeno" de um anticorpo incluem (i) um fragmento Fab, um fragmento monovalente consistindo nos domínios VL, VH, CL e CH1; (ii) um fragmento F(ab')₂, um fragmento bivalente compreendendo dois
10 fragmentos Fab ligados por uma ponte dissulfeto na região de impedimento; (iii) um fragmento Fd consistindo nos domínios VH e CH1; (iv) um fragmento Fv consistindo nos domínios VL e VH de um braço único de um anticorpo, (v) um fragmento dAb, que consiste em um domínio VH; (vi) um domínio variável camelídeo ou camelizado; (vii) um Fv de cadeia simples (scFv); e (viii)
15 um anticorpo biespecífico. Ainda, embora os dois domínios do fragmento Fv, VL e VH sejam codificados por genes separados, eles podem ser unidos, usando métodos recombinantes, por um ligante sintético que permite que eles sejam feitos como uma cadeia de proteína única onde as regiões VL e VH emparelham para formar moléculas monovalentes (conhecidas como Fv
20 de cadeia simples (scFv), vide, por exemplo, Bird e outros (1988) *Science* 242:423-26; Huston e outros (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85:5879-83). Tais anticorpos de cadeia simples pretendem também ser compreendidos no termo "fragmento de ligação de antígeno" de um anticorpo. Esses fragmentos são obtidos usando técnicas convencionais conhecidas daqueles
25 de habilidade na técnica, e os fragmentos são avaliados quanto à função da mesma maneira que são os anticorpos intactos.

O fragmento de ligação de antígeno pode, opcionalmente, incluir uma porção que aumenta um ou mais de, por exemplo, estabilidade, função de célula efetora ou fixação de complemento. Por exemplo, o fragmento de
30 ligação de antígeno pode incluir uma porção peguilada, albumina ou uma região constante de cadeia pesada e/ou leve (ou uma porção da mesma).

Exceto por anticorpos "biespecíficos" ou "bifuncionais", um anticorpo é compreendido ter cada um de seus sítios de ligação idênticos. Um "anticorpo biespecífico" ou "bifuncional", ou um fragmento de ligação de antígeno do mesmo, é um anticorpo híbrido artificial ou fragmento dele tendo
5 dois sítios de ligação de antígeno diferentes. Anticorpos biespecíficos, ou fragmentos de ligação de antígeno dos mesmos, podem ser produzidos através de uma variedade de métodos incluindo fusão de hibridomas, ligação de fragmentos Fab', ou recombinantemente. Vide, por exemplo, Songsvilai & Lanchman, *Clin. Exp. Immunol.* 79:315-321 (1990); Kostelny e outros, *J. Immunol.*, 148, 1547-1553 (1992).
10

Vários métodos conhecidos daqueles versados na técnica estão disponíveis para obtenção de anticorpos ou fragmentos de ligação de antígeno deles. Por exemplo, anticorpos monoclonais podem ser produzidos através de geração de hibridomas de acordo com métodos conhecidos. Hibridomas formados desta maneira são então avaliados usando métodos padrão, tal como ensaio imunoabsorvente ligado à enzima (ELISA) e ressonância de plasmon de superfície (Biacore®), para identificar um ou mais hibridomas que produzem um anticorpo que se liga especificamente com um antígeno específico. Qualquer forma do antígeno especificado pode ser usada como o imunógeno, por exemplo, antígeno recombinante, formas de ocorrência natural, quaisquer variantes ou fragmentos dele, bem como peptídeo antigênico dele.
15
20

Um método exemplar de fabricação de anticorpos inclui avaliação de bibliotecas de expressão de proteína, por exemplo, bibliotecas de mostra de fago ou ribossoma. Mostra de fago é descrita, por exemplo, em Ladner e outros, Patente U.S. Nº 5.223.409; Smith (1985) *Science* 228:1315-1317; WO 92/18619; WO 91/17271; WO 92/20791; WO 92/15679; WO 93/01288; WO 92/01047; WO 92/09690; e WO 90/02809.
25

Em adição ao uso de bibliotecas de fago, o antígeno especificado pode ser usado para imunizar um animal não-humano, por exemplo, um roedor, por exemplo, um camundongo, hamster ou rato. Em uma modalidade, o animal não-humano inclui pelo menos uma parte de um gene de imuno-
30

globulina humano. Por exemplo, é possível engenheirar linhagens de camundongo deficientes em produção de anticorpo de camundongo com fragmentos grandes dos *loci* Ig humanos. Usando a tecnologia de hibridoma, anticorpos monoclonais específicos de antígeno derivados dos genes com a especificidade desejada podem ser produzidos e selecionados. Vide, por exemplo, XENOMOUSE[®], Green e outros (1994) *Nature Genetics* 7:13-21, US 2003-0070185, WO 96/34096, publicado em 31 de outubro de 1996 e Pedido de Patente PCT N^o PCT/US96/05928 depositado em 29 de abril de 1996.

10 Em outra modalidade, um anticorpo monoclonal é obtido de um animal não-humano e então modificado, por exemplo, humanizado, desimmunizado, quimérico, pode ser produzido usando técnicas de DNA recombinantes conhecidas no campo. Uma variedade de abordagens para fazer anticorpos quiméricos foi descrita. Vide, por exemplo, Morrison e outros, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 81:6851, 1985; Takeda e outros, *Nature* 314:452, 1985, Cabilly e outros, Patente U.S. N^o 4.816.567; Boss e outros, Patente U.S. N^o 4.816.397; Tanaguchi e outros, Publicação de Patente Européia EP171496; Publicação de Patente Européia 0173494, Patente do Reino Unido GB 2177096B. Anticorpos humanizados podem ser também produzidos, por exemplo, camundongos transgênicos que expressam genes de cadeias pesada e leve humanos, mas são incapazes de expressar os genes de cadeias pesada e leve de imunoglobulina de camundongo endógenos. Winter descreve um método de enxerto de CDR exemplar que pode ser usado para preparar os anticorpos humanizados descritos aqui (Patente U.S. N^o 5.225.539). Todas as CDRs de um anticorpo humano particular podem ser substituídas com pelo menos uma porção da CDR não-humana, ou apenas algumas das CDRs podem ser substituídas com CDRs não-humanas. É apenas necessário substituir o número de CDRs requerido para ligação do anticorpo humanizado para um antígeno predeterminado.

30 Anticorpos humanizados ou fragmentos deles podem ser gerados através de substituição das seqüências do domínio variável F_b que não estão diretamente envolvidas em ligação de antígeno com seqüências equiva-

lentes de domínios variáveis Fv humanos. Métodos exemplares para geração de anticorpos humanizados ou fragmentos deles são providos por Morrison (1985) *Science* 229:1202-1207; por Oi e outros (1986) *BioTechniques* 4:214; e pelas US 5.585.089; US 5.693.761; US 5.693.762; US 5.859.205; e 5 US 6.407.213. Esses métodos incluem isolamento, manipulação e expressão de seqüências de ácido nucléico que codificam todo ou parte dos domínios variáveis Fv de imunoglobulina de pelo menos uma de uma cadeia pesada ou leve. Tais ácidos nucléicos podem ser obtidos de um hibridoma produzindo um anticorpo contra um alvo predeterminado, conforme acima descrito, bem como de outras fontes. O DNA recombinante codificando a molécula de anticorpo humanizado pode então ser clonado em um vetor de expressão apropriado. 10

Em certas modalidades, um anticorpo humanizado é otimizado pela introdução de substituições conservativas, substituições de seqüência de consenso, substituições de linha germinativa e/ou retromutação (*backmutation*). Tais moléculas de imunoglobulina alteradas podem ser feitas através de qualquer uma de várias técnicas conhecidas no campo (por exemplo, Teng e outros, *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.*, 80:7308-7312, 1983; Kozbor e outros, *Immunology Today*, 4:7279, 1983; Olsson e outros, *Meth. Enzymol.*, 20 92:3-16, 1982) e podem ser feitas de acordo com os ensinamentos da Publicação PCT WO 92/06193 ou WO 0239400).

Um anticorpo ou fragmento dele pode ser também modificado através de deleção específica de epítomos de célula T ou "desimunização" através dos métodos descritos no WO 98/52976 e no WO 00/34317. Resumidamente, os domínios variáveis de cadeias pesada e leve de um anticorpo podem ser analisados quanto a peptídeos que se ligam à Classe II de MHC; esses peptídeos representam epítomos de célula T potenciais (conforme definido no WO 98/52976 e WO 00/34317). Para detecção de epítomos de célula T potenciais, uma abordagem de modelagem por computador chamada 25 "peptide threading" pode ser aplicada, e ainda um banco de dados de peptídeos de ligação de classe I de MHC humanos pode ser pesquisado quanto a motivos presentes nas seqüências VH e VL, conforme descrito no WO 30

98/52976 e no WO //034317. Esses motivos se ligam a qualquer um dos 18 principais alotipos de DR de classe II de MDR, e então constituem epítomos de célula T potenciais. Epítomos de célula T potenciais detectados podem ser eliminados substituindo números pequenos de resíduos de aminoácido nos domínios variáveis ou, de preferência, por substituição de aminoácido únicas. Tipicamente, substituições conservativas são feitas. Frequentemente, mas não exclusivamente, um aminoácido comum a uma posição em seqüências de anticorpo de linha germinativa humanas pode ser usado. Seqüências de linha germinativa humanas, por exemplo, são reveladas em Tomlinson e outros (1992) *J. Mol. Biol.*, 227:776-798; Cook, G.P. e outros (1995) *Immunol. Today* Vol. 16(5):237-242; Chothia, D. e outros (1992) *J. Mol. Biol.*, 227:799-817; e Tomlinson e outros (1995) *EMBO J.*, 14:4628-4638. O diretório V BASE provê um diretório compreensivo de seqüências de região variável de imunoglobulina humanas (compiladas por Tomlinson, I.A. e outros, MRC Centre for Protein Engineering, Cambridge, UK). Essas seqüências podem ser usadas como uma fonte de seqüência humana, por exemplo, para regiões de estrutura principal e CDRs. Regiões de estrutura principal humanas de consenso podem ser também usadas, por exemplo, conforme descrito na US 6.300.064.

Em certas modalidades, um anticorpo pode conter uma região constante ou Fc de imunoglobulina alterada. Por exemplo, um anticorpo produzido de acordo com os presentes ensinamentos pode se ligar mais fortemente ou com mais especificidade a moléculas efetoras tal como complementos e/ou receptores Fc, que podem controlar várias funções imunes do anticorpo tal como atividade de célula efetora, lise, atividade mediada por complemento, liberação de anticorpo e meia-vida de anticorpo. Receptores de Fc típicos que se ligam a uma região de Fc de um anticorpo (por exemplo, um anticorpo IgG) incluem, mas não estão limitados a, receptores das subclasses FcγRI, FcγRII e FcγRIII e FcRn, incluindo variantes alélicas e alternativamente formas unidas desses receptores. Receptores Fc são revis- tos em Ravetch e Kinet, *Annu. Rev. Immunol.*, 9:457-92, 1991; Capel e ou-

tros, *Immunomethods* 4:25-34, 1994; e de Haas e outros, *J. Lab. Clin. Med.*, 126:330-41, 1995).

Exemplos não-limitantes de anticorpos que podem ser separados através dos métodos da invenção incluem, mas não estão limitados a, anti-
 5 corpos contra A β , IL-13, IL-22I GDF8 e 5T4. Cada um desses anticorpos é descrito em mais detalhes abaixo e nos Exemplos apensos.

Anticorpos Anti-A β

Conforme descrito nos Exemplo apensos, anticorpos anti-AB podem ser separados através dos métodos da invenção. Os termos "anticorpo
 10 AB", "anticorpo A β ", "anticorpo anti-A β " e "anti-A β " são usados aqui intercambiavelmente para se referir a um anticorpo que se liga a um ou mais epítomos ou determinantes antigênicos de APP, proteína A β ou ambos. Epítomos ou determinantes antigênicos exemplares podem ser encontrados na proteína precursora amilóide humana (APP), mas são de preferência encontrados
 15 dentro do peptídeo A β de APP. Isoformas múltiplas de APP existem, por exemplo, APP⁶⁹⁵, APP⁷⁵¹ e APP⁷⁷⁰. Aminoácidos dentro de APP são de número designado de acordo com a seqüência da isoforma APP⁷⁷⁰ (vide, por exemplo, Nº de Acesso no GenBank P05067). Peptídeo A β (também referido aqui como peptídeo beta amilóide e A beta) é um fragmento interno de ~4
 20 kDa de 39-43 aminoácidos de APP (A β 39, A β 40, A β 41, A β 42 e A β 43). A β 40, por exemplo, consiste nos resíduos 672-711 de APP e A β 42 consiste nos resíduos 672-713 de APP. Como um resultado de processamento proteolítico de APP por enzimas secretases diferentes *in vivo* ou *in situ*, A β é encontrado em ambas uma "forma curta", 40 aminoácidos de comprimento, e uma "for-
 25 ma longa", variando de 42-43 aminoácidos de comprimento. Epítomos ou determinantes antigênicos podem estar localizados dentro do terminal N do peptídeo A β e incluem resíduos dentro dos aminoácidos 1-10 de A β , de preferência dos resíduos 1-3, 1-4, 1-5, 1-6, 1-7, 2-7, 3-6 ou 3-7 de A β 42 ou dentro dos resíduos 2-4, 5, 6, 7 ou 8 de A β , resíduos 3-5, 6, 7, 8 ou 9 de A β ou
 30 resíduos 4-7, 8, 9 ou 10 de A β 42. Epítomos "centrais" ou determinantes antigênicos estão localizados dentro da porção central ou média do peptídeo A β e incluem resíduos dentro dos aminoácidos 16-24, 16-23, 16-22, 16-21, 19-

21, 19-22, 19-23 ou 19-24 de A β . Epítomos "C-terminais" ou determinantes antigênicos estão localizados dentro do terminal C do peptídeo A β e incluem resíduos dentro dos aminoácido 33-40, 33-41 ou 33-42 de A β .

5 Em várias modalidades, um anticorpo A β é específico de extremidade. Conforme aqui usado, o termo "específico de extremidade" refere-se a um anticorpo que se liga especificamente aos resíduos N-terminais ou C-terminais de um peptídeo A β , mas que não reconhece os mesmos resíduos quando presente em uma espécie A β mais longa compreendendo os resíduos ou em APP.

10 Em várias modalidades, um anticorpo A β é "específico C-terminal". Conforme aqui usado, o termo "específico C-terminal" significa que o anticorpo reconhece especificamente um C-terminal livre de um peptídeo A β . Exemplos de anticorpos A β específicos C-terminais incluem aqueles que: reconhecem um peptídeo A β terminando no resíduo 40, mas não reconhece
15 um peptídeo A β terminando no resíduo 41, 42 e/ou 43; reconhece um peptídeo A β terminando no resíduo 42, mas não reconhece um peptídeo A β terminando no resíduo 40, 41 e/ou 43; etc.

Em uma modalidade, o anticorpo pode ser um anticorpo 3D6 ou variante dele ou um anticorpo 10D5 ou variante dele, ambos são aqui descritos na Publicação de Patente U.S. Nº 2003/0165496A1, Publicação de Patente U.S. Nº 2004/0087777A1, Publicação de Patente Internacional Nº WO02/46237A3. Descrição de 3D6 e 10D5 pode ser também encontrada, por exemplo, na Publicação de Patente Internacional Nº WO02/088306A2 e Publicação de Patente Internacional Nº WO02/088307A2. 3D6 é um anticorpo monoclonal (mAb) que se liga especificamente a um epítipo N-terminal localizado no peptídeo β -amilóide humano, especificamente, resíduos 1-5. Por comparação, 10D5 é um mAb que se liga especificamente a um epítipo N-terminal localizado no peptídeo β -amilóide humano, especificamente, resíduos 3-6. Em outra modalidade, o anticorpo pode ser um anticorpo 12B4
25 ou variante dele, conforme descrito na Publicação de Patente U.S. Nº 2004008276A1 e Publicação de Patente Internacional Nº WO03/077858A2. 12B4 é um mAb que se liga especificamente a um epítipo N-terminal locali-

zado no peptídeo β -amilóide humano, especificamente, resíduos 3-7. Em
ainda outra modalidade, o anticorpo pode ser um anticorpo 12A11 ou uma
variante dele, conforme descrito no Pedido de Patente U.S. Nº 10/858.855 e
Pedido de Patente Internacional Nº PCT/US04/17514. 12A11 é um mAb que
5 se liga especificamente a um epítipo N-terminal localizado no peptídeo β -
amilóide, especificamente, resíduos 3-7. Em ainda outra modalidade, o anti-
corpo pode ser um anticorpo 266 conforme descrito no Pedido de Patente
U.S. Nº 10/789.273 e Pedido de Patente Internacional Nº WO01/62801A2.
Anticorpos desenvolvidos para se ligar a epítopos C-terminais localizados no
10 peptídeo β -amilóide humano, para uso na presente invenção, incluem, mas
não estão limitados a, 369.2B, conforme descrito na Patente U.S. Nº
5.786.160.

Em modalidades exemplares, o anticorpo é um anticorpo 3D6 de
peptídeo anti A β humanizado que se liga seletivamente a peptídeo A β . Mais
15 especificamente, o anticorpo 3D6 de peptídeo anti A β humanizado é desen-
volvido para se ligar especificamente a um epítipo NH₂ terminal localizado
no peptídeo β -amilóide 1-40 ou 1-42 humano encontrado em depósitos de
placa no cérebro (por exemplo, em pacientes sofrendo de doença de Al-
zheimer).

20 Anticorpos anti-AB podem ser usados para tratar doenças amilo-
dogênicas, em particular doença de Alzheimer. O termo "doença amiloidogê-
nica" inclui qualquer doença associada com (ou causada pela) formação ou
deposição de fibrilas amilóides insolúveis. Doenças amiloidogênicas exem-
plares incluem, mas não estão limitadas a, amiloidose sistêmica, doença de
25 Alzheimer, diabetes de início na maturidade, doença de Parkinson, doença
de Huntington, demência fronto-temporal e as encefalopatias espongi-
formes transmissíveis relacionadas a prion (doença kuru e Creutzfeldt-Jacob em
humanos e scrapie e BSE em ovelha e gado, respectivamente). Doenças
amiloidogênicas diferentes são definidas ou caracterizadas pela natureza do
30 componente polipeptídeo das fibrilas depositadas. Por exemplo, em indiví-
duos ou pacientes tendo doença de Alzheimer, proteína β -amilóide (por e-
xemplo, proteína do tipo selvagem, variante ou β -amilóide truncada) é o

componente peptídeo caracterizante do depósito de amilóide. Deste modo, a doença de Alzheimer é um exemplo de uma "doença caracterizada por depósitos de A β " ou uma "doença associada com depósitos de A β ", por exemplo, no cérebro de um indivíduo ou paciente. Os termos "proteína β -amilóide", "peptídeo β -amilóide", " β -amilóide", "A β " e "peptídeo A β " são usados intercomutavelmente aqui.

Anticorpos anti-5T4

O antígeno 5T4 foi previamente caracterizado (vide, por exemplo, WO 89/07947). A seqüência de ácido nucléico integral de 5T4 humano é conhecida (Myers e outros (1994) *J. Biol. Chem.*, 169:9319-24 e GenBank em N $^{\circ}$ de Acesso Z29083). A seqüência para antígeno 5T4 de outra espécie é também conhecida, por exemplo 5T4 de murino (WO00/29428), 5T4 canino (Wo01/36486) ou 5T4 felino (US05/0100958).

5T4 humano é uma glicoproteína de cerca de 72 kDa expressa amplamente em carcinoma, mas tendo um padrão de expressão altamente restrito em tecidos adultos normais. Ele parece estar fortemente correlacionado com metástase em cânceres colorretal e gástrico. Expressão do antígeno 5T4 é também encontrada em alta freqüência em cânceres de mama e ovário (Starzynska e outros (1998) *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 10:479-84; Starzynska e outros (1994) *Br. J. Cancer* 69:899-902; Starzynska e outros (1992) *Br. J. Cancer* 66:867-9). 5T4 foi proposto como um marcador, com envolvimento mecanístico possível, para progressão de tumor e potencial de metástase (Carsberg e outros (1996) *Int. J. Cancer* 68:84-92). 5T4 foi também proposto para uso como um agente imunoterapêutico (vide WO00/29428). Peptídeos antigênicos de 5T4 são revelados na, por exemplo, US 05/0100958, cujos conteúdos são aqui incorporados a título de referência.

Vários pedidos pendentes se referem geralmente a ácidos nucléicos codificando o anticorpo monoclonal anti-5T4, vetores e células hospedeiras deles, por exemplo, Publicações de Pedido U.S. Nos. 2003/0018004 e 2005/0032216. Um pedido de patente provisório relacionados geralmente aos anticorpos monoclonais H8 anti-5T4 humanizados e

conjugados calicheamicina deles, bem como métodos de tratamento usando esses conjugados de calicheamicina, foi depositado (Publicação de Pedido U.S. Nº 2006/0088522). Os conteúdos de todos esses pedidos são aqui incorporados a título de referência em sua totalidade.

5 *Anticorpos anti-IL13*

Outros anticorpos exemplares que podem ser separados através dos métodos da invenção são anticorpos anti-IL13. Interleucina-13 (IL-13) é uma citocina previamente caracterizada secretada por linfócitos T e mastócitos (McKenzie e outros (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 90:3735-39; Bost e outros (1996) *Immunology* 87:663-41). O termo "IL-13" refere-se à interleucina-13, incluindo a forma precursora não-processada de comprimento completo de IL-13, bem como as formas maduras resultantes de clivagem pós-traducional. O termo também refere-se a qualquer fragmento e variantes de IL-13 que mantenham pelo menos algumas atividades biológicas associadas com IL-13 madura, incluindo seqüências que foram modificadas (por exemplo, recombinantemente modificadas). O termo "IL-13" inclui IL-13 humana, bem como outras espécies de vertebrado. Vários pedidos pendentes revelam anticorpos contra IL-13 humana e de macaco, peptídeos de IL-13, vetores e células hospedeiras produzindo os mesmos, por exemplo, Publicações de Pedido U.S. Nºs 2006/0063228A e 2006/0073148.

A IL-13 compartilha várias atividades biológicas com IL-4. Por exemplo, ou IL-4 ou IL-13 pode causar troca de isótipo IgE em células B (Tomkinson e outros (2001) *J. Immunol.*, 166:5792-5800). Adicionalmente, níveis aumentados de CD23 na superfície celular e CD23 no soro (sCD23) foram relatados em pacientes asmáticos (Sanchez-Guerrero e outros (1994) *Allergy* 49:587-92; DiLorenzo e outros (1999) *Allergy Asthma Proc.*, 20:119-25). Ainda, ou IL-4 ou IL-13 pode supra-regular a expressão de classe II de MHC e o receptor de IgE de baixa afinidade (CD23) em células B e monócitos, que resulta em apresentação de antígeno aumentada e função de macrófago regulada (Tomkinson e outros, *supra*). Essas observações sugerem que IL-13 pode ser uma peça importante no desenvolvimento de eosinofilia das vias aéreas e hiper-responsividade das vias aéreas (AHR) (Tomkinson

e outros, *supra*; Wills-Karp e outros (1998) *Science* 282:2258-61). Deste modo, inibição de IL-13 pode ser útil na melhora da patologia de várias condições inflamatórias e/ou alérgicas, incluindo, mas não limitado a, distúrbios respiratórios, por exemplo, asma; doença pulmonar obstrutiva crônica (COPD); outras condições envolvendo inflamação das vias aéreas, eosinofilia, fibrose e produção de muco em excesso, por exemplo, fibrose cística e fibrose pulmonar; distúrbios atópicos, por exemplo, dermatite atópica, urticária, eczema, rinite alérgica; condições inflamatórias e/ou auto-imunes da pele (por exemplo, dermatite atópica), órgãos gastrointestinais (por exemplo, doenças do intestino inflamatório (IBD), tal como colite ulcerativa e/ou doença de Crohn), fígado (por exemplo, cirrose, carcinoma hepatocelular); escleroderma; tumores ou cânceres (por exemplo, tumores de tecido mole ou sólidos), tal como leucemia, glioblastoma e linfoma, por exemplo, linfoma de Hodgkin; infecções virais (por exemplo, de HTLV-1), fibrose de outros órgãos, por exemplo, fibrose do fígado (por exemplo, fibrose causada por hepatite do vírus B e/ou C).

Anticorpos anti-IL22

Outros anticorpos exemplares que podem ser separados através dos métodos da invenção são anticorpos de IL-22. A interleucina-22 (IL-22) é uma citocina de classe II previamente caracterizada que mostra homologia de seqüência com IL-10. Sua expressão é supra-regulada em células T por IL-9 ou ConA (Dumoutier, L. e outros (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97(18):10144-9). Estudos mostraram que expressão de mRNA de IL-22 é induzida *in vivo* em resposta à administração de LPS, e que IL-22 modula parâmetros indicativos de uma resposta de fase aguda (Dumoutier L. e outros, (2000) *supra*; Pittman, D.I e outros (2001) *Genes and Immunity* 2:172), e que uma redução da atividade de IL-22 usando um anticorpo anti-IL-22 de neutralização melhora sintomas inflamatórios em um modelo de artrite induzida por colágeno em camundongo (CIA). Deste modo, agonistas de IL-22, por exemplo, anticorpo anti-IL-22 de neutralização e fragmentos deles, podem ser usados para induzir supressão imune *in vivo*, por exemplo, para tratamento de distúrbios auto-imunes (por exemplo, distúrbios artríticos tal

como artrite reumatóide); distúrbios respiratórios (por exemplo, asma, doença pulmonar obstrutiva crônica (COPD)); condições inflamatórias da, por exemplo, pele (por exemplo, psoríase), sistema cardiovascular (por exemplo, aterosclerose), sistema nervoso (por exemplo, doença de Alzheimer), rins (por exemplo, nefrite), fígado (por exemplo, hepatite) e pâncreas (por exemplo, pancreatite).

O termo "IL-22" refere-se à interleucina-22, incluindo forma precursora não-processada de comprimento complexo de IL-22, bem como as formas maduras resultantes de clivagem pós-traducional. O termo refere-se também a quaisquer fragmentos e variantes de IL-22 que mantenham pelo menos algumas atividades biológicas associadas com a IL-22 madura, incluindo seqüências que foram modificadas. O termo "IL-22" inclui IL-22 humana, bem como outras espécies de vertebrado. As seqüências de aminoácido e nucleotídeo de IL-22 humana e de roedor, bem como anticorpos contra IL-22, são reveladas nas, por exemplo, Publicações de Pedido de Patente U.S. N^{os} 2005-0042220 e 2005-0158760 e Patente U.S. N^o 6.939.545. Os conteúdos de todas essas publicações são aqui incorporados a título de referência em sua totalidade.

Anticorpos Anti-GDF8

Ainda outros anticorpos exemplares que podem ser separados através dos métodos da invenção são anticorpos anti-GDF8. Fator-8 de crescimento e diferenciação (GDF-8), também conhecido como miostatina, é uma proteína secretada e é um membro da superfamília de fator-beta de crescimento transformante (TGF- β) de fatores de crescimento estruturalmente relacionados, todos os quais possuem propriedades reguladoras do crescimento e morfogenéticas fisiologicamente importantes (Kingsley e outros, (1994) *Genes Dev.*, 8:133-146; Hoodless e outros (1998) *Curr. Topics Microbiol. Immunol.*, 228:235-272). Similarmente a TGF- β , GDF-8 humano é sintetizado como uma proteína precursora longa de 375 aminoácidos. A proteína GDF-8 precursora forma um homodímero. Durante o processamento o peptídeo amino-terminal é clivado em Arg-266. O peptídeo clivado, conhecido como o "peptídeo associado à latência" (LAP), pode permanecer não-

covalentemente ligado ao homodímero, deste modo inativando o complexo (Miyazono e outros (1988) *J. Biol. Chem.* 263:6407-6415; Wakefield e outros (1988) *J. Biol. Chem.* 263:7646-7654; Brown e outros (1990) *Growth Factors*, 3:35-43; e Thies e outros (2001) *Growth Factors*, 18:251-259). O complexo de GDF-8 maduro com pré-peptídeo é geralmente referido como o "complexo latente pequeno" (Gentry e outros, (1990) *Biochemistry*, 29:6851-6857; Derynck e outros (1995) *Nature*, 316:701-705; e Massague (1990) *Ann. Ver. Cell. Biol.*, 12:597-641). Outras proteínas são também conhecidas se ligar a GDF8- maduro e inibir sua atividade biológica. Tais proteínas inibidoras incluem folistatina e proteínas relacionadas com folistatina (Gamer e outros (1999) *Dev. Biol.*, 208:222-232).

O termo "GDF-8" refere-se a fator-8 de crescimento e diferenciação e, onde apropriado, fatores que são estruturalmente ou funcionalmente relacionados com GDF-8, por exemplo, BMP-11 e outros fatores pertencentes à superfamília TGF- β . O termo refere-se à forma precursora não-processada de comprimento completo de GDF-8, bem como as formas madura e pró-peptídeo resultante de clivagem pós-traducional. O termo refere-se também a quaisquer fragmentos e variantes de GDF-8 que mantêm pelo menos algumas atividades biológicas associadas com GDF-8 maduro, incluindo seqüências que foram modificadas. GDF-8 humano de seqüência de aminoácido, bem como muitas outras espécies de vertebrado (incluindo murino, babuíno, bovino, galinha) é revelado, por exemplo, nas US 2004-0142382, US 2002-1057125 e McPherron e outros (1997) *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, 94:12457-12461; conteúdos de todas são aqui incorporados a título de referência em sua totalidade). Exemplos de anticorpos de neutralização contra GDF-8 são revelados na, por exemplo, US 2004-0142382 e podem ser usados para tratar ou prevenir condições onde um aumento em tecido muscular ou densidade óssea é desejável. Doenças e distúrbios exemplares incluem distúrbios musculares e neuromusculares tal como distrofia muscular (incluindo distrofia muscular de Duchenne); esclerose amiotrófica lateral; atrofia muscular; atrofia de órgão; debilidade; síndrome do túnel; doença pulmonar obstrutiva congestiva; sarcopenia, caquexia e outras sín-

dromes de perda muscular; distúrbios do tecido adiposo (por exemplo, obesidade); diabetes tipo 2; tolerância à glicose prejudicada; síndromes metabólicas (por exemplo, síndrome X); resistência à insulina induzida por trauma tal como queimaduras ou desequilíbrio de nitrogênio; e doenças neurodegenerativas do osso (por exemplo, osteoartrite e osteoporose).

Receptores e Fusões de Receptor Solúveis

Em algumas modalidades, proteínas separadas através dos métodos da invenção podem ser receptores solúveis ou fragmentos deles. Exemplos de receptores solúveis incluem o domínio extracelular de um receptor, tal como receptores alfa e beta de fator de necrose de tumor solúvel (TNFR-1; EP 417.563 publicado em 20 de março de 1991; TNFR-2, EP 417.014 publicada em 20 de março de 1991; e revista em Naismith e Sprang, *J. Inflamm.* 47(1-2):1-7, 1995-96, cada um deles aqui incorporado a título de referência em sua totalidade. Em outras modalidades, o receptor solúvel inclui o domínio extracelular de receptor de interleucina-21 (IL-21R) conforme descrito na, por exemplo, US2003-0108549 (cujos conteúdos são aqui incorporados a título de referência).

Em outras modalidades, os métodos da invenção são usados para separar fusões de receptor solúveis. A proteína de fusão pode incluir uma porção de direcionamento, por exemplo, um fragmento de receptor ou um ligante solúvel, e uma cadeia de imunoglobulina, um fragmento Fc, regiões constantes de cadeia pesada de vários isótipos, incluindo: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA1, IgA2, IgD e IgE). Por exemplo, a proteína de fusão pode incluir o domínio extracelular de um receptor e, por exemplo, fundido a, uma cadeia Fc de imunoglobulina humana (por exemplo, IgG humana, por exemplo, IgG1 humana ou IgG4 humana, ou uma forma mutada dela). Em uma modalidade, a seqüência Fc humana foi mutada em um ou mais aminoácidos, por exemplo, nos resíduos 254 e 257 da seqüência do tipo selvagem para reduzir ligação de receptor Fc. As proteínas de fusão podem incluir adicionalmente uma seqüência ligante unindo a primeira porção à segunda porção, por exemplo, o fragmento de imunoglobulina. Por exemplo, a proteína de fusão pode incluir um ligante peptídeo, por exemplo, um ligante peptídeo

de cerca de 4 a 20, com mais preferência, 5 a 10, aminoácidos de comprimento; o ligante peptídeo é de 8 aminoácidos de comprimento. Por exemplo, a proteína de fusão pode incluir um ligante peptídeo tendo a fórmula (Ser-Gly-Gly-Gly-Gly)_y onde y é 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 ou 8. Em outras modalidades, seqüências de aminoácido adicionais podem ser adicionadas ao terminal N ou C da proteína de fusão para facilitar expressão, flexibilidade estérica, detecção e/ou isolamento ou purificação.

Em certas modalidades, a fusão de receptor solúvel compreende um TNFR-Ig solúvel (por exemplo, um fragmento solúvel de um receptor TNF, por exemplo, receptor TNF humano p55 ou p75 ou derivado dele, por exemplo, TNFR-IgG de 75 kd (por exemplo, receptor TNF de 75 kD fundido a uma porção Fc de IgG1 humano).

Uma proteína quimérica ou de fusão da invenção pode ser produzida através de técnicas de DNA recombinante padrão. Por exemplo, fragmentos de DNA codificando seqüências de polipeptídeo diferentes são ligados juntos em estrutura de acordo com técnicas convencionais, por exemplo, empregando terminais de extremidade cega ou extremidade irregular, digestão de enzima de restrição para prover terminais apropriados, enchimento de extremidades coesas conforme apropriado, tratamento com fosfatase alcalina para evitar união indesejável e ligação enzimática. Em outra modalidade, o gene de fusão pode ser sintetizado através de técnicas convencionais incluindo sintetizadores de DNA automatizados. Alternativamente, amplificação por PCR de fragmentos de gene pode ser realizada usando iniciadores âncora que dão origem a protuberâncias complementares entre dois fragmentos de gene consecutivos que podem ser subsequente-mente anelados e reamplificados para gerar uma seqüência de gene quimérico (vide, por exemplo, Ausubel e outros, (Eds.) *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, 1992). Além disso, muitos vetores de expressão estão comercialmente disponíveis que codificam uma porção de fusão (por exemplo, uma região Fc de uma cadeia pesada de imunoglobulina). Polipeptídeos de fusão de imunoglobulina são conhecidos na técnica e são descri-

tos nas, por exemplo, Patentes U.S. Nos. 5.516.964; 5.225.538; 5.428.130; 5.514.582; 5.714.147; e 5.455.165.

Fatores de Crescimento e Citocinas

5 Outra classe de polipeptídeo que foi mostrada ser eficaz como agentes farmacêuticos e/ou comerciais e que pode ser desejavelmente produzida de acordo com os ensinamentos da presente invenção inclui fatores de crescimento e outras moléculas de sinalização, tal como citocinas.

Fatores de crescimento são tipicamente glicoproteínas que são secretadas por células e se ligam a e ativam receptores em outras células, iniciando uma mudança metabólica ou desenvolvimental na célula receptora. Exemplos não-limitantes de fatores de crescimento de mamífero e outras moléculas de sinalização incluem citocinas; fator de crescimento epidermal (EGF); fator de crescimento derivado de plaqueta (PDGF); fatores de crescimento de fibroblasto (FGFs) tal como aFGF e bFGF; fatores de crescimento transformantes (TGFs) tal como TGF-alfa e TGF-beta, incluindo TGF-beta 1, TGF-beta 2, TGF-beta 3, TGF-beta 4 ou TGF-beta 5; fatores de crescimento tipo insulina-I e -II (IGF-I e IGF-II); des(1-3)-OGF-11 (IGF-I de cérebro), proteínas de ligação de fator de crescimento tipo insulina; proteínas CD tal como CD-3, CD-4, CD-8 e CD-19; eritropoietina; fatores osteoindutores; imunotoxinas; uma proteína morfogenética de osso (BMP); um interferon tal como interferon-alfa, -beta e -gama; fatores de estimulação de colônia (CSFs); por exemplo, M-CSF, GM-CSF e G-CSF; interleucinas (TLs), por exemplo, IL-1 a IL-13 (por exemplo, IL-11); fator de necrose de tumor (TNF) alfa e beta; cadeia A de insulina; cadeia B de insulina; pró-insulina; hormônio de estimulação de folículo; calcitonina; hormônio luteinizante; glucagon; fatores de coagulação tal como fator VIIIc, fator IX, fator de tecido e fator Von Willebrands; fatores anticoagulantes tal como Proteína C; fator natriurético atrial; tensoativo pulmonar; um ativador de plasminogênio, tal como urocina-se ou urina humana ou ativador de plasminogênio do tipo tecido (t-PA); bombesina; trombina, fator de crescimento hematopoiético; encefalinase; RANTES (célula T regulada sob ativação normalmente expressa e secreta-da); proteína inflamatória de macrófago humana (MIP-1-alfa); substância de

inibição mulleriana; cadeia A de relaxin; cadeia B de relaxin; pró-relaxin; peptídeo associado à gonadotropina de camundongo; fatores neurotróficos tal como fator neurotrófico derivado de osso (BDNF), neurotrofina-3, -4, -5 ou -6 (NT-3, NT-4, NT-5 ou NT-6) ou um fator de crescimento de nervo tal como NGF-beta. Um versado comum na técnica terá consciência de outros fatores ou moléculas de sinalização que podem ser expressos de acordo com métodos e composições da presente invenção.

Alterações específicas no padrão de glicosilação de fatores de crescimento ou outras moléculas de sinalização foram mostradas ter efeitos drásticos em suas propriedades terapêuticas. Como um exemplo, um método comum de tratamento para pacientes que sofrem de anemia crônica é provê-los com injeções freqüentes de eritropoietina humana recombinante (rHuEPO) a fim de reforçar sua produção de células vermelhas do sangue. Um análogo de rHuEPO, darbepoetina alfa (Anaresp[®]), foi desenvolvido para ter uma duração mais longa do que rHuEPO normal. A diferença primária entre darbepoetina e rHuEPO é a presença de duas cadeias de oligossacarídeo N-ligadas contendo ácido siálico extras. Produção de darbepoetina alfa foi realizada usando glicoengenharia *in vitro* (vide Elliott e outros, *Nature Biotechnology* 21(4):414-21, 2003, incorporado aqui a título de referência em sua totalidade). Elliott e outros usaram mutagênese *in vitro* para incorporar sítios de glicosilação extras na estrutura principal do polipeptídeo rHuEPO, resultando em expressão do análogo de darbepoetina alfa. As cadeias de oligossacarídeo extras estão localizadas distais do sítio de ligação de receptor EPO e aparentemente não interferem com ligação de receptor. No entanto, a meia-vida da darbepoetina alfa é até três vezes maior do que rHuEPO, resultando em um agente terapêutico muito mais eficaz.

Fatores de Coagulação

Fatores de coagulação foram mostrados ser eficazes como agentes farmacêuticos e/ou comerciais. Hemofilia B é um distúrbio onde o sangue de quem sofre é incapaz de coagular. Deste modo, qualquer ferimento pequeno que resulte em sangramento é potencialmente um evento ameaçador à vida. Por exemplo, Fator de Coagulação IX (Fator IX ou "FIX") é uma gli-

coproteína de cadeia única cuja deficiência resulta em Hemofilia B. A FIX é sintetizada como um zimógeno de cadeia única que pode ser ativado para uma serina protease de duas cadeias (Fator IXa) através da liberação de um peptídeo de ativação. O domínio catalítico de Fator IXa está localizado na

5 cadeia pesada (vide Chang e outros, *J. Clin. Invest.*, 100:4, 1997, incorporado aqui a título de referência em sua totalidade). FIX tem sítios de glicosilação múltiplos incluindo ambos carboidratos N-ligados e O-ligados. Uma estrutura O-ligada particular em Serina 61 (Sia- α 2,3-Gal- β 1, 4-GlcNAc- β 1,3-Fuc- α 1-O-Ser) foi uma vez imaginada ser única para FIX mas desde então

10 foi encontrada em algumas outras moléculas incluindo a proteína Notch em mamíferos e *Drosophila* (Maloney e outros, *Journal of Biol. Chem.*, 275(13), 2000). FIX produzida por células de Ovário de Hamster Chinês ("CHO") em cultura celular exibe alguma variabilidade na cadeia de oligossacarídeo Serina 61. Essas glicofomas diferentes e outras glicofomas potenciais podem

15 ter habilidades diferentes para induzir coagulação quando administradas a humanos ou animais e/ou podem ter estabilidades diferentes no sangue, resultando em coagulação menos eficaz.

A hemofilia A, que é clinicamente indistinguível da Hemofilia B, é causada por um defeito em fator VIII de coagulação humano, outra glicoproteína que é sintetizada como uma cadeia única e então processada em uma

20 forma ativa de duas cadeias. A presente invenção pode ser também empregada para controlar ou alterar o padrão de glicosilação de fator VIII de coagulação a fim de modular sua atividade de coagulação. Outros fatores de coagulação que podem ser produzidos de acordo com a presente invenção

25 incluem fator de tecido e fator Von Willebrands.

Enzimas

Outra classe de polipeptídeos que foi mostrada ser eficaz como agentes farmacêuticos e/ou comerciais e pode ser desejavelmente produzida de acordo com os ensinamentos da presente invenção incluem enzimas.

30 Enzimas podem ser glicoproteínas cujo padrão de glicosilação afeta a atividade enzimática. Deste modo, a presente invenção pode ser também usada para produzir enzimas em uma cultura de célula onde as enzimas produzi-

das têm um padrão de glicosilação mais extensivo ou de outro modo mais desejável.

Apenas como um exemplo não-limitante, uma deficiência em glucocerebrosidase (GCR) resulta em uma condição conhecida como doença de Gaucher, que é causada por um acúmulo de glucocerebrosidase em lisossomas de certas células. Indivíduos com doença de Gaucher exibem uma faixa de sintomas incluindo esplenomegalia, hepatomegalia, distúrbio esquelético, trombocitopenia e anemia. Friedman e Hayes mostraram que GCR recombinante (rGCR) contendo uma única substituição na seqüência de aminoácido primária exibiu um padrão de glicosilação alterado, especificamente um aumento em resíduos de fucose e N-acetil glicosamina comparado com GCR de ocorrência natural (vide Patente dos Estados Unidos Número 5.549.892).

Friedman e Hayes também demonstraram que esta rGCR exibiu propriedades farmacocinéticas aperfeiçoadas comparado com rGCR de ocorrência natural. Por exemplo, aproximadamente duas vezes mais rGCR se direcionaram às células Kupfer do fígado do que o fizeram GCR de ocorrência natural. Embora as seqüências de aminoácido primárias das duas proteínas diferissem em um único resíduo, Friedman e Hayes tomaram como hipótese que o padrão de glicosilação alterado de rGCR pode também influenciar o direcionamento a células Kupfer. Uma pessoa de habilidade comum na técnica terá consciência de outros exemplos conhecidos de enzimas que exibem propriedades enzimática, farmacocinética e/ou farmacodinâmicas alteradas resultante de uma alteração em seus padrões de glicosilação.

25 Produção de Proteína

Proteínas separadas através dos métodos da invenção podem ser produzidas recombinantemente usando técnicas bem conhecidas no campo. Seqüências de nucleotídeo codificando as proteínas são tipicamente inseridas em um vetor de expressão para introdução nas células hospedeiras que podem ser usadas para produzir a quantidade desejada de anticorpo modificado que, por sua vez, provê os polipeptídeos. O termo "vetor" inclui um construto de ácido nucléico freqüentemente incluindo um ácido nucléico,

por exemplo, um gene, e incluindo ainda elementos mínimos necessários para replicação, transcrição, estabilidade de ácido nucléico e/ou expressão ou secreção de proteína a partir de uma célula hospedeira. Tais construtos podem existir com elementos extracromossomais ou podem ser integrados ao genoma de uma célula hospedeira.

O termo "vetor de expressão" inclui um tipo específico de vetor onde o construto de ácido nucléico é otimizado para a expressão de alto nível de um produto de proteína desejado. Vetores de expressão freqüentemente têm agentes reguladores transcripcionais, tal como elementos promotores e aumentadores, otimizados para níveis altos de transcrição em tipos de célula específicos e/ou otimizados de modo que expressão é constitutiva com base no uso de um agente de indução específico. Vetores de expressão têm ainda seqüências que provêm tradução apropriada e/ou aumentada da proteína. Como conhecido daqueles versados na técnica, tais vetores podem ser facilmente selecionados do grupo consistindo em plasmídeos, fagos, vírus e retrovírus. O termo "cassete de expressão" inclui um construto de ácido nucléico contendo um gene e tendo elementos em adição ao gene que permitem expressão apropriada e/ou aumentada deste gene em uma célula hospedeira. Para produção de anticorpos, ácidos nucléicos codificando cadeias pesadas e leves podem ser inseridos em vetores de expressão. Tais seqüências podem estar presentes na mesma molécula de ácido nucléico (por exemplo, o mesmo vetor de expressão) ou, alternativamente, podem ser expressas a partir de moléculas de ácido nucléico separadas (por exemplo, vetores de expressão separados).

O termo "operavelmente ligado" inclui uma justaposição onde os componentes estão em uma relação permitindo que eles funcionem de sua maneira pretendida (por exemplo, funcionalmente ligados). Como um exemplo, um promotor/aumentador operavelmente ligado a um polinucleotídeo de interesse é ligado ao dito polinucleotídeo de modo que a expressão do polinucleotídeo de interesse é conseguida sob condições que ativam a expressão diretamente pelo promotor/aumentador.

Vetores de expressão são tipicamente replicáveis nos organismos hospedeiros ou como episômeros ou como uma parte integral do DNA cromossomal do hospedeiro. Geralmente, vetores de expressão contêm marcadores de seleção (por exemplo, resistência à ampicilina, resistência à higromicina, resistência à tetraciclina, resistência à canamicina ou resistência à neomicina) para permitir detecção daquelas células transformadas com as seqüências de DNA desejadas (por exemplo, vide Itakura e outros, Patente U.S. Nº 4.704.362). Em adição às seqüências de cassete de DNA de imunoglobulina, seqüências inertes e seqüências reguladoras, os vetores de expressão recombinantes da invenção podem carregar seqüências adicionais, tal como seqüências que regulam replicação do vetor em células hospedeiras (por exemplo, origens de replicação) e genes marcadores selecionáveis. O gene marcador selecionável facilita seleção de células hospedeiras onde o vetor foi introduzido (vide, por exemplo, Patentes U.S. Nos. 4.399.216, 4.634.665 e 5.179.017, todas de Axel e outros). Por exemplo, tipicamente o gene marcador selecionável confere resistência a fármaco, tal como G418, higromicina, ou metotrexato, em uma célula hospedeira na qual o vetor foi introduzido. Genes marcadores selecionáveis preferidos incluem o gene de diidrofolato redutase (DHFR) (para uso em células hospedeiras dhfr com seleção/amplificação de metotrexato) e o gene neo (para seleção de G418).

Uma vez o vetor tendo sido incorporado à célula hospedeira apropriada, a célula hospedeira é mantida sob condições adequadas para expressão de alto nível das seqüências de nucleotídeo e a coleta e purificação dos anticorpos desejados. Qualquer célula hospedeira suscetível à cultura de célula, e à expressão de proteínas ou polipeptídeos, pode ser utilizada de acordo com a presente invenção. Em certas modalidades, a célula hospedeira é mamífera. Exemplos não-limitantes de células de mamífero que podem ser usadas de acordo com a presente invenção incluem linhagem de mieloma de camundongo BALB/c (NOS/I, ECACC No: 85110503); retinoblastos humanos (PER.C6, CruCell, Leiden, Países Baixos); linhagem CV1 de rim de macaco transformada por SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651);

linhagem de rim embrionário humano (células 293 ou 293 subclonadas para crescimento em cultura de suspensão, Graham e outros, *J. Gen. Virol.*, 36:59, 1977); células de rim de hamster bebê (BHK, ATCC CCL 10); células de ovário de hamster Chinês +/- DHFR (CHO, Urlaub and Chasin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77:4216, 1980); células sertoli de camundongo (TM4, Mather, *Biol. Reprod.*, 23:243-251, 1980); células de rim de macaco (CV1 ATCC CL 70); células de rim de macaco verde Africano (VERO-76, ATCC CRL-587); células de carcinoma cervical humano (HeLa, ATCC CCL 2); células de rim canino (MDCK, ATCC CCL 34); células de fígado de rato buffalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442); células de pulmão humano (W138, ATCC CCL 75); células de fígado humano (Hep G2, HB 8065); tumor mamário de camundongo (MMT 060562, ATCC CCL51); células TR1 (Mather e outros, *Annals N.Y. Acad. Sci.*, 383:44-68, 1982); células MRC 5; células FS4; e uma linhagem de hepatoma humano (Hep G2).

Adicionalmente, qualquer número de linhagens de célula hibridoma comercialmente e não-comercialmente disponíveis que expressem polipeptídeos ou proteínas pode ser utilizado de acordo com a presente invenção. Um versado na técnica vai compreender que linhagens de célula de hibridoma podem ter necessidades de nutrição diferentes e/ou podem requerer condições de cultura diferentes para crescimento e expressão de polipeptídeo ou proteína ótimo, e serão capazes de modificar condições conforme necessário.

Vetores de expressão para essas células podem incluir seqüências de controle de expressão, tal como uma origem de replicação, um promotor e um aumentador (Queen e outros, *Immunol. Rev.*, 89:49 (1986)), e sítios de informação de processamento necessários, tal como sítios de ligação de ribossomo, sítios de união de RNA, sítios de poliadenilação e seqüências terminadoras transcricionais. Seqüências de controle de expressão preferidas são promotores derivados de genes de imunoglobulina, SV40, adenovírus, vírus papiloma bovino, citomegalovírus e similar. Vide, por exemplo, Co e outros (1992) *J. Immunol.* 148:1149. Seqüências reguladoras preferidas para expressão de célula hospedeira de mamífero incluem ele-

mentos virais que direcionam níveis altos de expressão de proteína em células de mamífero, tal como promotores e/ou aumentadores derivados de promotor FF-1A e BGH poli A, citomegalovírus (CMV) (tal como o promotor/aumentador de CMV), Vírus Símio 40 (SV40) (tal como o promotor/aumentador de SV40), adenovírus (por exemplo, o promotor tardio principal de adenovírus (AdMLP)) e polioma. Para descrição adicional de elementos reguladores virais, e seqüências deles, vide, por exemplo, Patente U.S. Nº 5.168.062 de Stinski, Patente U.S. Nº 4.510.245 de Bell e outros e Patente U.S. Nº 4.968.615 de Schaffner e outros. Em modalidades exemplares, os genes de cadeias pesada e leve de anticorpo são operativamente ligados para aumentar/promover elementos reguladores (por exemplo, derivados de SV40, CMV, adenovírus e similar, tal como aumentador de CMV/elemento regulador de promotor AdMLP ou um aumentador de SV40/elemento regulador de promotor AdMLP) para dirigir níveis altos de transcrição dos genes. Em modalidades exemplares da invenção, o construto inclui um sítio de entrada de ribossomo interno (IRES) para prover níveis relativamente altos de polipeptídeos da invenção em células hospedeiras eucarióticas. Seqüências de IRES compatíveis são reveladas na Patente U.S. Nº 6.193.980, que é também aqui incorporada.

Alternativamente, seqüências de codificação podem ser incorporadas em um transgene para introdução no genoma de um animal transgênico e subsequente expressão no leite do animal transgênico (vide, por exemplo, Deboer e outros, US 5.741.957, Rosen, US 5.304.489 e Meade e outros, US 5.849.992). Transgenes adequados incluem seqüências de codificação para cadeias pesadas e/ou leves em ligação operável com um promotor e aumentador de um gene específico de glândula mamária, tal como caseína ou beta lactoglobulina.

Células hospedeiras procarióticas podem ser também adequadas para produção dos anticorpos da invenção. *E. coli* é um hospedeiro procariótico particularmente útil para clonagem dos polinucleotídeos (por exemplo, seqüências de DNA) da presente invenção. Outros hospedeiros microbianos adequados para uso incluem bacilos, tal como *Bacillus subtilis*, *enterobacte-*

riaceae, tal como *Escherichia*, *Salmonella* e *Serratia*, e várias espécies *Pseudomonas*. Nesses hospedeiro procarióticos, uma pessoa pode também fazer vetores de expressão, que vão tipicamente conter seqüências de controle de expressão compatíveis com a célula hospedeira (por exemplo, uma
5 origem de replicação). Ainda, qualquer número de uma variedade de promotores bem conhecidos estará presente, tal como o sistema promotor de lactose, um sistema promotor de triptofano (*trp*), um sistema promotor de beta-lactamase ou um sistema promotor de fago lambda. Os promotores vão tipicamente controlar expressão, opcionalmente com uma seqüência operadora, e têm seqüências de sítio de ligação de ribossomo e similar, para inicia-
10 ção e término da transcrição e da tradução.

Expressão de proteínas em procariontes é mais freqüentemente realizada em *E. coli* com vetores contendo promotores constitutivos ou induzíveis direcionando a expressão de proteínas de fusão ou não-fusão. Veto-
15 res de fusão adicionam vários aminoácidos a um anticorpo codificado neles, freqüentemente à região constante do anticorpo recombinante, sem afetar especificidade ou reconhecimento de antígeno do anticorpo. Adição dos aminoácidos do peptídeo de fusão pode adicionar função adicional ao anticorpo, por exemplo, como um marcador (por exemplo, marcação de epítipo
20 tal como myc ou flag).

Outros micróbios, tal como levedura, são também úteis para expressão. *Saccharomyces* é um hospedeiro de levedura preferido, com vetores adequados tendo seqüências de controle de expressão (por exemplo, promotores), uma origem de replicação, seqüências de terminação e similar
25 conforme desejado. Promotores típicos incluem 3-fosfoglicerato cinase e outras enzimas glicolíticas. Promotores de levedura induzíveis incluem, dentre outros, promotores de álcool desidrogenase, isocitocroma C e enzimas responsáveis pela utilização de maltose e galactose.

Os vetores contendo as seqüências de polinucleotídeo de interesse (por exemplo, as seqüências de codificação de cadeias pesada e leve e seqüências de controle de expressão) podem ser transferidos para a célula hospedeira através de métodos bem conhecidos, que variam dependendo
30

do tipo de hospedeiro celular. Por exemplo, transfecção com cloreto de cálcio é geralmente utilizada para células procarióticas, enquanto tratamento com fosfato de cálcio, eletroporação, lipofecção, biolística ou transfecção com base viral pode ser usada para outros hospedeiros celulares. (Vide geralmente Sambrook e outros, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Press, 2ª Ed., 1989), incorporado aqui a título de referência em sua totalidade para todos os propósitos. Outros métodos usados para transformar células de mamífero incluem o uso de polibreno, fusão de protoplasto, lipossomas, eletroporação e microinjeção (vide geralmente, Sambrook e outros, *supra*). Para produção de animais transgênicos, transgenes podem ser microinjetados em oócitos fertilizados ou podem ser incorporados ao genoma de células tronco embrionárias, e os núcleos de tais células transferidos para oócitos enucleados.

Quando cadeias pesadas e leves são clonadas em vetores de expressão separados, os vetores são co-transfectados para se obter expressão e montagem de imunoglobulinas intactas. Uma vez expressos, os anticorpos integrais, seus dímeros, cadeias leves e pesadas individuais ou outras formas de imunoglobulina da presente invenção podem ser separados conforme aqui descrito e/ou purificados mais de acordo com procedimentos conhecidos na técnica, incluindo precipitação com sulfato de amônio, colunas de afinidade, cromatografia de coluna, purificação por HPLC, eletroforese de gel e similar (vide geralmente Scopes, *Protein Purification* (Springer-Verlag, N.Y. (1982)). Imunoglobulinas substancialmente puras de pelo menos cerca de 90 a 95% de homogeneidade são preferidas, e 98 a 99% ou mais homogeneidade mais preferida, para usos farmacêuticos.

Os exemplos que seguem são ilustrativos e não pretendem ser limitantes.

Exemplo 1

Floculação com vários cátions e ânions: Vários anticorpos monoclonais (mAb) (mostrados na Tabela 1) foram produzidos por células de Ovário de Hamster Chinês (CHO) cultivadas em meio livre de soro. Aproximadamente 50 mL do meio condicionado contendo célula foram separados em

alíquota em frascos Erlenmeyer de 125 mL (exceto o exemplo de fosfato de cálcio 30/20 com anti-GDF8 N^o 2 que tinha 400 mL em um frasco de 1000 mL e o exemplo de fosfato de cálcio 30/20 com anti-IL13 N^o 1 que tinha 1000 mL em um frasco de 2000 mL). HEPES foi adicionado a 40 mM para controle do pH. Uma solução concentrada de cátions de metal foi adicionada à solução para atingir uma concentração fixada final (vide Tabela 1) e misturada gentilmente. Uma solução concentrada de ânions foi adicionada à mistura (vide Tabela 1) para atingir a concentração de ânion final e misturada gentilmente (em alguns dos exemplos, indicado por um asterisco (*) na Tabela 1 abaixo, o ânion foi adicionado primeiro e o cátion segundo). O pH foi aumentado através da adição de NaOH ou diminuído pela adição de HCl para a faixa de pH fixado. Em muitos dos exemplos, o pH não precisou ser ajustado. A mistura foi deixada incubar em um agitador a 18-25°C por uma a quatro horas junto com controles negativos. Após a incubação, a mistura foi vertida em um tubo centrífuga de 50 mL. Cada mistura foi girada a 340 g por dez minutos. O sobrenadante clarificado foi separado em alíquota e a turbidez medida usando um nefalômetro (HACH, Loveland, CO). A turbidez resultante é relatada na Tabela 1 como uma redução percentual daquela do controle não-tratado. A concentração de anticorpo foi medida através de um método de HPLC de Proteína A geral para anticorpos. A recuperação conforme comparado com o controle não-tratado é relatada na Tabela 1.

Tabela 1: Resultados de floculação para os cátions de cálcio, magnésio, manganês, cobalto (II) e níquel. Todos os tratamentos foram realizados com a adição de cátion antes do ânion, exceto onde indicado por um asterisco (*), onde o ânion foi adicionado antes do cátion.

Ânion	Cálcio		pH	mAb	% de Redução de Turbidez	% de Recuperação de Produto
	Cátion/ Ânion	Concentrações				
(mM)	(M ²)					

Fosfato	20/20	4,0E-04	6,5	anti-AB Nº 1	65%	91%
Fosfato	40/40	1,6E-03	6,0	anti-AB Nº 1	89%	77%
Fosfato	80/80	6,4E-03	5,4	anti-AB Nº 1	95%	56%
Fosfato	40/40	1,6E-03	7	anti-AB Nº 1	73%	90%
Fosfato	40/40	1,6E-03	7,5	anti-AB Nº 1	74%	87%
Fosfato	20/20	4,0E-04	6,5	anti-AB Nº 1	82%	92%
Fosfato	20/20	4,0E-04	6,0	anti-AB Nº 1	53%	95%
Fosfato	40/40	1,6E-03	6,5	anti-AB Nº 1	96%	79%
Fosfato	40/40	1,6E-03	6,0	anti-AB Nº 1	96%	80%
Fosfato	10/10	1,0E-04	7	anti-AB Nº 1	42%	112%
Fosfato	20/20	4,0E-04	6,5	anti-AB Nº 1	81%	93%
Fosfato	20/20	4,0E-04	7,0	anti-AB Nº 1	81%	94%
Fosfato	20/20	4,0E-04	7,5	anti-AB Nº 1	86%	97%
Fosfato	20/40	8,0E-04	6,5	anti-AB Nº 1	68%	92%
Fosfato	20/40	8,0E-04	7,0	anti-AB Nº 1	67%	92%
Fosfato	20/40	8,0E-04	7,5	anti-AB Nº 1	61%	107%
Fosfato	40/20	8,0E-04	6,5	anti-AB Nº 1	98%	82%
Fosfato	40/20	8,0E-04	7,0	anti-AB Nº 1	98%	96%
Fosfato	40/20	8,0E-04	7,5	anti-AB Nº 1	98%	97%
Fosfato	40/40	1,6E-03	6,5	anti-AB Nº 1	92%	83%
Fosfato	40/40	1,6E-03	7,0	anti-AB Nº 1	89%	88%
Fosfato	40/40	1,6E-03	7,5	anti-AB Nº 1	88%	91%
Fosfato	20/13,3	2,7E-04	7,3	anti-AB Nº 1	68%	84%
Fosfato	50/33,3	1,7E-03	6,5-6,8	anti-AB Nº 1	96%	64%
Fosfato	20/13,3	2,7E-04	7,3	anti-GDF8 Nº 1	90%	91%
Fosfato	20/13,3	2,7E-04	8,9	anti-GDF8 Nº 1	68%	80%
Sulfeto*	50/33,3	1,7E-03	7,5	anti-GDF8 Nº 1	46%	94%
Fosfato*	30/20	6,0E-04	7,3	anti-AB Nº 1	96%	96%
Fosfato*	20/13,3	2,7E-04	7,2	anti-AB Nº 1	78%	94%

Sulfeto*	50/50	2,5E-03	7,6	anti-AB Nº 1	56%	91%
Carbonato*	50/50	2,5E-03	8,7	anti-AB Nº 1	79%	95%
Fluoreto*	50/10	5,0E-04	7,5	anti-AB Nº 1	93%	84%
Silicato*	50/50	2,5E-03	9,2	anti-GDF8 Nº 1	88%	90%
Molibdato*	50/50	2,5E-03	8,0	anti-GDF8 Nº 1	30%	95%
Fosfato*	30/20	6,0E-04	7,0-7,5	anti-AB Nº 1	83%	91%
Fosfato*	30/20	6,0E-04	7,0-7,5	anti-AB No.2	93%	100%
Fosfato*	30/20	6,0E-04	7,0-7,5	anti-GDF8 Nº 1	80%	99%
Fosfato*	30/20	6,0E-04	7,0-7,5	anti-IL 13 No.2	93%	94%
Fosfato*	30/20	6,0E-04	7,0-7,5	anti-IL 13 No.2	92%	93%
Fosfato*	30/20	6,0E-04	7,0-7,5	anti-IL 13 No.2	94%	97%
Fosfato*	30/20	6,0E-04	7,0-7,5	anti-IL 13 No.2	89%	96%
Fosfato*	30/20	6,0E-04	7,0-7,5	anti-IL 13 No.2	93%	94%
Fosfato*	30/20	6,0E-04	7,0-7,5	anti-IL 13 No.2	95%	96%
Fosfato*	30/20	6,0E-04	7,0-7,5	anti-IL22	97%	100%
Fosfato*	24/16	3,8E-04	7,0-7,5	anti-AB Nº 1	84%	93%
Fosfato*	24/16	3,8E-04	7,0-7,5	anti-IL22	95%	102%
Fosfato*	24/16	3,8E-04	7,0-7,5	anti-AB Nº 1	83%	95%
Fosfato*	24/16	3,8E-04	7,0-7,5	anti-IL 13 Nº 1	93%	94%
Fosfato*	40/20	8,0E-04	7,0-7,5	anti-IL 13 No.2	96%	85%
Fosfato*	80/20	1,6E-03	6,5-6,7	anti-AB Nº 1	98%	62%
Fosfato*	30/20	6,0E-04	7,0-7,5	anti-GDF8 No.2	92%	97%
Fosfato*	30/20	6,0E-04	7,0-7,5	anti-IL 13 Nº 1	98%	97%

Magnésio

Produto de

Ânion	Cáti- on/Ânion Concentrações		pH	mAb	% de Re- dução de	% de Recupera- ção de
	(mM)	(M ²)			Turbidez	Produto
Carbonato	200/133	2,7E-02	9	anti-AB Nº 1	70%	100%
Fosfato	200/133	2,7E-02	8	anti- GDF8 Nº 1	77%	95%
Fosfato	200/133	2,7E-02	9	anti- GDF8 Nº 1	77%	90%
Fluoreto*	50/10	5,0E-04	7,4	anti-AB Nº 1	97%	89%
Fosfato*	50/33,3	1,7E-03	8	anti-AB Nº 1	54%	91%
Fosfato*	100/96,7	6,7E-03	8	anti-AB Nº 1	43%	88%

Manganês (II)

Produto de

Ânion	Cátion/ Ânion (mM)	Concentrações		pH	mAb	% de Re-	% de Recupera-
		(M ²)				dução de	ção de
						Turbidez	Produto
Fosfato	20/13,3	2,7E-04		6,9	anti-AB N ^o 1	79%	99%
Carbona- to	20/13,3	2,7E-04		7,4	anti-AB N ^o 1	59%	96%
Fosfato	20/13,3	2,7E-04		7,2	anti-GDF8 N ^o 1	81%	85%

Cobalto (II)

Produto de

Ânion	Cátion/ Ânion (mM)	Concentrações		pH	mAb	% de Re-	% de Re-Recupe-
		(M ²)				dução de	ração de
						Turbidez	Produto
Fosfato*	30/20	6,0E-04		7,1	anti-AB N ^o 1	78%	74%

Níquel

Produto de

Ânion	Cátion/ Ânion (mM)	Concentrações		pH	mAb	% de Re-	% de Re-Recupe-
		(M ²)				dução de	ração de
						Turbidez	Produto
Fosfato	20/13,3	2,7E-04		8	anti-GDF8 N ^o 1	58%	63%
Carbona- to	20/13,3	2,7E-04		8	anti-GDF8 N ^o 1	42%	62%

Os níveis residuais de cálcio e fosfato nos sobrenadantes de algumas amostras foram medidos. Resíduos de cálcio foram medidos usando um BioAssay Systems QuantiChrom[®] Calcium Assay Kit (DICA-500). Resíduos de fosfato foram medidos usando um BioAssay Systems Malachite Green Phosphate Assay Kit (POMG-25H). Na amostra anti-IL13 N^o 2 com 40 mM de cálcio e 20 mM de fosfato na Tabela 1, o sobrenadante após centrifugação continha 8,19 mM de cálcio e 1,04 mM de fosfato. Este nível de cálcio e fosfato solúveis se traduz em uma K_{sp} de $8,5 \times 10^{-6} M^2$. Na amostra anti-AB N^o 1 com 80 mM de cálcio e 20 mM de fosfato na Tabela 1, o sobrenadante após centrifugação continha 22,2 mM de cálcio e 0,4 mM de fosfato. Este nível de cálcio solúvel e fosfato solúvel se traduz em uma K_{sp} de $8,4 \times 10^{-6} M^2$.

Exemplo 2

Efeito da ordem da adição de ânion/cátion: um mAb, anti-GDF8 N^o 1 foi produzido por células CHO recombinantes cultivadas em meio livre de soro. Aproximadamente 50 mL do meio condicionado contendo células foram separados em alíquota em frascos Erlenmeyer de 3x125 mL, A, B e C. A amostra A foi deixada não-tratada e serviu como um controle negativo. HEPES foi adicionado a 40 mM para controlar o pH nas Amostras B e C. Cloreto de cálcio a 5 M foi adicionado à Amostra B para uma concentração de 50 mM; após mistura suave, sulfeto de sódio a 0,5M foi adicionado para uma concentração de 33,3 mM. Para Amostra C, a ordem de adição foi revertida. Sulfeto de sódio a 0,5M foi adicionado para uma concentração de 33,3 mM; após mistura suave, cloreto de cálcio a 5 M foi adicionado para uma concentração de 50 mM. Todas as três misturas tinham pHs entre 7,4 e 7,6. As misturas foram deixadas incubar em um agitador por uma hora a 18-25°C. Após a incubação, as misturas foram vertidas em tubos de centrifuga de 50 mL. Cada mistura foi girada a 340 g por dez minutos. O sobrenadante clarificado foi removido e ensaiado quanto à concentração de anticorpo através de HPLC de Proteína A e quanto à turvação usando um nefalômetro.

Ambas amostras B e C tinham recuperações de anticorpo de 94% conforme comparado com amostra não-tratada. A Amostra B, com o cátion adicionado primeiro, mostra um aumento em turvação conforme com-

parado com a amostra não-tratada, indicando que um precipitado tinha se formado, mas que ele era muito pequeno para ser facilmente removido através de centrifugação. A Amostra C, com o ânion adicionado primeiro, mostrou uma redução de 46% na turvação conforme comparado com a amostra não-tratada, indicando que o precipitado que se formou era grande o suficiente para ser facilmente girado através de centrifugação. A redução na turvação também indica que alguma quantidade de restos celulares e/ou material coloidal foi ligada pelo precipitado e removida no pélete.

Exemplo 3

Um experimento de escala piloto usando cálcio e fosfato como precipitantes e os efeitos sobre etapas de clarificação e cromatografia a jusante: Um mAb, anti-AB Nº 1, foi produzido por células CHO recombinantes cultivadas em meio livre de soro em um biorreator de 500 L. No momento da coleta, a cultura foi trazida para temperatura ambiente (18-25°C). 350 L da cultura foram deixados não-tratados e serviram como um controle negativo. 150 L da cultura foram transferidos para uma bombona de 200L e lentamente misturados com um agitador no alto. Um tampão foi adicionado a 40 mM para controlar o pH. Fosfato de potássio a 2M foi então adicionado para uma concentração de 20 mM. Cloreto de cálcio a 5M foi então adicionado para uma concentração de 30 mM. O pH da mistura era 7,3. A cultura floculada foi incubada por 160 minutos enquanto misturando. No final da incubação o pH da mistura era 7,0.

Ambas culturas floculada e não-tratada foram processadas através de uma centrífuga de discos Alfa Laval BTPX 205 em uma taxa de fluxo de 4,4 L/min e uma velocidade de bacia de 7630 RPM (8000 g). A turvação de centrado de estado estacionário da amostra floculada era 14 NTU, conforme comparado com 117 NTU para amostra não-tratada, uma redução de 88% na turvação. A recuperação de título de anticorpo no centrado (*centrate*) floculado era 96% comparado com o centrado não-tratado. O nível de proteínas de célula hospedeira (HCP) no centrado floculado foi reduzido em 35% de 533.341 ppm para 348.087 ppm conforme comparado com o centrado não-tratado.

Ambos centrados flocculados e não-tratados foram processados através de Millipore A1HC Pad Filters para uma capacidade de 250 L de centrado por metro quadrado de filtro. A amostra não-tratada mostrou uma grande mudança de turvação uniforme, de 4 NTU a 24 L/m² para 26 NTU a 121 L/m² para 37 NTU a 254 L/m². A turvação do grupo de filtrado de almofada final para a amostra não-tratada era 21 NTU. A amostra flocculada mostrou apenas um pequeno aumento em turvação através das almofadas, de 2 NTU a 21 L/m² para 6 NTU a 150 L/m² para 7 NTU a 254 L/m². A turvação do grupo de filtrado de almofada final para a amostra flocculada era 5 NTU, uma redução de 76% na turvação conforme comparado com a amostra não-tratada.

Após filtração em almofada e filtração adicional através de um filtro de polimento de 0,2 µm, as amostras foram cromatografadas usando uma coluna de afinidade de Proteína A GE Healthcare MabSelect. Quando anticorpos são eluídos de colunas de Proteína A, os grupos de pico frequentemente são turvos, e que a turvação tipicamente aumenta quando o pico é neutralizado. O grupo de pico não-tratado tinha uma turvação de 10 NTU, e aumentou para 22 NTU quando da neutralização. O grupo de pico flocculado tinha uma turvação de 3 NTU, e aumentou para 8 NTU quando da neutralização, 63% menor do que o pico não-tratado.

Exemplo 4

Floculação com cálcio e fosfato resultando em turvação reduzida em ambos meio condicionado clarificado e no pico de Proteína A. Redução significativa de ambas impurezas relacionada com célula e relacionada com produto foi também conseguida.

Um mAb, anti-5T4, foi produzido por células CHO recombinantes cultivadas em meio livre de soro. Aproximadamente 3L de cultura foram deixados não-tratados e serviram como um controle negativo. Outros 3L da cultura foram transferidos para um recipiente de 4L. Um tampão foi adicionado a 40 mM para controlar o pH e gentilmente misturado a 18-24°C. Fosfato de potássio a 2M foi então adicionado a uma concentração de 20 mM e a solução misturada gentilmente. Cloreto de cálcio a 5M foi então adicionado para

uma concentração de 30 mM e a solução gentilmente misturada. O pH da mistura era 7,2. A cultura floculada foi transferida para três frascos Erlenmeyer de 2L e incubada por 2 horas, enquanto misturando. No final da incubação o pH da mistura era 7,0.

5 Uma amostra de 50 mL de ambas cultura floculada e cultura não-tratada foi agitada a 340 g por dez minutos. O sobrenadante clarificado foi removido e ensaiado quanto à concentração de anticorpo através de HPLC de Proteína A e quanto à turvação usando um nefalômetro. A recuperação total de material relacionado com produto era 78% conforme comparado com amostra não-tratada. A turvação da amostra não-tratada era 29 NTU. A turvação da amostra floculada era 2 NTU, uma redução de 93% na turvação conforme comparado com amostra não-tratada.

15 Ambas amostras floculada e não-tratada foram processadas através de Millipore A1HC Pad Filters. Após filtragem em almofada e filtragem adicionado em um filtro de polimento de 0,2 μm , as amostras foram cromatografadas usando uma coluna de afinidade de Proteína A GE Healthcare MabSelect. Como anticorpos eluem das colunas de Proteína A em altas concentrações, o material no ápice do pico de produto freqüentemente precipita, resultando em uma solução turva. O nível de precipitação no ápice do pico da amostra não-tratada, conforme medido através de absorbância a 600 nm em um espectrômetro, era 1,85AU. O nível de precipitação no ápice do pico da amostra floculada, conforme medido através de absorbância a 600 nm em um espectrômetro, era 0,03AU, uma redução de 98% em turvação comparado com a amostra não-tratada.

25 Quando anticorpos são eluídos das colunas de Proteína A, os grupos de pico são ocasionalmente turvos. Quando da neutralização, a turvação tipicamente aumenta significativamente entre pH 5,5 e pH 6,0, conforme material precipita e sai da solução. Alguns desses precipitados tendem a se tornar solúveis novamente conforme o pH é aumentado acima de 7. O grupo de pico não-tratado, com uma concentração de anticorpo de 8,1 mg/mL tinha uma turvação de 8,5 NTU quando eluído, aumentou para 839 NTU entre pH 5,5 e 6,0 e diminuiu para 53 NTU em pH 7,0. Quando da fil-

tragem em um filtro de grau de esterilização de 0,2 μm , a turvação foi apenas reduzida para 40 NTU.

O grupo de produto floculado eluiu da coluna em volume menor e então era mais concentrado. O grupo de pico floculado, com uma concentração de anticorpo de 15,1 mg/ml, tinha uma turvação de 5,6 NTU quando eluído, aumentou para 31 NTU entre pH 5,5 e 6,0, uma redução de 96% em turvação do controle. A turvação aumentou ligeiramente para 46 NTU em pH 7,0 a 15,1 mg/mL. Quando da filtragem em um filtro de grau de esterilização de 0,2 μm , a turvação foi reduzida para 8,1 NTU, uma redução de 80% do controle.

Quando o pico da Proteína A neutralizado foi diluído para uma concentração de 8,1 mg/mL para igualar com a amostra não-tratada, a turvação da amostra floculada não-filtrada diminuiu de 46 NTU para 25 NTU, uma redução de 53% conforme comparado com a amostra não-tratada. Quando da filtragem em um filtro de grau de esterilização de 0,2 μm , a turvação foi reduzida para 4,1 NTU, uma redução de 90% na turvação comparado com a amostra não-tratada.

O nível de agregado de peso molecular alto (HMW) presente no grupo de pico de Proteína A foi medido através de HPLC de exclusão de tamanho. O nível de agregado na amostra não-tratada foi 9,51%. O nível de agregado na amostra floculada era 1,05%, uma redução de 89% em agregado conforme comparado com a amostra não-tratada. Com a redução em agregado levada em consideração, a recuperação de produto de 78% na cultura se traduz em uma recuperação de 85% do monômero desejado.

Os níveis de proteínas de célula hospedeira (HCP), impurezas indesejadas secretadas pelas células CHO, foram medidos em etapas diferentes do processo usando um ELISA. Os níveis de HCP são relatados como partes por milhão (ppm), equivalentes a ng de HCP por mg de anticorpo. O nível de HCP na cultura não-tratada era 2,53E6 ppm. O nível de HCP no meio condicionado floculado era 3,83E5 ppm, uma redução de 84% da cultura não-tratada. Ambas culturas tratadas e não-tratadas tinham uma redução de aproximadamente 60% em HCP através dos filtros de almofada para

1,02E6 e 1,62E5, respectivamente. Quando da purificação na coluna de Proteína A, os níveis de HCP na amostra não-tratada foram reduzidos em 90% para 1,03E5 ppm. Os níveis de HCP na amostra floculada foram reduzidos em 98% para 3,83E2 ppm. No geral, houve uma remoção de 1,4 log de HCP para a série de purificação não-tratada. A série de purificação floculada atingiu uma remoção 3,8 log de HCP resultando em uma redução de 250 vezes em HCP conforme comparado com a série de purificação não-tratada.

Embora várias implementações tenham sido descritas, a invenção não é tão limitada.

Como um exemplo, em algumas implementações, os métodos de floculação descritos aqui podem ser realizados sem células presentes, por exemplo, após as células terem sido removidas. O meio pode conter material insolúvel não-celular (vide Exemplo 5 abaixo).

Exemplo 5

O uso de cálcio e fosfato para formar um precipitado sólido para auxiliar na filtração de uma solução contendo proteína turva: Um mAb, anti-GDF8 N^o 1, foi produzido por células CHO recombinantes em meio livre de soro. As células foram removidas por uma centrifuga de discos Alfa Laval BTPX 205 e os centrados resultantes foram processados através de Millipore A1HC Pad Filters. Após filtração em almofada e filtração adicional em um filtro de polimento de 0,2 µm, as amostras foram cromatografadas usando uma coluna de afinidade de Proteína A GE Healthcare MabSelect. Quando anticorpos são eluídos da coluna de Proteína A, usando um tampão de pH baixo, os grupos de pico são ocasionalmente turvos. Quando da neutralização, a turvação tipicamente aumenta significativamente.

Neste exemplo, o pico de Proteína A foi mantido não-filtrado por 7 dias a 4°C e então aquecido para temperatura ambiente. A turvação do pico era 192 NTU. O pico foi separado em amostras de 800 mL, com uma amostra deixada não-tratada. À segunda amostra foram adicionados fosfato de potássio a 4 mM e cloreto de cálcio a 6 mM. A amostra tratada foi então agitada em um frasco Erlenmeyer de 2L por 1 hora a 18-25°C. Após agitação a turvação da amostra tratada era 460 NTU.

Ambas amostras tratadas e não-tratadas foram então filtradas em um filtro de cápsula de polietersulfona de 0,5/0,2 μm Millipore Express SCH de 17,7 cm^2 . Com base na quantidade de solução que foi capaz de passar por cada filtro, uma capacidade de filtro máxima foi calculada. A capacidade de filtro máxima é o número de litros de solução que pode passar por 1 m^2 de filtro antes do filtro entupir e nenhuma solução mais passar. A amostra não-tratada foi capaz de atingir uma capacidade de filtro máxima de aproximadamente 30 L/m^2 , enquanto a amostra tratada atingiu uma capacidade de filtro máxima de aproximadamente 1500 L/m^2 , um aumento de 50 vezes na capacidade do filtro. A turvação pós-filtro para ambas amostras não-tratadas e tratadas foi 9 NTU, indicando que o tratamento não resultou provavelmente na remoção de matéria em partícula adicional, mas serviu como um auxiliar de filtro e permitiu que volumes maiores de solução passassem pelo filtro antes dele entupir.

15 Exemplo 6

O efeito de escala e método de mistura sobre o uso de cálcio e fosfato para formar um precipitado sólido para auxiliar na remoção de matéria em partícula em uma solução contendo proteína turva: Anti-AB Nº 2 mAb, escrito como "mAb B" nas Figuras 2 e 3, foi produzido por células CHO recombinantes cultivadas em meio livre de soro em biorreatores de escala piloto (150-500L de cultura de célula). Aproximadamente 125L, 1,5L ou 50 mL do meio condicionado contendo célula foram separados em alíquota em uma bombona de 200L, um béquer de 2L ou um frasco Erlenmeyer de 125 mL, respectivamente. HEPES foi adicionado a 40 mM para controlar o pH. A bombona de 200L e o béquer de 2L foram misturados com propulsores. O Erlenmeyer de 125 mL foi misturado por um agitador. Uma solução concentrada de fosfato de potássio foi adicionada a cada mistura para atingir uma concentração final de 20 mM na solução final. Uma solução concentrada de cloreto de cálcio foi adicionada a cada solução para atingir uma concentração fixada final de 30 mM e misturada. Os pHs finais estavam entre 7,0 e 7,5. O sólido e o meio foram incubados por mais de uma hora sob condições de mistura em temperatura ambiente (20-23°C). Alíquotas de 50 mL de a-

mostra não-tratada, e as amostras tratadas de 125L, 1,5L e 50 mL foram centrifugadas por 10 minutos a 340 xg. As turvações e concentrações de anticorpo nos sobrenadantes foram medidas.

O efeito sobre a turbidez da escala e método de mistura é mostrado na Figura 12. A turbidez é reduzida em mais de 90% do controle em todos os exemplos de floculação independente da escala e independente do método de mistura (propulsor ou agitador). Adicionalmente, a recuperação de anticorpo em todas as amostras tratadas era 100% comparado com a amostra não-tratada. Deste modo, não parece que a floculação na presente invenção seja dependente de escala ou do método de mistura para essas condições amplamente diferentes.

Os níveis de proteínas de célula hospedeira (HCP), impurezas indesejadas secretadas pelas células CHO, foram medidos no sobrenadante não-tratado e a amostra de 125L tratada usando um ELISA. Os níveis de HCP são relatados como partes por milhão (ppm), equivalentes a ng de HCP por mg de anticorpo. A amostra de 125L tratada tinha uma redução em HCP de 50% conforme comparado com a amostra não-tratada.

Exemplo 7

O efeito da velocidade de mistura sobre o uso de cálcio e fosfato para formar um precipitado sólido para auxiliar na remoção de matéria em partícula em uma solução contendo proteína turva: mAb Anti-AB Nº 2, escrito como "mAb B" na FIGURA 3, foi produzido por células CHO recombinantes cultivadas em meio livre de soro em biorreatores de escala piloto (160-500L de cultura de célula). Aproximadamente 125L do meio condicionado contendo célula foram postos em duas bombonas de 200L. HEPES foi adicionado a 40 mM para controlar o pH. A mistura foi realizada com propulsores, um operado em uma velocidade da pá de 0,9 m/s e o outro a 2,5 m/s. Uma solução concentrada de fosfato de potássio foi adicionada à mistura para atingir uma concentração final de 20 mM na solução final. Uma solução concentrada de cloreto de cálcio foi adicionada à solução para atingir uma concentração fixada final de 30 mM e misturada. O pH final era entre 7,0 e 7,5. O sólido e o meio foram incubados sob condições de mistura em temperatura ambiente

(20-23°C), e as amostras tomadas em vários pontos de tempo. A turvação de cada sobrenadante de amostra foi medida após centrifugação a 340 xg por dez minutos. O efeito sobre a turvação da velocidade da pá do propulsor é mostrado na FIGURA 3. A turvação é reduzida em mais de 90% a partir do
5 controle em todos os exemplos de flocculação independente das velocidades de pá investigadas após uma hora. A velocidade de pá mais rápida parecia ter uma redução mais rápida na turvação no ponto de tempo de 15 minutos. Esta diferença, no entanto, não é significativa. Deste modo, não parece que a flocculação na presente invenção seja dependente da velocidade de pá pa-
10 ra as velocidades investigadas após uma hora de incubação.

Os níveis de proteínas de célula hospedeira (HCP), impurezas indesejadas produzidas pelas células CHO, foram medidos no sobrenadante não-tratado e na amostra tratada a 0,9 m/s usando um ELISA. Os níveis de HCP são relatados como partes por milhão (ppm), equivalentes a ng de HCP
15 por mg de anticorpo. A amostra tratada teve uma redução em HCP de 47% conforme comparado com a amostra não-tratada.

Exemplo 8

Flocculação em Larga Escala:

Um experimento de escala piloto usando cálcio e fosfato como precipitantes e os efeitos sobre etapas de clarificação e cromatografia a jus-
20 sante: Um mAb, anti-IL-13 Nº 1 (escrito como mAb E nas Figuras 4 e 5) foi produzido em cinco bateladas diferentes por células CHO recombinantes cultivadas em meio livre de soro em um biorreator de 190 L. O biorreator foi ativado com um tempo de cultura de 12-14 dias, e as células tinham uma
25 viabilidade entre 8×10^6 – 11×10^6 células viáveis/mL, e eram 66-88% viáveis. No momento da coleta, a cultura foi trazida para temperatura ambiente (18-25°C). 150L de cultura foram transferidos para uma bombona de 200L (para a primeira das quatro bateladas) ou deixados no biorreator (para a última batelada) e lentamente misturados com um misturador no alto. Tampão HE-
30 PES foi adicionado a 40 mM para controlar o pH. Fosfato de potássio a 2M foi então adicionado para uma concentração de 20 mM. Cloreto de cálcio a 5M foi então adicionado para uma concentração de 30 mM. O pH da mistura

estava entre 7 e 7,5. A cultura floculada foi incubada entre 2 e 3 horas, enquanto misturando.

As culturas floculadas foram processadas através de uma centrífuga de discos Alfa Laval BTPX 205 em uma taxa de fluxo entre 4 e 5 L/min e uma velocidade de bacia de 7630 RPM (8000 g). A turvação dos centrados obtidos é comparada com o sobrenadante da amostra não-floculada (obtido da centrifugação do controle não-tratado a 340 g por dez minutos) na FIGURA 4. Em todos os casos, a floculação reduz a turvação em mais de 85%. A recuperação de título de anticorpo nos sobrenadantes floculados é mostrada na FIGURA 5 como uma função de tempo de incubação, e está acima de 75% em todos os casos. Amostras de 50 mL são tomadas das bateladas 403 e 405 e incubadas em frascos Erlenmeyer de 125 mL por tempo adicional. Após 7 horas, a batelada 403 tinha um título de 60% da amostra não-tratada e a batelada 405 tinha um título de 70% da amostra não-tratada.

Os níveis de proteínas de célula hospedeira (HCP), impurezas indesejadas secretadas pelas células CHO, foram medidos nos sobrenadantes não-tratados e centrados tratados usando um ELISA. Os níveis de HCP são relatados como partes por milhão (ppm), equivalente a ng de HCP por mg de anticorpo. As amostras tratadas das 5 bateladas mostraram reduções em HCP de 49%-69% conforme comparado com amostras não-tratadas.

As primeiras 3 bateladas foram processadas através de Millipore A1HC Pad Filters para uma capacidade de 270 L de centrado por metro quadrado de filtro em um fluxo de 120 litros por metro quadrado por hora sem nenhum aumento em pressão ou turbidez.

Após filtragem em almofada, as amostras geralmente permaneceram estáveis por muitos dias conforme medido através da turvação.

As 2 últimas bateladas foram diretamente sobre filtros de 0,2 μm sem irem através de almofadas. Capacidades dos filtros de 730 e 150 $/\text{m}^2$ foram atingidas, respectivamente, sem o uso de filtros de almofada antes dos filtros de 0,2 μm . Essas capacidades de filtro representam um aperfeiçoamento significativo na capacidade de filtragem sobre aquela de material não-floculado. Quando da manutenção dos centrados filtrados em 0,2 μm

(sem almofadas) em temperatura ambiente (18-24°C), a turvação começa a aumentar dentro de algumas horas devido à precipitação contínua do cálcio e do fosfato. Após 24-48 horas os precipitados sedimentam, formando uma camada cristalina de fosfato de cálcio no fundo do recipiente. A solução con-
5 tendo proteína clarificada resultante tem excelentes características de capacidade de filtração ambos antes e após os precipitados sedimentarem. Nenhum anticorpo é perdido no precipitado.

Floculação para a batelada final foi realizada diretamente no biorreator piloto. O reator foi efetivamente limpo usando procedimentos de limpeza-no-local (CIP) (enxágue com água seguido por uma lavagem com NaOH a 0,1N a 60-80°C).
10

Todas as 5 bateladas foram processadas em escala piloto através de uma coluna de Proteína A, etapa de troca de ânion, filtro de retenção de vírus e ultrafiltração/diafiltração final (UF/DF) sem quaisquer consequências operacionais. Picos de Proteína A neutralizados tinham todos turvações de <20 NTU e eram altamente filtráveis. Qualidade do produto, tal como níveis de agregado de peso molecular alto e *clips* de peso molecular baixo, conforme medido através de HPLC de exclusão de tamanho e eletroforese de gel SDS-PAGE e níveis de espécies ácidas e básicas, conforme medido através de HPLC de troca de cátion, eram comparáveis com uma campanha piloto não-floculada anterior com este anticorpo.
15
20

Exemplo 9

O uso de cálcio e fosfato como precipitantes e efeitos sobre uma etapa de cromatografia de Proteína A a jusante e filtração subsequente:
25 Três mAbs, anti-AB Nº 2, anti-GDF8 Nº 1 e anti-IL22 foram produzidos por células CHO recombinantes cultivadas em meio livre de soro. Para cada um, as culturas foram separadas na metade, com a primeira amostra sendo deixada não-tratada. À segunda amostra (a amostra tratada) foram adicionados HEPES para um nível de 40 mM, fosfato de potássio para um nível de 20
30 mM e cloreto de cálcio para um nível de 30 mM. As células de todas as amostras foram removidas através de centrifugação e os sobrenadantes resultantes foram processados através de Millipore A1HC Pad Filters. Após

filtragem em almofada e filtragem adicional através de filtros de polimento de 0,2 μm , as amostras foram cromatografadas usando colunas de afinidade de Proteína A GE Healthcare MabSelect. Quando anticorpos são eluídos das colunas de Proteína A, usando um tampão de pH baixo, os grupos de pico são ocasionalmente turvos. Quando da neutralização, a turvação tipicamente aumenta significativamente.

As turvações de pico neutralizadas das amostras não-tratadas e tratadas são mostradas na Tabela 2 abaixo. Todas as três amostras tratadas mostraram uma redução significativa em turvação de pico neutralizada conforme comparado com amostras não-tratadas.

Tabela 2: Diminuição na turvação de Pico da Proteína A após tratamento com fosfato de cálcio da cultura celular antes do carregamento

	Turvação de Pico de Amostra Não-tratada (NTU)	Turvação de Pico de Amostra Tratada (NTU)	% de Redução em Turvação de Amostra Não-tratada para Tratada
anti-AB Nº 2	61	25	60%
anti-GDF8 Nº 1	153	25	84%
anti-IL22	233	12	95%

Ambos picos neutralizados anti-IL22 não-tratados e tratados foram então filtrados através de filtros de seringa de polietersulfona de 0,8/0,2 μm Pall Acrodisc Supor de 2,8 cm^2 . Com base na quantidade de solução que foi capaz de passar por cada filtro, uma capacidade de filtro máxima foi calculada. A capacidade de filtro máxima é o número de litros de solução que pode passar por 1 m^2 de filtro antes do filtro entupir e solução não poder mais passar. A amostra não-tratada foi capaz de atingir uma capacidade de filtro máxima de aproximadamente 10⁻³⁰ L/ m^2 . 170 L/ m^2 da amostra tratada passaram pelo filtro sem uma redução no fluxo, ponto onde nenhuma amostra tratada permaneceu. A amostra tratada passou pelo filtro muito rapidamente para calcular com precisão uma capacidade de filtro máxima. No entanto, como não houve nenhuma redução em fluxo determinada para um lançamento de 170 L/ m^2 , pode ser suposto que a capacidade máxima teria sido significativamente maior do que 170 L/ m^2 .

Todas as publicações, pedidos de patente, patentes e outras referências mencionadas aqui são incorporados a título de referência em sua totalidade.

Outras modalidades estão dentro do escopo das reivindicações
5 que seguem:

REIVINDICAÇÕES

1. Método compreendendo:

formação de um sólido compreendendo um primeiro cátion e um primeiro ânion em um meio compreendendo uma proteína; e

5 separação do sólido da proteína.

2. Método de acordo com a reivindicação 1, onde o primeiro cátion é selecionado do grupo consistindo em cálcio, magnésio, estrôncio, alumínio, escândio, lântano, silício, titânio, zircônio, tório, manganês, cobalto, cobre, cromo, ferro, níquel, zinco e vanádio.

10 3. Método de acordo com a reivindicação 1, onde o primeiro cátion é cálcio.

4. Método de acordo com a reivindicação 1, onde o primeiro ânion é selecionado do grupo consistindo em fosfato, carbonato, tungstato, hidróxido, haleto, succinato, tartrato, citrato, sulfeto, molibdato, nitrato, fluoreto, silicato e alginato.

5. Método de acordo com a reivindicação 1, onde o primeiro ânion é fosfato.

6. Método de acordo com a reivindicação 1, onde o primeiro cátion é cálcio e o primeiro ânion é fosfato.

20 7. Método de acordo com a reivindicação 1, onde o sólido tem uma constante de produto de solubilidade de não mais do que cerca de $10^{-4} M^2$.

8. Método de acordo com a reivindicação 1, compreendendo ainda introdução de a partir de cerca de 4 mM a cerca de 200 mM do primeiro cátion e do primeiro ânion no meio.

25 9. Método de acordo com a reivindicação 1, onde o produto das concentrações do primeiro cátion e do primeiro ânion antes da formação do sólido é maior do que cerca de $10^{-5} M^2$.

30 10. Método de acordo com a reivindicação 1, onde o produto das concentrações do primeiro cátion e do primeiro ânion antes da formação do sólido é maior do que cerca de $10^{-4} M^2$.

11. Método de acordo com a reivindicação 1, onde o produto das

concentrações do primeiro cátion e do primeiro ânion antes da formação do sólido é maior do que cerca de $2,7 \times 10^{-2} M^2$.

12. Método de acordo com a reivindicação 1, onde as concentrações do primeiro cátion e do primeiro ânion no meio são diferentes.

5 13. Método de acordo com a reivindicação 1, onde as concentrações do primeiro cátion e do primeiro ânion no meio são substancialmente iguais.

14. Método de acordo com a reivindicação 1 compreendendo ainda mudança do pH do meio.

10 15. Método de acordo com a reivindicação 1, onde o pH do meio é mantido entre cerca de 5 a cerca de 9.

16. Método de acordo com a reivindicação 1, onde pelo menos cerca de 50% da proteína no meio são separados.

15 17. Método de acordo com a reivindicação 1, onde pelo menos 70% da proteína no meio são separados.

18. Método de acordo com a reivindicação 1, compreendendo ainda diminuição da turvação do meio clarificado em pelo menos cerca de 30% com relação a um segundo meio clarificado idêntico ao meio e livre do sólido.

20 19. Método de acordo com a reivindicação 1, compreendendo ainda diminuição da turvação do meio clarificado em pelo menos cerca de 50% com relação a um segundo meio clarificado idêntico ao meio e livre do sólido.

25 20. Método de acordo com a reivindicação 1, onde o meio compreende ainda células de mamífero.

21. Método de acordo com a reivindicação 1, onde o meio compreende ainda células eucarióticas.

30 22. Método de acordo com a reivindicação 1, compreendendo ainda centrifugação do meio, filtração do meio através de uma membrana de microfiltração ou filtração do meio através de um filtro de profundidade.

23. Método de acordo com a reivindicação 1, onde o sólido compreende ainda uma segunda espécie de cátion ou um segundo ânion.

24. Método de acordo com a reivindicação 1, onde o meio compreendendo a proteína, após o sólido ser formado e separado, é aplicado a uma coluna de Proteína A e eluído para prover um pico eluído tendo uma turbidez menor do que um pico eluído similar de um segundo meio idêntico ao primeiro meio e livre de formação de sólido.

25. Método de acordo com a reivindicação 1, onde o meio compreendendo a proteína, após o sólido ser formado e separado, é aplicado a uma coluna de Proteína A e eluído para prover um pico eluído tendo um nível de impureza solúvel menor do que um pico eluído de um segundo meio idêntico ao meio e livre de formação do sólido.

26. Método compreendendo:
introdução de um primeiro cátion e um primeiro ânion em um meio compreendendo uma proteína;
precipitação de um sólido compreendendo o primeiro cátion e o primeiro ânion; e
separação do sólido da proteína.

27. Método de acordo com a reivindicação 26, onde o primeiro cátion e o primeiro ânion são introduzidos sequencialmente.

28. Método de acordo com a reivindicação 26, onde o primeiro cátion e o primeiro ânion são introduzidos simultaneamente.

29. Método de acordo com a reivindicação 26, onde o primeiro cátion é selecionado do grupo consistindo em cálcio, magnésio, estrôncio, alumínio, escândio, lântano, silício, titânio, zircônio, tório, manganês, cobalto, cobre, cromo, ferro, níquel, zinco e vanádio.

30. Método de acordo com a reivindicação 26, onde o primeiro ânion é selecionado do grupo consistindo em fosfato, carbonato, tungstato, hidróxido, haleto, succinato, tartrato, citrato, sulfeto, molibdato, nitrato, fluoreto, silicato e alginato.

31. Método de acordo com a reivindicação 26, onde o sólido tem uma constante de produto de solubilidade de não mais do que cerca de $10^{-4} M^2$.

32. Método de acordo com a reivindicação 26, compreendendo ainda introdução de a partir de cerca de 4 mM a cerca de 200 mM do primeiro cátion ou do primeiro ânion no meio.

5 33. Método de acordo com a reivindicação 26, onde o produto das concentrações do primeiro cátion e do primeiro ânion é maior do que cerca de $10^{-5} M^2$.

34. Método de acordo com a reivindicação 26, onde o produto das concentrações do primeiro cátion e do primeiro ânion é maior do que cerca de $10^{-4} M^2$.

10 35. Método de acordo com a reivindicação 26, onde o produto das concentrações do primeiro cátion e do primeiro ânion é maior do que cerca de $2,7 \times 10^{-2} M^2$.

15 36. Método de acordo com a reivindicação 26 compreendendo introdução de concentrações diferentes do primeiro cátion e do primeiro ânion no meio.

37. Método de acordo com a reivindicação 26 compreendendo introdução da mesma concentração do primeiro cátion e do primeiro ânion no meio.

20 38. Método de acordo com a reivindicação 26 compreendendo ainda mudança do pH do meio.

39. Método de acordo com a reivindicação 26, onde o pH do meio é mantido entre cerca de 5 a cerca de 9.

40. Método de acordo com a reivindicação 26 compreendendo ainda ajuste da temperatura do meio.

25 41. Método de acordo com a reivindicação 26, onde pelo menos cerca de 50% da proteína no meio são separados.

42. Método de acordo com a reivindicação 26, onde pelo menos cerca de 70% da proteína no meio são separados.

30 43. Método de acordo com a reivindicação 26 compreendendo ainda diminuição da turvação do meio clarificado em pelo menos cerca de 30% com relação a um segundo meio clarificado idêntico ao meio e livre do sólido.

44. Método de acordo com a reivindicação 26 compreendendo ainda diminuição da turvação do meio clarificado em pelo menos cerca de 50% com relação a um segundo meio clarificado idêntico ao meio e livre do sólido.

5 45. Método de acordo com a reivindicação 26, onde o meio compreende ainda células de mamífero.

46. Método de acordo com a reivindicação 26, onde o meio compreende ainda células eucarióticas.

10 47. Método de acordo com a reivindicação 26 compreendendo ainda centrifugação do meio.

48. Método de acordo com a reivindicação 26, onde o sólido compreende ainda um segundo cátion ou um segundo ânion.

15 49. Método de acordo com a reivindicação 26, onde o meio compreendendo a proteína, após o sólido ser formado e separado, é aplicado a uma coluna de Proteína A e eluído para prover um pico eluído tendo uma turvação menor do que um pico similarmente eluído de um segundo meio idêntico ao primeiro meio e livre de formação do sólido.

20 50. Método de acordo com a reivindicação 26, onde o meio compreendendo a proteína, após o sólido ser formado e separado, é aplicado a uma coluna de Proteína A e eluído para prover um pico eluído tendo um nível de impureza solúvel menor do que um pico eluído de um segundo meio idêntico ao meio e livre de formação do sólido.

51. Método de acordo com a reivindicação 1, onde a proteína é uma proteína secretada.

25 52. Método de acordo com a reivindicação 51, onde a proteína é selecionada do grupo consistindo em um anticorpo, um fragmento de ligação de antígeno de um anticorpo, um receptor solúvel, uma fusão de receptor, uma citocina, um fator de crescimento, uma enzima e um fator de coagulação.

30 53. Método de acordo com a reivindicação 52, onde a proteína é um anticorpo ou um fragmento de ligação de antígeno dele.

54. Método de acordo com a reivindicação 53, onde o anticorpo ou fragmento de ligação de antígeno dele se liga a um peptídeo A β , interleucina-13, interleucina-22 ou fator-8 de diferenciação de crescimento.

5 55. Método de acordo com a reivindicação 26, onde a proteína é uma proteína secretada.

56. Método de acordo com a reivindicação 55, onde a proteína é selecionada do grupo consistindo em um anticorpo, um fragmento de ligação de antígeno de um anticorpo, um receptor solúvel, uma fusão de receptor, uma citocina, um fator de crescimento, uma enzima e um fator de coagulação.
10

57. Método de acordo com a reivindicação 56, onde a proteína é um anticorpo ou um fragmento de ligação dele.

58. Método de acordo com a reivindicação 57, onde o anticorpo ou fragmento de ligação de antígeno dele se liga a um peptídeo A β , interleucina-13, interleucina-22, 5T4 ou fator-8 de crescimento e diferenciação.
15

59. Método compreendendo: (i) formação de um sólido que inclui um primeiro cátion e um primeiro ânion em um meio compreendendo uma porção alvo e um agente causador de turvação; e (ii) separação do sólido e agente causador de turvação da solução através de filtração.
20

60. Método de acordo com a reivindicação 59, onde a porção alvo é uma proteína.

61. Método de acordo com a reivindicação 60, onde a proteína é uma proteína solúvel.

62. Método de acordo com a reivindicação 26, onde o primeiro
25 cátion é cálcio.

63. Método de acordo com a reivindicação 26, onde o primeiro ânion é fosfato.

64. Método de acordo com a reivindicação 26, onde o primeiro cátion é cálcio e o primeiro ânion é fosfato.

30 65. Método de acordo com a reivindicação 1 compreendendo ainda ajuste da temperatura do meio.

FIG. 1

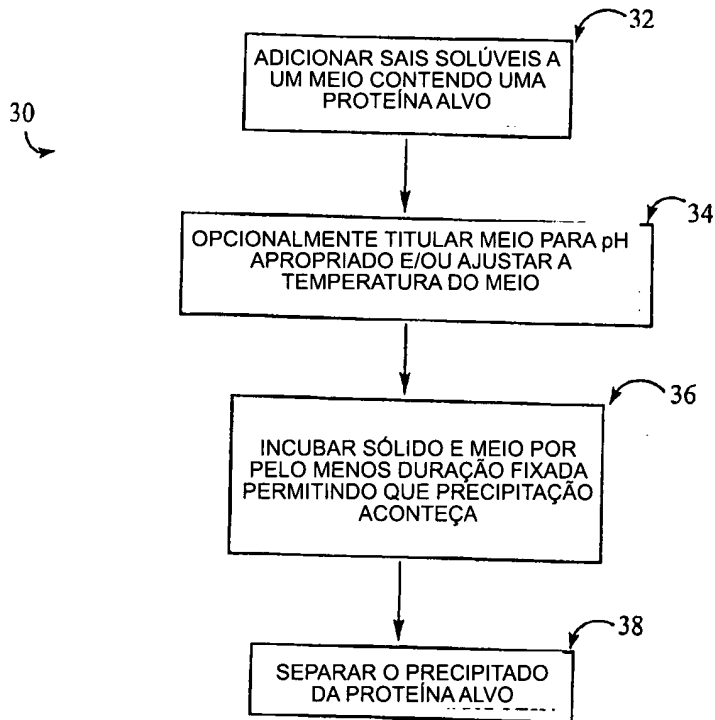


FIG. 2

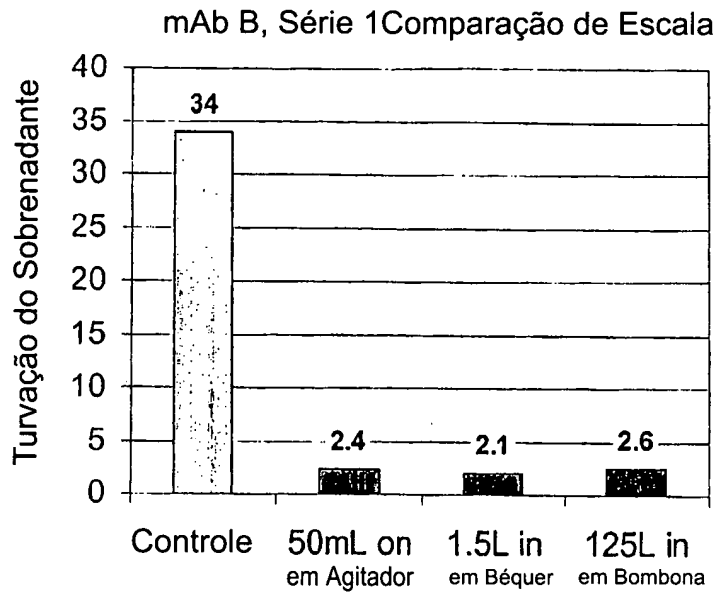


FIG. 3

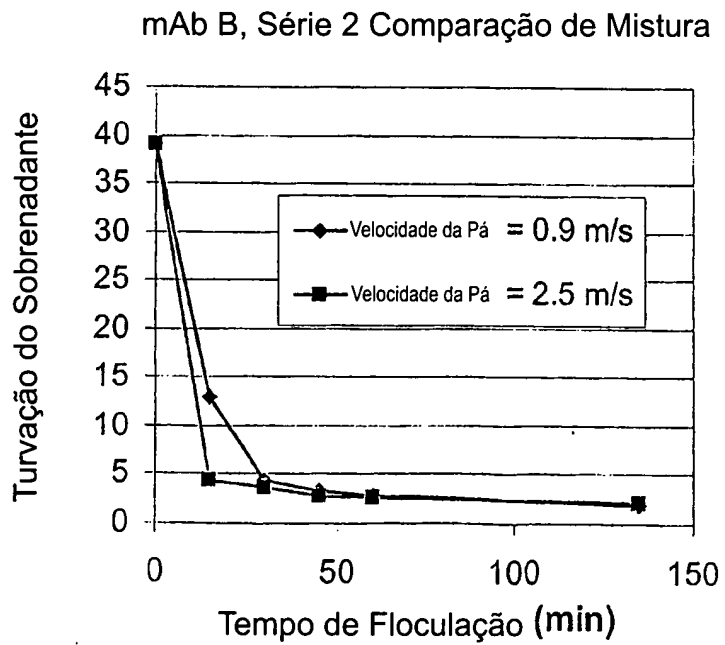


FIG. 4

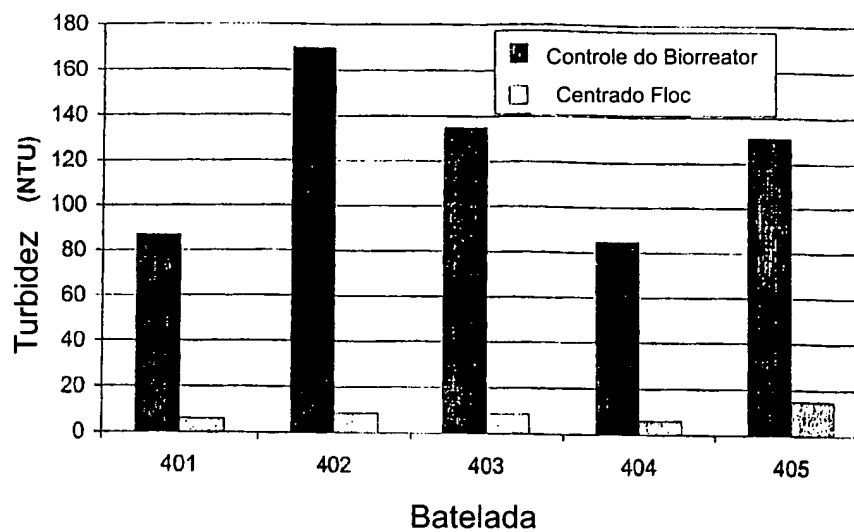
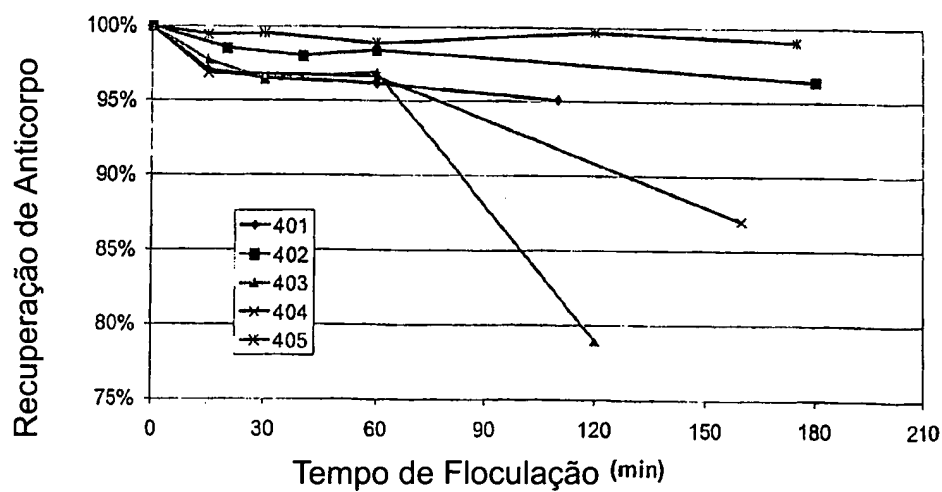


FIG. 5

Recuperação Durante Curso do Tempo de Floculação para mAb E



RESUMO

Patente de Invenção: "FLOCULAÇÃO DE PROTEÍNA USANDO SAIS".

Métodos de separação, por exemplo, para isolar uma proteína recombinante, são revelados. Em algumas implementações, um método inclui formação de um sólido contendo um primeiro cátion e um primeiro ânion em um meio contendo uma proteína, e separação do sólido da proteína.