



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

(21) PI 0716997-3 A2



* B R P I 0 7 1 6 9 9 7 A 2 *

(62) Data de Depósito do Pedido Original:
PI0621691 - 19/12/2006

(22) Data de Depósito: 10/09/2007

(43) Data da Publicação: 15/10/2013
(RPI 2232)

(51) Int.Cl.:

A61K 39/395

C07K 14/59

C07K 19/00

C07K 16/28

C07K 16/30

C12N 5/10

(54) Título: SISTEMA DE PRODUÇÃO TOTALMENTE HUMANO DE RENDIMENTO ELEVADO PARA PROTEÍNAS E ANTICORPOS MELHORADOS

(30) Prioridade Unionista: 10/09/2006 EP 06 090162.6, 18/09/2006 EP 06 090171.7, 13/10/2006 EP 06 090190.7, 04/05/2007 EP 07 090094.9, 13/10/2006 EP 06 090190.7, 04/05/2007 EP 07 090094.9, 18/09/2006 EP 06 090171.7, 13/10/2006 EP 06 090190.7, 10/09/2006 EP 06 090162.6, 04/05/2007 EP 07 090094.9, 18/09/2006 EP 06 090171.7, 13/10/2006 EP 06 090190.7, 13/10/2006 EP 06 090190.7, 04/05/2007 EP 07 090094.9

(73) Titular(es): Glycotope GmbH

(72) Inventor(es): Anja Löffler, Antje Danielczyk, Hans Baumeister, Lars Stöckl, Renate Stahn, Steffen Goletz

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

(86) Pedido Internacional: PCT EP2007007877 de 10/09/2007

(87) Publicação Internacional: WO 2008/028686 de 13/03/2008

(57) Resumo: MÉTODO E APARELHO PARA TRANSMITIR DADOS. Uma implementação fornece um transmissor que separa porções sequenciais de dados em um primeiro conjunto de dados por intervalos de tempo permitindo um modo de economia de energia (1005). O transmissor transmite as porções sequenciais de dados separadas por respectivos intervalos de tempo tendo comprimentos configurados para permitir um receptor entrar e sair de um modo de economia de energia entre as porções de dados de recepção sequencialmente transmitidas do primeiro conjunto de dados (1010). O transmissor separa as porções sequenciais de dados em um segundo conjunto por intervalos de tempo que não são de comprimento suficiente para permitir um receptor entrar e sair de um modo de economia de energia durante os intervalos de tempo (1015). O segundo conjunto de dados é depois transmitido (1020).

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para **"SISTEMA DE PRODUÇÃO TOTALMENTE HUMANO DE RENDIMENTO ELEVADO PARA PROTEÍNAS E ANTICORPOS MELHORADOS"**.

SUMÁRIO

5 A presente invenção refere-se métodos biotecnologicamente favoráveis para a produção de composições de moléculas proteicas e, particularmente às composições de moléculas de anticorpo com atividade aumentada e/ou rendimento aumentado e/ou homogeneidade aumentada e uma glicosilação humana. Ela ainda fornece novas células hospedeiras, ácidos nucleicos e composições de moléculas proteicas.

INTRODUÇÃO

Uma característica-chave e um desafio para a indústria é a produção de proteínas recombinantes e produtividade, custo, homogeneidade e atividade proteica são questões-chave, as quais ainda devem ser otimizadas. Glicosilação também é um assunto-chave na produção com altos rendimentos de glicoproteínas recombinantes homogêneas as quais possuem uma série de problemas críticos para a sua produção. Cada linhagem celular de produção atual oferece uma série de diferentes desafios e problemas, os quais são em grande parte devido à complexidade e espécies, tecido e especificidade tecidual da glicosilação. Consequentemente, a otimização dos sistemas de produção em relação à glicosilação permanece um dos aspectos-chave para otimização. Isto particularmente como diferenças no padrão de glicosilação geralmente tem um impacto considerável na atividade, imunogenicidade, biodisponibilidade e meia-vida das moléculas proteicas. Uma visão geral detalhada das propriedades de glicosilação de diferentes linhagens celulares derivadas de diferentes espécies e de sistemas de produção diferente de mamíferos é dada em Jenkins et al (Getting the glycosylation right: implications for the biotechnology industry, Nat Biotechnology, 1996, 14: 975 - 981).

30 Anticorpos são ferramentas principais para diagnóstico e pesquisa, e provavelmente se tornarão a maior família de terapêuticos. Geralmente dez anticorpos recombinantes terapêuticos estão no mercado e centenas em

desenvolvimento clínico. Uma característica-chave e desafio para a indústria é a produção de anticorpos recombinantes ("rMAbs") e produtividade, custo, homogeneidade e atividade do anticorpo são questões-chave as quais ainda devem ser otimizadas. Quase todos os rMAbs terapêuticos no mercado foram produzidos em linhagens de células de roedores a partir de hamster (CHO) e camundongo (NS0 ou Sp2/0). De longe a maioria dos rMAbs em desenvolvimento são produzidos em células de roedores, e outras estão em desenvolvimento, entretanto, nenhuma foi suficiente para otimizar a produtividade, custo, homogeneidade e atividade de anticorpo.

Glicosilação também é um assunto-chave na produção de altos rendimentos de rMAbs homogêneos e potentes os quais apresentam uma série de problemas críticos para a produção dos rMAbs. Cada linhagem celular de produção atual oferece uma série de diferentes desafios e problemas os quais são amplamente devido à complexidade e espécies, tecido e especificidade do sítio de glicosilação [Review: Royston Jefferis, CCE IX: Glycosylation of Recombinant Antibody Therapeutics; Biotechnol. Prog. 2005, 21, 11-16].

Consequentemente, a otimização de proteínas e, particularmente, sistemas de produção de anticorpos em relação à glicosilação permanece um dos aspectos-chaves para a otimização.

A presente invenção proporciona novos sistemas de expressão baseados em células sanguíneas humanas imortalizadas e, particularmente, baseados em células de origem leucêmica mieloide. Essas células surpreendentemente melhoram a produção de proteínas glicosiladas e, particularmente, de anticorpos em relação à atividade, rendimento e/ou homogeneidade.

TÉCNICA ANTERIOR

Proteínas é um grupo diverso do qual a função e ocorrência variam amplamente entre elas. Dentre as proteínas de potencial terapêutico, a maior parte das proteínas são glicosiladas, tais como muitos hormônios (por exemplo, hormônio do crescimento, glucagon, FSH e LH), fatores de crescimento (por exemplo, GM-CSF, G-CSF, VEGF e eritropoietina), citocinas (por

exemplo, IL-2, IL-7, interferon-alfa e beta, TNF-alfa), anti-coagulante (por exemplo, Lepirudina, Desirudina), fatores de coagulação sanguínea (por exemplo, fatores VII, VIII e IX), vacinas (por exemplo, antígeno da hepatite B) e anticorpos. Os sistemas de produção celular estabelecidos são incapazes de produzir proteínas com a glicosilação humana original. Sistemas de células procarióticas (por exemplo, bactérias) e a maioria das células eucarióticas (por exemplo, leveduras, insetos e células vegetais) sintetizam proteínas que não têm glicosilação ou carregam glicanos os quais diferem muito das cadeias de carboidrato humanas. Células de ovário de hamster chinês (CHO) é um sistema de produção comumente usado que é capaz de glicosilar as proteínas de uma forma similar a das células humanas. Entretanto, ainda permanecem diferenças importantes, tais como na galactosilação, fucosilação, particularmente glicosilação com N-acetilglicosaminas e especialmente em vários aspectos da sialilação. Essas diferenças influenciam a atividade, a biodisponibilidade, a imunogenicidade e a meia-vida.

No momento em que esses sistemas de produção foram estabelecidos, isto foi suficiente para produzir proteínas terapêuticas que eram pelo menos até certo grau ativas. Entretanto, atualmente grandes esforços se concentram para melhorar a atividade de uma proteína terapêutica com o objetivo (i) de reduzir a quantidade e concentração das doses aplicadas das proteínas terapêuticas, (ii) de reduzir os custos de uma terapia, e (iii) de reduzir os efeitos colaterais.

A principal estratégia para melhorar a bioatividade das proteínas é prolongar a sua meia-vida do soro onde certas formas de polietilenoglicol são adicionadas/ligadas quimicamente à proteína produzida. PEG aumenta o peso molecular e, dessa forma, a meia-vida no soro. Entretanto, vários problemas estão associados a esse processo. Por exemplo, em quase todos os casos a PEGuilação reduz a atividade de uma proteína através de sua função efetora celular, a administração repetitiva em seres humanos geralmente resulta em uma resposta imune adversa como anticorpos neutralizantes, e/ou o processo de produção necessita de modificação química adicional resultando em um processo com múltiplas etapas com custos adicionais,

perdas e tempo. Sistemas veículos similares (por exemplo, HESilação ou ligação de albumina) existem, os quais têm desvantagens comparáveis.

5 Também a modificação das cadeias de carboidrato e, deste modo, a glicosilação de proteínas está no foco para melhorar a meia-vida do soro das proteínas recombinantemente expressas. As tecnologias, deste modo, focam na maximização do grau de sialilação de uma glicoproteína recombinante. Ácidos siálicos são os monossacarídeos terminais mais pre-
valentes na superfície das células eucarióticas, e acredita-se de um modo
10 geral que quanto mais a glicoproteína está sialilada mais longa é a sua meia-vida no soro durante a circulação. Isto é baseado na presença de certos receptores como o receptor de asialoproteína no fígado, o qual se liga às proteínas não-sialiladas circulantes e as direciona para dentro da célula para degradação.

Várias classes de anticorpos estão presentes nos seres huma-
15 nos e na maioria dos mamíferos, a saber, IgG, IgM, IgE, IgA e IgD. Enquanto as moléculas de todas as classes de anticorpos são usadas em diagnóstico ou como ferramentas de pesquisa, a maioria dos terapêuticos baseados em anticorpos no mercado e sob desenvolvimento são IgG e, em uma menor extensão, IgM. A classe de IgG humana é ainda classificada em quatro sub-
20 classes, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. A estrutura básica de uma molécula de IgG consiste em duas cadeias leves e de duas cadeias pesadas compreendendo duas regiões Fab, cada uma com um domínio variável compreendendo o sítio de ligação a antígeno e um domínio constante, uma região Fc compreendendo outros domínios constantes e os sítios de interação para
25 ligantes, e a região de dobradiça flexível a qual conecta as regiões Fab e Fc. Anticorpos podem existir como moléculas inteiras ou como fragmentos de anticorpos, tais como fragmentos Fab ou Fv de cadeia individual, os quais compreendem as duas regiões variáveis das cadeias pesada e leve conectadas através de um ligante. A figura 18 mostra um anticorpo IgG.

30 Anticorpos recombinantes para uso terapêutico são mais frequentemente as sequências de proteína quiméricas, humanizadas ou chamadas de proteínas totalmente humanas para reduzir a sua imunogenicida-

de. Entretanto, moléculas verdadeiramente totalmente humanas não foram prontamente obtidas, uma vez que as modificações pós-traducionais, tal como particularmente a glicosilação, não são humanas devido à produção em roedores ou células CHO e, deste modo, podem diferir daquelas modificações encontradas em anticorpos humanos no soro humano. Diferenças na modificação, particularmente no padrão de glicosilação, podem ter um grave impacto na atividade e na imunogenicidade do anticorpo respectivamente produzido.

A atividade de um anticorpo pode ser devido a e influenciada por uma combinação de efeitos. Por um lado o anticorpo tem certa especificidade a qual é mediada pela região variável do anticorpo ("região V") localizada na região Fab, em que certas sequências, as regiões CDR, da região V. Eles desempenham um papel-chave na determinação da especificidade e afinidade particular de um anticorpo. As regiões V são, deste modo, decisivas para as características de ligação ao etitopo e variam de anticorpo para anticorpo. A afinidade de um anticorpo descreve a força e a cinética da ligação de uma única região de ligação de um anticorpo ao seu etitopo. Uma vez que várias classes e subclasses de anticorpo carregam entre duas e dez regiões variáveis idênticas na molécula do anticorpo, a força e a cinética da ligação de um anticorpo são influenciadas pela quantidade de sítios de ligação disponíveis para ligação a e a acessibilidade dos etitopos no antígeno-alvo ou célula e é expressa na sua avidez.

Outro fator importante para a qualidade de um anticorpo para o seu uso em diagnose e especialmente na terapia é a quantidade de sítios de ligação de um anticorpo na sua estrutura-alvo ou célula, assim como a sua taxa de internalização. Essas qualidades influenciam os efeitos e a adequabilidade de um anticorpo para o seu uso, especialmente na terapia.

Por outro lado, mecanismos efetores relevantes para o uso terapêutico de um anticorpo são de várias vezes, por meio dos quais alguns dos anticorpos atuam somente por um mecanismo, e os outros por uma combinação de vários mecanismos efetores. Uma estratégia é acoplar os anticorpos ou fragmentos de anticorpo às moléculas efetoras, as quais medeiam

um efeito terapêutico, tal como o acoplamento a uma molécula efetora imune, por exemplo, interleucina 2, para recrutar o sistema imune, ou o acoplamento a toxinas ou radioisótopos para matar as células-alvo, por exemplo, para terapias antitumorais. Anticorpos radiomarcados ou fragmentos de anticorpo também são valiosos para o diagnóstico *in vivo*.

A outra estratégia é usar anticorpos não-marcados, chamados de "nus", os quais podem ter importantes vantagens tais como toxicidade mais baixa, logísticas menos complicadas, o uso de braços efetores imunes naturais ou o desencadeamento de efeitos terapêuticos sem a necessidade de moléculas efetoras adicionais. Uma grande quantidade de estudos foram efetuados para elucidar os mecanismos de atividade e o modo de ação dos anticorpos, assim como para desenvolver anticorpos usando essas atividades. Dentre as atividades e efeitos mais importantes estão a atividade da citotoxicidade mediada por célula dependente de anticorpo (aqui referida como "atividade ADCC"), a atividade de citotoxicidade dependente do complemento (aqui referida como "atividade CDC"), a atividade de citotoxicidade mediada por fagocitose (aqui referida como "atividade de fagocitose"), uma atividade mediada por receptor (aqui referida como "atividade mediada por receptor"), as quais compreendem todo um grupo de diferentes efeitos e atividades.

Atividades mediadas por receptor são principalmente baseadas na ligação do anticorpo a uma molécula ou receptor em uma célula-alvo ou pela prevenção da ligação de certas moléculas a uma célula-alvo, desta forma incluindo ou inibindo certos efeitos nessas células, tal como a atividade antagonística ou agonística ou o bloqueio do receptor de um anticorpo, levando, por exemplo, à indução ou inibição da apoptose ou proliferação de células-alvo ou à secreção ou inibição da secreção de certas moléculas em uma célula-alvo, ou o bloqueio ou desencadeamento de certos outros eventos mediados por receptor, tais como interações entre moléculas e células ou entre células. A atividade ADCC, a atividade CDC e a atividade de fagocitose são atividades citotóxicas as quais são mediadas pela região Fc do anticorpo (aqui referidas como "atividades mediadas pela parte Fc"), enquanto

que as atividades mediadas por receptor, afinidade, avidéz e especificidade do anticorpo são principalmente mediadas através da região de ligação do anticorpo compreendida na região Fab.

As atividades mediadas pela parte Fc são mediadas através de células efetoras imunológicas tais como células assassinas, células assassinas naturais e macrófagos ativados, ou vários componentes do complemento pela ligação aos ligantes efetores, tais como Fc-gama RI, Fc-gama RII, Fc-gamaRIII, componente Cq1 do complemento, o receptor Fc neonatal (FcRn), etc. A subclasse de IgG1 humana é reportada como tendo a maior atividade ADCC e CDC dentre as moléculas de classe IgG humanas. Para IgM, a atividade CDC é um mecanismo efector dominante. A atividade ADCC e a atividade CDC envolvem a ligação da região Fc, a região constante do anticorpo, aos receptores Fc tais como Fc-gama RI, Fc-gama RII, Fc-gamaRIII da célula efetora ou dos componentes do complemento, tal como C1q. Resíduos de aminoácidos importantes estão na região da dobradiça e, particularmente, no segundo domínio da região constante ("domínio Cgama2"). Uma cadeia de carboidrato se ligando aos domínios Cgama2 é importante para a atividade. A cadeia de carboidrato é ligada ao aminoácido asparagina 297 (Asn-297) de Cgama2 (cadeias de carboidrato ligadas por N-glicosídeo). O terminal da cadeia de carboidratos, o qual se liga à asparagina, é chamada de extremidade redutora e a extremidade oposta é chamada de extremidade não-redutora. A região Fc de um anticorpo IgG tem dois sítios de ligação de carboidratos. A figura 18 mostra a estrutura de uma molécula IgG e indica a posição, onde tipicamente as estruturas de carboidratos podem ser encontradas. Além disso, a estrutura e a composição química dessas estruturas de carboidratos são explicadas.

Das atividades mediadas pela parte Fc, duas são consideradas como sendo influenciadas pela glicosilação do anticorpo: foi demonstrado que a remoção da cadeia de açúcar na parte Fc do anticorpo resulta no desaparecimento da atividade CDC e ADCC e também uma redução de galactoses nesses N-glicanos causa um decréscimo na atividade CDC [Boyd et al., Molecular Immunol., 32, 1311, (1995); US6946292]. Além disso, é descri-

to que a expressão dos anticorpos em células de ratos resulta em uma atividade ADCC aumentada de certos anticorpos ali expressos [Lifely et al., Glycobiology, Dezembro de 1995; 5(8): 813-22; WO00/61739] em comparação com o mesmo anticorpo expresso em células de ratos e hamster. Ambos os

5 relatórios assumem que alterações na glicosilação causam diferenças na atividade ADCC do anticorpo, entretanto, isto não está claro. Lifely et al. 1995 assumem que a N-acetilglicosamina dividindo em duas partes ("bisec-GlcNAc") é responsável por uma atividade ADCC aumentada do anticorpo, enquanto que WO00/61739 assume que um decréscimo dramático de fucose

10 se alfa-1,6-ligada a N-acetilglicosamina na extremidade redutora de N-glicanos ("fucose central") é responsável por uma atividade ADCC aumentada. Além disso, é descrito que a expressão recombinante da enzima GnTIII em células CHO, a qual é responsável por ligar o açúcar bisecGlcNAc em N-glicanos resulta em um aumento da atividade ADCC de certos anticorpos

15 quando expressos nessas células em comparação com o mesmo anticorpo expresso em células CHO não-transfectadas recombinantemente com GbTIII [US 6602684, Umana et al., Nature Biotechn 17: 176-180 (1999)]. Adicionalmente, foi descrito que o knock-out do gene FUT8 em células CHO, o qual resulta na falta de fucose central pode aumentar a atividade ADCC de

20 certos anticorpos quando expressos em tais células CHO KO FUT8 [US 6946292]. Esses resultados também demonstram a importância e complexidade do padrão de glicosilação para a atividade do anticorpo.

Entretanto, um padrão de glicosilação não-otimizado "estrangeiro" pode não somente ser prejudicial para a atividade, mas também pode ser

25 imunogênico. Os atuais sistemas de produção e expressão para proteínas e, particularmente, anticorpos são principalmente linhagens celulares derivadas de roedores e são baseados em linhagens celulares de hamster, camundongos ou ratos, tais como CHO, BHK, NS0, Sp2/0 e YB2/0. Sabe-se que células de roedores podem produzir, sob condições não-ótimas, uma variedade

30 de produtos proteicos anormalmente glicosilados que não têm potência ou que sejam imunogênicos. Além disso, células de roedores são conhecidas por expressar estruturas de carboidratos com diferenças importantes para

aquelas expressas em células humanas compreendendo a presença de açúcares não-humanos e a falta de certas porções de açúcares não-humanos, a qual pode tornar as proteínas expressas nessas células, por exemplo, imunogênicas, menos eficazes, com menor rendimento ou com requerimentos estruturais subótimos ou dobradura. A maioria das células de roedores expressa, por exemplo, ácido N-glicolilneuramínico ("NeuGc"), uma alternativa para o ácido N-acetilneuramínico ("NeuNAc") não presente em seres humanos o qual é imunogênico em seres humanos e/ou a modificação da alfa(1-3) galactose, galactose imunogênica ("Gal alfa1-3Gal"), e/ou elas não têm carboidratos importantes, tal como NeuNAc alfa2-6 ligado ou elas não têm bisecGlcNAc. Também existem outras diferenças conhecidas e desconhecidas. Além disso, sabe-se a partir da produção de roedores que os perfis de glicoforma são na sua maioria heterogêneos e também o perfil de glicoforma clone-específico, o qual pode variar amplamente de clone para clone nas células CHO, NS0 ou Sp2/0 e são dependentes do modo de produção e condições de cultivo.

Além disso, sistemas de expressão existem para a produção de proteínas, os quais incorporam células humanas, tais como células Hek 293, as quais são derivadas das células de rim embrionárias humanas ou o sistema de células PerC6®, o qual é derivado de uma única célula derivada da retina humana, a qual foi propositalmente imortalizada usando tecnologia do DNA recombinante. Entretanto, essas linhagens celulares embora geralmente preferidas em relação aos sistemas celulares não-humanos, ainda têm algumas desvantagens. Elas têm um único padrão de glicosilação o qual é atribuível à maquinaria de glicosilação das células respectivas. Entretanto, dependendo da proteína a ser produzida, elas podem não distribuir um perfil de glicosilação otimizado, por exemplo, em relação à atividade e/ou meia-vida do soro da proteína. Particularmente, certo grau e padrão de sialilação é difícil de ser alcançado com essas células. Por exemplo, os sistemas celulares conhecidos no estado da técnica não são geralmente capazes de proporcionar uma sialilação alfa 2-6 ligada detectável, a qual, entretanto, é importante para a meia-vida do soro.

A partir desses fatos, fica claro que ainda há uma necessidade por sistemas de produção e expressão os quais podem ainda otimizar a produtividade, homogeneidade e/ou atividade do anticorpo proporcionando alternativas e/ou sistemas de expressão melhorados. Além disso, a partir desses fatos, também se torna claro que não pode ser dito quais estruturas de carboidratos e especialmente quais estruturas de carboidratos humanos são ótimas para melhorar a atividade ou homogeneidade das proteínas e, particularmente, de anticorpos e que tipo de padrão de glicosilação uma linhagem celular e especialmente uma linhagem celular humana tem que proporcionar para otimizar a atividade de uma proteína, particularmente de um anticorpo. Consequentemente, existe uma necessidade por sistemas de expressão, proporcionar produtos com um padrão de glicosilação divergente em comparação com os produtos obtidos com os sistemas de expressão conhecidos no estado da técnica.

A presente invenção proporciona soluções para esses problemas proporcionando novos sistemas de expressão baseados nas linhagens de células sanguíneas imortais humanas e, particularmente, células com origem leucêmica mieloide. O uso de células sanguíneas humanas imortalizadas é vantajoso em comparação com o sistema conhecido na técnica anterior porque essas células proporcionam um perfil de glicosilação diferente do que outros sistemas celulares humanos conhecidos derivados de diferentes tecidos (por exemplo, rim ou retina). Essas diferenças podem ser vantajosas em relação à atividade, homogeneidade e rendimento de produto. Além disso, essas células podem ser transfectadas e crescidas em suspensão sob condições sem-soro.

Deste modo, de acordo com uma primeira modalidade, um método para a produção de uma composição proteica é fornecido, compreendendo os seguintes passos:

- (a) introduzir em células hospedeiras, as quais são uma célula sanguínea humana imortalizada, pelo menos um ácido nucleico codificando pelo menos uma parte da referida proteína; e

- (b) cultivar a referida célula hospedeira sob condições as quais permitam a produção da referida composição proteica; e
- (c) isolar a referida composição proteica.

O método utilizando células sanguíneas humanas imortalizadas
 5 melhora a produção de proteínas e, particularmente, de anticorpos em relação à atividade, rendimento e/ou homogeneidade. Isto é surpreendente, uma vez que até agora não foi demonstrado que células sanguíneas humanas imortalizadas e, particularmente, células leucêmicas mieloides humanas são adequadas para a produção de proteínas e, particularmente, levam a anti-
 10 corpos com propriedades respectivamente melhoradas. Enquanto certa parede leucêmica de rato foi usada para a expressão dos anticorpos, a maquinaria de glicosilação entre seres humanos e ratos são criticamente diferentes, por meio do que a última pode expressar porções de carboidratos os quais podem ser imunogênicos em seres humanos, tal como a NeuGc e Gal
 15 alfa1-3 Gal. A célula leucêmica YB2/0 de rato foi descrita como produzindo anticorpos com atividade ADCC maior devido à maior presença de bisec-GlcNAc ou devido à infrarregulação drástica de fucose central.

Foi ainda mais surpreendente que o problema pôde ser solucionado por essa invenção usando células sanguíneas humanas imortalizadas
 20 e, particularmente, células mieloides, uma vez que foi anteriormente reportado que a linhagem celular K562 – uma célula leucêmica mielóide – não expressa a enzima para bisecGlcNAc, uma descoberta que foi descrita e demonstrada pela hibridização gênica de GnTIII [Yoshimura M et al., Cancer Res. 56(2): 412-8 (1996)] e expressa o gene FUT8, o qual expressa a fucosiltransferase, a qual causa adição de fucose central conforme demonstrado
 25 por RT-PCR [exemplo 1]. Foi surpreendente porque K562 não é resistente ao tratamento de lectina, uma vez que ela está ligada fortemente pela LCA de lectina, a base para as células negativas ou fortemente infrarregulada para fucosilação central. Devido a essa informação no perfil de glicosilação
 30 das células K 562, não poderia ser esperado que aquelas células pudessem melhorar a atividade dos anticorpos expressos ali, uma vez que foi assumido que a maquinaria de glicosilação necessária para um padrão de atividade

favorável não estava presente. Também foi surpreendente que proteínas e, particularmente, anticorpos com atividade de ligação melhorada, homogeneidade melhorada e/ou maiores rendimentos possam ser gerados e alcançados com o método de produção da presente invenção em comparação com as células dos atuais sistemas de expressão.

A estratégia da invenção é gerar linhagens de células humanas adequadas para obter um sistema, o qual possa proporcionar produtos proteicos com um grupo inteiro de modificações pós-tradução o mais próximo possível do sistema humano, e deste modo propriedades não ou menos imunogênicas e/ou atividade melhorada no sistema humano. O objetivo é proporcionar um padrão de glicosilação feito sob medida para cada proteína/anticorpo a ser expresso.

Devido ao fato de que as estruturas dos carboidratos são muito complexas, de que a maquinaria de glicosilação das células compreende várias centenas de enzimas as quais estão envolvidas nas suas sínteses e que aquelas enzimas são principalmente espécies específicas e expressas por tecidos específicos, a principal estratégia dos inventores para obter uma glicosilação humana é proporcionar sistemas de expressão biotecnologicamente humanos adequados para expressar proteínas e, particularmente, anticorpos, com um padrão de glicosilação otimizado. Uma vez que o padrão de glicosilação otimizado pode diferir de proteína para proteína e de anticorpo para anticorpo, a invenção proporciona linhagens celulares produzindo diferentes padrões de glicosilação, permitindo dessa forma a seleção da linhagem celular para produção, a qual produz um padrão de glicosilação otimizado para o respectivo produto de proteína/anticorpo.

Deste modo, a invenção proporciona métodos biotecnologicamente favoráveis para a produção de composições proteicas e, particularmente, de composições de moléculas de anticorpo com atividade aumentada e/ou rendimento aumentado e/ou homogeneidade aumentada e glicosilação totalmente humana. Ela ainda proporciona novas células hospedeiras, ácidos nucleicos e composições de moléculas.

Deste modo, um método para a produção de uma composição

proteica, preferivelmente uma composição de molécula de anticorpo com um padrão de glicosilação definido é fornecida, compreendendo as seguintes etapas:

- 5 (a) introduzir em uma célula sanguínea humana imortalizada como célula hospedeira pelo menos um ácido nucleico co-dificando uma proteína ou pelo menos uma parte da mesma; e
- (b) cultivar a referida célula hospedeira sob condições as quais permitam a produção da referida composição proteica; e
- 10 (c) isolar a referida composição proteica com as características de glicosilação tencionadas.

Para obter uma composição proteica e particularmente uma composição de anticorpo com propriedades melhoradas de acordo com a presente invenção, a célula hospedeira é selecionada para produzir uma
15 composição de proteína/anticorpo com pelo menos uma das seguintes características de glicosilação:

- (i) ela não compreende NeuGc detectável.

Conforme foi esboçado acima, uma glicosilação NeuGc pode ter propriedades imunogênicas em seres humanos. Deste modo, é desejável
20 evitar a glicosilação respectiva o tanto quanto for possível. Uma glicosilação respectiva é evitada pelo uso de células sanguíneas humanas imortalizadas e, particularmente, pelo uso de uma célula hospedeira de origem leucêmica mieloide humana.

- (ii) ela tem um grau de glicosilação nas estruturas de carboidrato
25 totais ou nas estruturas de carboidrato em um sítio de glicosilação particular da molécula proteica das moléculas de proteína na referida composição de molécula proteica que é aumentado em comparação com a mesma quantidade de moléculas de proteína em pelo menos uma composição de molécula proteica da mesma molécula proteica isolada de CHOdhfr-[ATCC No.
30 CRL-9096] quando ali expressa.

Os resíduos de galactose são encontrados principalmente beta 1-4 ligados aos resíduos de GlcNAc nas antenas do complexo tipo N-glicano

dos anticorpos, porém também ligações beta-1,3 foram encontradas. Entretanto, eles geralmente ocorrem em estruturas triantenadas. A influência do grau de galactosilação na atividade está particularmente envolvendo anticorpos notáveis. Foi demonstrado que a depleção de galactose leva à atividade CDC reduzida. Deste modo, pode ser preferível ter um alto grau de galactosilação. A galactosilação também pode desempenhar um papel importante para outras proteínas.

Ao se referir à estrutura de carboidrato total de uma molécula de proteína, todas as glicosilações da molécula proteica são consideradas. No caso das estruturas de carboidrato em um sítio de glicosilação particular da molécula proteica a ser analisada, o foco se baseia em estrutura(s) de carboidrato específica(s), tal(is) como, por exemplo, a(s) estrutura(s) de carboidrato ligada(s) ao Asn 297 da parte Fc de uma molécula de anticorpo (favor se referir à figura 18). No caso de uma estrutura específica respectiva ser avaliada, o teor/composição dessa estrutura específica é determinado. Alguém também poderia se referir às unidades de carboidrato totais e às cadeias de carboidrato particulares para definir as referidas características (são sinônimos).

(iii) ela tem uma quantidade de estruturas G2 nas estruturas de carboidrato total ou nas estruturas de carboidrato em um sítio de glicosilação particular da molécula proteica das moléculas de proteína na referida composição de molécula proteica a qual é pelo menos 5% mais alta em comparação com a mesma quantidade de moléculas de proteína em pelo menos uma composição de molécula proteica da mesma molécula proteica isolada a partir de CHOdhfr-[ATCC No. CRL-9096] quando ali expressa.

Particularmente, no caso de um anticorpo ser produzido de acordo com os métodos da presente invenção, uma alta quantidade de estruturas G2 é benéfica. Uma "estrutura G2" define um padrão de glicosilação em que galactose é encontrada em ambas as extremidades da estrutura bi-antenada ligada à região Fc no caso de um anticorpo (favor se referir à figura 18). Se uma molécula de galactose for encontrada, ela é chamada de estrutura G1, se não houver galactose, ela é chamada de estrutura G0. Um

padrão de glicosilação G2 foi comumente considerado como melhorando CDC dos anticorpos. Deste modo, é preferível que pelo menos uma quantidade 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 85%, 95% ou mesmo mais de 100% maior de estruturas G2 esteja presente na composição de proteína/anticorpo produzida. Linhagens celulares adequadas alcançando um alto padrão de glicosilação G2 respectivo são aqui descritas.

Uma vez que um grau de galactosilação global é geralmente benéfico para CDC dos anticorpos, é geralmente preferível obter 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% ou mesmo mais do que 95% de estruturas G2 e/ou estruturas G1 nas estruturas de carboidratos total ou nas estruturas de carboidratos em um sítio de glicosilação particular da proteína, particularmente uma molécula de anticorpo.

De acordo com outra modalidade, mais de 35% (40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65% ou mais de 70%) de estruturas G2 está presente nas estruturas de carboidratos total ou nas estruturas de carboidratos em um sítio de glicosilação particular da molécula proteica das moléculas de proteína na referida composição proteica.

(iv) ela tem uma quantidade de estruturas G0 nas estruturas de carboidrato total ou nas estruturas de carboidrato em um sítio de glicosilação particular da molécula proteica das moléculas de proteína na referida composição de molécula proteica a qual é pelo menos 5% mais baixa em comparação com a mesma quantidade de moléculas de proteína em pelo menos uma composição de molécula proteica da mesma molécula proteica isolada a partir de CHOdhfr-[ATCC No. CRL-9096] quando ali expressa.

Conforme esboçado acima, um alto grau de galactosilação é geralmente vantajoso. Deste modo, as linhagens celulares são preferivelmente selecionadas de modo que estruturas G0 sejam evitadas. A quantidade de estruturas G0 é preferivelmente menor do que 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% ou a quantidade é ainda mais baixa.

De acordo com outra modalidade, menos de 22% (20%, 18%, 15%, 12%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, menos de 5%) de estruturas G0 estão

presentes nas estruturas de carboidratos total ou nas estruturas de carboidratos em um sítio de glicosilação particular da molécula de proteína das moléculas proteicas na referida composição proteica.

(v) ela não compreende Galalpha1-3Gal terminal detectável.

5 Conforme foi resumido acima, uma glicosilação Galalpha1-3Gal pode ser imunogênica em seres humanos. Essa glicosilação caracteriza um padrão, em que um segundo resíduo de galactose está ligado na posição alfa-1,3 ao primeiro resíduo de galactose, resultando no dissacarídeo gal-
10 alfa 1-3 Gal altamente imunogênico. Através do uso de células sanguíneas humanas imortalizadas e particularmente de uma célula hospedeira de origem leucêmica mieloide humana, uma glicosilação desvantajosa respectiva é evitada.

(vi) ela compreende uma quantidade de fucose nas estruturas de carboidrato total ou nas estruturas de carboidrato em um sítio de glicosilação particular da molécula proteica das moléculas de proteína na referida
15 composição de molécula proteica a qual é pelo menos 5% menor em comparação com a mesma quantidade de moléculas de proteína em pelo menos uma composição de molécula proteica da mesma molécula proteica isolada a partir de CHOdhfr-[ATCC No. CRL-9096] quando ali expressa.

20 Resíduos de fucose são encontrados em diferentes sítios na árvore N-glicano, particularmente:

- alfa 1,6 ligado ao resíduo GlcNAc próximo da fita de aminoácidos;

25 - alfa 1,3 e alfa 1,4 ligado ao resíduo GlcNAc localizado na antena;

- alfa 1,2 ligado ao resíduo Gal localizado na antena.

No anticorpo ligado aos N-glicanos a grande maioria dos resíduos de fucose é encontrada 1,6 ligada ao resíduo GlcNAc próximo (chamado de "fucose central"). Foi descoberto que a ausência da fucose central na
30 extremidade redutora do N-glicano ligado aos anticorpos aumenta a atividade ADCC dos anticorpos por um fator de 25 a 100. Devido a este efeito benéfico em ADCC, é preferível que a quantidade de fucose seja pelo menos

10%, 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 150%, 200%, 250%, 300%, 400%, 500%, 1000%, 1500% ou mais de 2000% menor em comparação com a mesma quantidade de moléculas de proteína em pelo menos uma composição de moléculas proteicas em pelo menos uma composição de moléculas proteicas da mesma molécula de proteína isolada de CHOdhfr-[ATCC No. CRL-9096] quando ali expressa. A presente invenção também proporciona linhagens celulares especialmente projetadas, as quais alcançam uma fucosilação global respectiva baixa.

De acordo com outra modalidade, a referida célula hospedeira é selecionada para produzir uma glicoproteína, compreendendo pelo menos 10% (15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75% ou mais de 80%) de carboidratos das estruturas de carboidrato totais ou de pelo menos uma estrutura de carboidrato particular em um sítio de glicosilação particular da molécula de proteína das referidas moléculas proteicas na referida composição de moléculas de proteína, as quais não têm fucose. Em relação aos anticorpos, é particularmente preferido que as cadeias de carboidratos ligadas ao N-glicosídeo ligadas à região Fc compreendem uma extremidade redutora compreendendo GlcNAc, em que as cadeias de carboidratos não contêm fucose ligada à posição 6 de GlcNAc na extremidade redutora da cadeia de carboidratos.

(vii) ela compreende pelo menos uma estrutura de carboidratos contendo GlcNAc bifurcado.

N-acetilglicosamina bifurcada (bisGlcNAc) é geralmente encontrada beta 1,4 ligada ao resíduo de manose central da estrutura central de tri-manosil das N-glicanas encontradas nos anticorpos. A presença de GlcNAc bifurcada no resíduo de manose central do anticorpo Fc-N-glicano aumenta a atividade ADCC dos anticorpos.

De acordo com outra modalidade, a referida célula hospedeira é selecionada de modo que a referida proteína produzida compreenda mais estruturas de carboidratos das unidades do carboidrato total (ou de pelo menos uma cadeia de carboidrato particular em um sítio de glicosilação particular da molécula de proteína) das moléculas de proteína na referida composi-

ção de molécula proteica sem conter fucose e sem GlcNAc bifurcado do que aquelas estruturas de carboidratos respectivas as quais contêm GlcNAc bifurcado e sem-fucose.

De acordo com outra modalidade, a referida célula hospedeira é
5 selecionada de modo que a referida proteína produzida compreenda mais estruturas de carboidratos das unidades do carboidrato total (ou de pelo menos uma cadeia de carboidrato particular em um sítio de glicosilação particular da molécula de proteína) das moléculas de proteína na referida composição de molécula proteica contendo mais GlcNAc bifurcada e fucose do que
10 aquelas estruturas de carboidratos respectivas as quais contêm GlcNAc bifurcado e sem-fucose.

(viii) ela tem um padrão de sialilação o qual é alterado em comparação com o padrão de sialilação de pelo menos uma composição de molécula proteica da mesma molécula proteica isolada de CHOdhfr-[ATCC No.
15 CRL-9096] quando ali expressa.

A influência do grau/padrão de sialilação na atividade, meia-vida e biodisponibilidade difere entre diferentes proteínas/anticorpos. Deste modo, é benéfico determinar para cada molécula de proteína/anticorpo o padrão de sialilação otimizado antecipadamente através do método de varredura de acordo com a presente invenção, antes de estabelecer a produção com a célula hospedeira mais adequada, fornecendo o padrão de glicosilação desejado. Por exemplo, várias publicações existem reportando o impacto negativo dos resíduos de ácido siálico presentes no Fc glicano dos anticorpos em efeitos a jusante, isto é, CDC e ADCC. Entretanto, foi descoberto
20 que uma elevada sialilação prolonga a meia-vida das moléculas sialiladas. Deste modo, dependendo da proteína/anticorpo produzido, um diferente padrão de sialilação poderia ser vantajoso e a presente invenção fornece linhagens de células sanguíneas humanas imortalizadas com diferentes atividades de sialilação, permitindo dessa forma obter proteínas/anticorpos des-
25 crevendo um padrão de glicosilação otimizado.
30

De acordo com uma modalidade, a célula hospedeira é selecionada de modo que ela produza uma proteína, com um grau de sialilação re-

duzido com uma quantidade pelo menos 10% (preferivelmente 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, >95%) menor de ácidos siálicos nas estruturas de carboidrato totais ou nas estruturas de carboidratos em um sítio de glicosilação particular da molécula de proteína das moléculas proteicas na referida composição de moléculas proteicas do que a mesma quantidade de moléculas proteicas em pelo menos uma composição de moléculas de proteína da mesma molécula proteica isolada de CHOdhfr- [ATCC No. CRL-9096] quando ali expressa. De acordo com uma modalidade, o produto compreende até mesmo nenhum NeuNAc detectável. Dependendo da proteína/anticorpo produzido, a presença de ácidos siálicos e particularmente NeuNAc pode não contribuir para a atividade da proteína/anticorpo. Nesses casos, pode ser favorável evitar a glicosilação dos ácidos siálicos para tornar o produto mais homogêneo. Isto uma vez que o padrão de glicosilação de NeuNAc pode também variar na composição proteica resultante. Isso pode causar dificuldades na aprovação regulatória do produto porque este ocorre devido à variação do teor de NeuNAc menos homogênea.

Para proteínas/anticorpos os quais não se baseiam na presença de uma glicosilação NeuNAc para as suas atividades, uma evitação de glicosilação NeuNAc pode ser benéfica para aumentar a homogeneidade. Entretanto, "nenhum NeuNAc detectável" não significa necessariamente que não existe absolutamente NeuNAc presente. De modo contrário, também as modalidades estão englobadas, as quais tem antes um grau mais baixo de NeuNAc (por exemplo, de 1 a 10%). Um exemplo de uma proteína respectiva é a FSH.

De acordo com uma modalidade, o produto tem um grau de sialilação reduzido com uma quantidade pelo menos 15% (20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 150%, 200%, 250%, 300%, 350%, 400%, 450%, >500%) menor de NeuNAc nas estruturas de carboidrato totais ou nas estruturas de carboidratos em um sítio de glicosilação particular da molécula de proteína das moléculas proteicas na referida composição de moléculas proteicas do que a mesma quantidade de moléculas proteicas de

pelo menos uma composição de moléculas de proteína da mesma molécula proteica isolada de CHOdhfr- [ATCC No. CRL-9096] quando ali expressa. Essa modalidade é benéfica no caso de uma proteína/anticorpo ser suspeito de ser expresso, em que a sialilação tem um efeito negativo na atividade da proteína/anticorpo.

Uma glicosilação respectiva (ausência ou grau muito baixo de ácido siálico ou particularmente NeuNAc) pode ser alcançada pelo uso de células deficientes de sialilação, tais como NM-F9 e NM-D4 em um meio sem-soro.

De acordo com outra modalidade, o produto tem um grau de sialilação aumentado com uma quantidade de NeuNAc nas estruturas de carboidrato totais ou nas estruturas de carboidratos em um sítio de glicosilação particular da molécula de proteína das moléculas proteicas na referida composição de molécula de proteína a qual é pelo menos 15% (20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 150%, 200%, 250%, 300%, 350%, 400%, 450% ou mais de 500%) maior em comparação com a mesma quantidade de moléculas proteicas em pelo menos uma composição de moléculas de proteína da mesma molécula proteica isolada de CHOdhfr- [ATCC No. CRL-9096] quando ali expressa.

Conforme foi resumido acima, um grau aumentado respectivamente de sialilação pode proporcionar um efeito positivo da meia-vida no soro da proteína através de seu prolongamento. Nesses casos, é preferível usar uma linhagem celular a qual proporcione um grau mais alto de sialilação do que o alcançado nas células CHOdhfr- [ATCC No. CRL-9096] e o qual também proporcione um grau mais elevado de sialilação do que o alcançado nas células deficientes de sialilação (tais como, por exemplo, NM-F9 e NM-D4), em que um precursor precisa ser adicionado para permitir que a sialilação ocorra. Entretanto, mesmo se um precursor respectivo for adicionado durante o crescimento dessas células deficientes de sialilação, essas células geralmente não alcançam cerca de 50 a 60% do grau de sialilação que é obtido com as células sanguíneas humanas imortalizadas sem mutação/defeito genético na maquinaria de glicosilação necessária para a

sialilação. Deste modo, para modalidades, em que um grau mais alto de sialilação é objetivado, é preferível usar linhagens celulares capazes de proporcionar um respectivo alto grau de sialilação e não usar NM-F9 e nem NM-D4.

5 De acordo com outra modalidade, o produto compreende NeuNAc alfa 2-6 ligado. Adicionalmente, NeuNAc alfa2-3 ligado pode estar presente a algum grau. Em relação a algumas proteínas/anticorpos, a presença de uma glicosilação NeuNAc é benéfica particularmente em relação à meia-vida da proteína/anticorpo. Para fornecer uma NeuNAc alfa 2-6 ligada benéfica, uma vez que esse padrão de glicosilação lembra um padrão de glicosilação humano. As células dos roedores geralmente proporcionam uma NeuNAc alfa 2-3 ligada. Também outras linhagens celulares humanas existentes não são capazes de proporcionar uma NeuNAc glicosilação alfa 2-6 ligada suficiente.

15 São linhagens celulares adequadas para proporcionar um padrão de glicosilação respectivo NM-H9D8 e NM-H9D8-E6.

De acordo com outra modalidade, uma célula hospedeira é usada, a qual produz uma proteína compreendendo pelo menos 20% a mais de cadeias de carboidrato N-glicosidicamente ligadas carregadas das unidades de carboidrato totais ou de pelo menos uma cadeia de carboidrato particular em um sítio de glicosilação particular da molécula de proteína das referidas moléculas proteicas na referida composição de molécula proteica em comparação com a mesma quantidade de moléculas de proteína em pelo menos uma composição de moléculas proteicas da mesma molécula de proteína isolada de CHOdhfr- [ATCC No. CRL-9096] quando ali expressa.

25 O perfil de carga de uma cadeia de carboidratos pode também influenciar as propriedades e deve ser, deste modo, considerado. Grupos químicos com cadeias de carboidrato carregadas são, por exemplo, grupos sulfurosos ou ácido siálico.

30 De acordo com uma modalidade alternativa, o referido produto compreende pelo menos 20% a menos de cadeias de carboidrato N-glicosidicamente ligadas carregadas das unidades de carboidrato totais ou

de pelo menos uma cadeia de carboidrato particular em um sítio de glicosilação particular da molécula de proteína das referidas moléculas proteicas na referida composição de molécula proteica em comparação com a mesma quantidade de moléculas de proteína em pelo menos uma composição de moléculas proteicas da mesma molécula de proteína isolada de CHOdhfr- [ATCC No. CRL-9096] quando ali expressa.

De acordo com outra modalidade, a referida célula hospedeira é selecionada para produzir uma glicoproteína, compreendendo pelo menos 2% (5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40% ou mais de 45%) de estruturas de carboidratos das unidades de carboidratos totais ou de pelo menos uma cadeia de carboidratos particular em um sítio de glicosilação particular da molécula de proteína das moléculas proteicas na referida composição de molécula de proteína a qual contém GlcNAC bifurcado.

De acordo com uma modalidade, uma célula hospedeira é usada para a produção da proteína, a qual apresenta as seguintes propriedades

- ela tem uma atividade aumentada, rendimento aumentado e/ou homogeneidade aumentada em comparação com pelo menos uma composição da molécula de proteína da mesma molécula de proteína quando expressa na linhagem celular CHOdhfr- [ATCC No. CRL-9096]; e/ou

- ela tem uma média aumentada ou rendimento máximo o qual é pelo menos 10% maior do que o rendimento de pelo menos uma composição de molécula proteica para a mesma molécula de proteína quando expressa na linhagem celular CHOdhfr- [ATCC No. CRL-9096]; e/ou

- ela tem uma homogeneidade melhorada, a qual é uma homogeneidade de glicosilação melhorada em que a composição de molécula do anticorpo tem um grau de sialilação menor do que o grau de sialilação de pelo menos uma composição da molécula do anticorpo a partir da mesma molécula de anticorpo quando expressa na linhagem celular CHOdhfr-[ATCC No. CRL-9096]; e/ou

- no caso da referida molécula proteica ser uma molécula de anticorpo, ela tem uma citotoxicidade celular mediada por Fc aumentada a qual é pelo menos 2 vezes maior do que a citotoxicidade celular mediada por Fc

de pelo menos uma composição da molécula de anticorpo a partir da mesma molécula de anticorpo quando expressa na linhagem celular CHOdhfr-[ATCC No. CRL-9096]; e/ou

- 5 - no caso da molécula de proteína ser uma molécula de anticorpo, ela tem uma ligação mediada por Fc ou mediada por antígeno aumentada a qual é pelo menos 50% maior do que a ligação de pelo menos uma composição da molécula de anticorpo a partir da mesma molécula de anticorpo quando expressa na linhagem celular CHOdhfr- [ATCC No. CRL-9096].

- 10 Conforme foi resumido acima, as propriedades respectivas podem ser obtidas através da otimização da glicosilação da proteína, conforme aqui descrito. Foi surpreendente observar que também o perfil de ligação pode ser alterado e melhorado com algumas modalidades baseando-se no perfil de glicosilação. Células hospedeiras adequadas também são aqui descritas.

De acordo com outra modalidade, a homogeneidade melhorada da referida composição da molécula de proteína é uma homogeneidade de glicosilação melhorada da referida composição de molécula proteica compreendendo pelo menos uma das seguintes características:

- 20 - sem NeuGc detectável;
 - sem NeuNAc detectável;
 - mais NeuNAc do que uma composição de molécula proteica a partir da mesma molécula proteica quando expressa na linhagem celular CHOdhfr-[ATCC No. CRL-9096];
- 25 - NeuNAc alfa 2-6 ligado detectável.

De acordo com outra modalidade, a referida célula hospedeira é selecionada para produzir uma composição proteica compreendendo moléculas de proteína com um dos seguintes padrões de glicosilação característicos:

- 30 (a)
 - ela não compreende NeuGc detectável;
 - ela não compreende Galalfa1-3Gal detectável;

- ela compreende um padrão de galactosilação conforme definido na reivindicação 2;
- ela tem um teor de fucose conforme definido na reivindicação 2;
- 5 - ela compreende bisecGlcNAc;
- ela compreende uma quantidade aumentada de ácido siálico em comparação com uma composição proteica da mesma molécula proteica quando expressa na linhagem celular CHOdhfr-[ATCC No. CRL-9096] ou em comparação com uma linhagem celular deficiente de sialilação, tal como
- 10 NM-F9 e NM-D4.
- (b)
- ela não compreende NeuGc detectável;
- ela não compreende Galalpha1-3Gal detectável;
- ela compreende um padrão de galactosilação conforme definido na reivindicação 2;
- 15 - ela tem um teor de fucose conforme definido na reivindicação 2;
- ela compreende bisecGlcNAc;
- ela compreende uma quantidade reduzida de ácido siálico em
- 20 comparação com uma composição proteica da mesma molécula proteica quando expressa na linhagem celular CHOdhfr-[ATCC No. CRL-9096].
- (c)
- ela não compreende NeuGc detectável;
- ela não compreende Galalpha1-3Gal detectável;
- 25 - ela compreende um padrão de galactosilação conforme definido na reivindicação 2;
- ela tem um teor de fucose conforme definido na reivindicação 2;
- ela compreende bisecGlcNAc;
- 30 - ela compreende 2-6 NeuNAc.

Outras combinações de características adequadas que levam a características melhoradas estão descritas na Tabela 9.

De acordo com a presente invenção, o termo "molécula proteica" significa a proteína de interesse ou fragmentos ativos e/ou mutantes seus, por meio dos quais uma proteína pode ser usada, preferivelmente qualquer glicoproteína de origem humana. O termo molécula proteica significa qual-
5 quer molécula de polipeptídeo ou uma parte da mesma. Ela pode ser codificada por um ou vários ácidos nucleicos. Ela pode ser produzida de um modo secretório ou uma fração sua ou uma proteína de fusão com um parceiro de fusão. Preferivelmente, a proteína é secretada no sobrenadante. Essa modalidade é particularmente benéfica considerando o processo de produção glo-
10 bal, como, por exemplo, as etapas de derramamento (por exemplo, com ésteres forbol) podem ser evitados.

Exemplos de glicoproteínas de mamíferos incluem moléculas, tais como citocinas e seus receptores, por exemplo, os fatores de necrose tumoral TNF-alfa e TNF-beta; renina; hormônio do crescimento humano e
15 hormônio do crescimento bovino; fator de liberação do hormônio de crescimento; hormônio de paratireoide; hormônio estimulador da tireoide; lipoproteínas; alfa-1-antitripsina; cadeia A e cadeia B de insulina; gonadotrofinas, por exemplo, hormônio folículo estimulante (FSH), hormônio luteinizante (LH), tirotrofina e gonadotrofina coriônica humana (hCG); calcitonina; glucagon; fatores de coagulação, tais como fator VIIC, fator IX, fator VII, fator te-
20 cidual e fator de Von Willebrands; fatores anticoagulantes tal como proteína C; fator natriurético atrial; tensoativo pulmonar; ativadores do plasminogênio, tal como uroquinase, ativador do plasminogênio tipo tecidual e urina humana; bombesina; trombina; fator do crescimento hematopoiético; encefalinase;
25 proteína inflamatória do macrófago humano; albumina do soro, tal como albumina do soro humana; substância inibidora de Müller; cadeia A e cadeia B da relaxina; prorrelaxina; peptídeo associado à gonadotrofina de camundongo; fator de crescimento endotelial vascular; receptores de hormônios ou fatores de crescimento; integrina; proteína A e D; fatores da reumatoide; fa-
30 tores neurotróficos tais como fator neurotrófico derivado ósseo, neurotrofina 3, 4, 5, 6 e beta-fator de crescimento de nervos; fator de crescimento derivado de plaquetas; fatores de crescimento do fibroblasto; fator de crescimento

epidérmico; fator transformador de crescimento, tal como TGF-alfa e TGF-beta; fator de crescimento tipo insulina I e II; proteínas de ligação ao fator de crescimento tipo insulina; proteínas CD, tal como CD-3, CD-4, CD-8 e CD-19; eritropoietina (EPO); fatores osteoindutores; imunotoxinas; uma proteína morfogénica óssea; um interferon, tal como interferon alfa, beta e gama; fatores estimuladores de colônia (CSFs); por exemplo, M-CSF, GM-CSF e G-CSF; interleucinas (ILs), por exemplo, IL-1 até IL-12; superóxido desmutase; receptores de células T; proteínas da membrana de superfície; fator acelerador de decaimento/ anticorpos e imunoadesinas; glicoforina A; MUC1.

Muitas das glicoproteínas acima mencionadas pertencendo às citocinas aqui se referindo à classe geral de hormônios ocorrendo nas células do sistema imune, tanto linfocinas quanto monocinas, e outros. A definição é tencionada a incluir, porém não está limitada, àqueles hormônios que agem localmente e que não circulam no sangue, e os quais, quando usados de acordo com a presente invenção, irão resultar na aceleração da resposta imune individual. Exemplos de outras citocinas imunomodulatórias adequadas incluem, porém não estão limitados, aos interferons (por exemplo, IFN-alfa, IFN-beta e IFN-gama), interleucinas (por exemplo, IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10 e IL-12), fatores de necrose tumoral (por exemplo, TNF-alfa e TNF-beta), eritropoietina (EPO), ligante FLT-3, fator estimulante de colônias de macrófago (M-CSF), fator estimulante de colônia de granulócito (G-CSF), fator estimulante de colônia de granulócito-macrófago (GM-CSF), CD2 E ICAM. Tomando-se a eritropoietina, acredita-se que a molécula faça com que as células progenitoras amadureçam nos eritrócitos, enquanto que se acredita que a trombopoietina direcione as células progenitoras ao longo da via trombocítica. CSF se refere a uma família de linfocinas as quais incluem as células progenitoras encontradas na medula óssea para se diferenciarem em tipos específicos de células sanguíneas maduras. O tipo particular de célula sanguínea madura que resulta de uma célula progenitora depende do tipo de CSF presente. Semelhantemente, a formação de colônias de granulócito-macrófago é dependente da presença de GM-CSF. Adicionalmente, as citocinas de outros mamíferos com homologia substanci-

al às formas humanas de IL-2, GM-CSF, TNF-alfa e outras serão úteis na invenção quando demonstradas como exibindo atividade similar no sistema imune. Moléculas de adesão ou acessórias ou suas combinações podem ser empregadas sozinhas ou em combinação com as citocinas.

5 Semelhantemente, as proteínas que são substancialmente análogas a qualquer proteína particular, porém apresentam alterações relativamente mínimas da sequência de proteína, irão encontrar uso na presente invenção. É bem sabido que algumas pequenas alterações na sequência de aminoácidos na sequência proteica podem ser geralmente possíveis sem
10 perturbar as capacidades funcionais da molécula proteica, e deste modo as proteínas podem ser feitas do modo da função das proteínas paternas na presente invenção, porém diferindo levemente das sequências atualmente conhecidas. Variantes respectivas mantendo a função biológica são deste modo também incluídas.

15 Glicoproteínas preferidas são selecionadas do grupo consistindo em glicoforina A, EPO, G-CSF, GM-CSF, FSH, hCG, LH, interferons, interleucinas, anticorpos e/ou fragmentos seus.

Todas as moléculas proteicas mencionadas acima podem ser fundidas com outras sequências peptídicas ou polipeptídicas tais como, porém sem se limitar, a ligantes, moléculas ativantes ou toxinas.
20

Em uma modalidade preferida da invenção, o ácido nucleico codifica uma forma secretória da proteína ou fragmento seu. Em uma modalidade preferida, a forma secretória não tem domínios transmembranares.

De acordo com a presente invenção, o termo "composição de
25 molécula proteica" significa as moléculas de qualquer molécula proteica expressas de acordo com os métodos da presente invenção e, particularmente, em uma célula hospedeira da invenção a qual possa ser isolada. A referida composição de molécula proteica compreende pelo menos uma molécula proteica. A referida composição proteica compreende pelo menos uma glico-
30 forma de uma molécula proteica. A referida glicoforma de uma molécula proteica significa uma molécula proteica a qual carregue uma glicosilação particular ou cadeia de carboidrato a qual seja diferente em pelo menos um bloco

de construção de açúcar, por exemplo, porém sem se limitar, a uma galactose, ácido siálico, bisecGlcNAc, fucose ou outra modificação de açúcar adicional, tal como, porém sem se limitar, a acetilação ou sulfatação de outra glicoforma da mesma molécula proteica. Em outra modalidade da invenção,

5 a composição da molécula proteica pode compreender moléculas de mais de uma molécula proteica expressa em uma célula hospedeira. Em uma modalidade preferida, a composição da molécula proteica da invenção compreende mais moléculas em porcentagem de tal glicoforma ou tais glicoformas da molécula proteica, a qual medeia uma atividade mais elevada do que

10 uma composição de molécula proteica da mesma molécula de proteína obtida a partir de pelo menos uma das linhagens celulares CHO, ou CHOdhfr-, ou BHK, ou NSO, ou SP2/0, ou PerC.6 ou hibridoma de camundongo, preferivelmente CHOdhfr-[ATCC No. CRL-9096], quando ali expresso. Em outra modalidade preferida, a composição da molécula proteica da invenção com-

15 preende mais moléculas de tal glicoforma ou glicoformas da molécula proteica em uma porcentagem a qual medeia uma atividade maior do que a composição da molécula proteica da mesma molécula proteica obtida a partir das linhagens celulares CHO, ou CHOdhfr-, ou BHK, ou NSO, ou SP2/0 ou PerC.6 ou hibridoma de camundongo, preferivelmente CHOdhfr- [ATCC No.

20 CRL-9096], quando ali expressos.

De acordo com a presente invenção, o termo "molécula de anticorpo" significa qualquer anticorpo inteiro ou fragmento de anticorpo ou uma molécula compreendendo um fragmento de anticorpo. O referido anticorpo inteiro pode ser qualquer anticorpo ou molécula de imunoglobulina de qual-

25 quer classe ou subclasse ou qualquer molécula compreendendo pelo menos um domínio de imunoglobulina conhecido pelas pessoas versadas na técnica compreendendo, porém sem se limitar, a IgG, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA, IgD de origem animal, tal como, porém sem se limitar, a seres humanos, símios, roedores, camundongos, rato, hamster, coelho, camelo, a-

30 ves, galinhas ou de origem de tubarões, e também pode ser uma molécula a qual compreenda sequências de proteínas a partir de anticorpos que se originem de vários animais, tais como anticorpos quiméricos ou humanizados

onde várias porcentagens de, por exemplo, sequências de murino e humanas são combinadas em, anticorpos inteiros e/ou são modificadas, por exemplo, para reduzir a imunogenicidade ou aumentar a afinidade conforme é conhecido pelas pessoas versadas na técnica. Em outra modalidade da invenção, o referido anticorpo inteiro pode também ser o anticorpo inteiro acima descrito com pelo menos uma sequência polipeptídica ou de aminoácido adicional.

Em uma modalidade preferida, o referido anticorpo inteiro é um ser humano, humanizado ou IgG, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, ou IgM, o qual compreende uma região Fc humana. Em uma modalidade ainda mais preferida da invenção, o referido anticorpo inteiro é um ser humano, humanizado ou IgG1, IgG4 ou IgM com uma região Fc humana. A referida região Fc humana compreende pelo menos uma sequência de 20 aminoácidos, mais preferivelmente de pelo menos 100 aminoácidos de um domínio constante da região Fc de um anticorpo humano, preferivelmente ela compreende pelo menos um domínio Fc de um anticorpo humano, mais preferivelmente ela compreende o domínio Cgamma2 humano, e mais preferivelmente ela compreende todos os domínios constantes da região Fc de um anticorpo humano de certa classe ou subclasse. A referida região Fc humana também pode compreender sequências humanas das quais pelo menos um aminoácido tenha sido modificado.

Na modalidade mais preferida da invenção, a molécula de anticorpo inteira é ou (i) um anticorpo humano completo gerado, por exemplo, de um anticorpo humano produzindo células sanguíneas ou células ou de um camundongo transgênico no qual o local do gene do anticorpo de camundongo é pelo menos parcialmente trocado pelas sequências de anticorpo humano, ou (ii) um anticorpo inteiro humanizado no qual pelo menos partes das regiões variáveis de um anticorpo de rato ou murino, tais como as regiões estruturais de pelo menos um aminoácido e uma estrutura, foram trocados com sequências humanas ou modificadas para serem menos imunogênicos em seres humanos, o qual compreende domínios constantes humanos, ou (iii) um anticorpo inteiro quimérico no qual a região variável é de

murino ou rato e compreende domínios constantes humanos.

Os referidos anticorpos completamente humanos, anticorpos inteiros humanizados e anticorpos inteiros quiméricos ou suas partes, assim como os métodos para construir, identificar, testar, otimizar e selecionar essas moléculas de anticorpo com ou sem sequências adicionais adequadas, assim como métodos para construir, identificar, testar e selecionar a maioria dos ácidos nucleicos adequados codificando essas moléculas de anticorpo são conhecidos pelas pessoas versadas na técnica.

O referido fragmento e anticorpo é qualquer fragmento de um anticorpo compreendendo pelo menos 20 aminoácidos do referido anticorpo inteiro, preferivelmente pelo menos 100 aminoácidos. Em uma modalidade preferida, o fragmento de anticorpo compreende a região ligante do anticorpo, tal como Fab, um $F(ab)_2$, multicorpos compreendendo múltiplos domínios de ligação tais como diacorpos, triacorpos ou tetracorpos, aficorpos ou anticorpos de domínio único. Em outra modalidade preferida, o fragmento de anticorpo compreende a região Fc com todo ou partes dos seus domínios constantes, preferivelmente compreendendo o segundo domínio (domínio C γ 2). Em outra modalidade, o fragmento de anticorpo é um anticorpo inteiro cortado onde pelo menos um aminoácido, trechos polipeptídicos ou domínios inteiros são anulados. Aquelas moléculas podem ser combinadas com sequências adicionais para estabilização ou para melhorar a ligação das moléculas, tais como ligantes.

A referida molécula compreendendo um fragmento de anticorpo é qualquer molécula a qual compreende qualquer um dos referidos fragmentos de anticorpo ou outros domínios de imunoglobulina de pelo menos 20 aminoácidos. Em uma modalidade preferida, a referida molécula compreendendo um fragmento de anticorpo são moléculas de fusão, onde um fragmento de anticorpo é fundido com outras sequências proteicas, tais como com sequências efetoras, por exemplo, citocinas, fatores coestimulatórios, toxinas ou fragmentos de anticorpo de outros anticorpos para gerar moléculas com múltiplas especificidades de ligação, tais como anticorpos bi ou tri-específicos, ou sequências de multimerização tais como domínios MBP (pro-

teína de ligação a manam) para resultar na multimerização dos domínios de ligação, ou sequências para detecção, purificação, secreção ou estabilização, tais como etiquetas, sinais de localização ou ligantes, ou similares. Em outra modalidade preferida, a referida molécula compreendendo um fragmento de anticorpo são moléculas de fusão compreendendo a região Fc de um anticorpo inteiro ou suas partes, preferivelmente compreendendo o segundo domínio constante (domínio Cgamma2). AS referidas moléculas de fusão são fundidas por meios genéticos, onde as moléculas são codificadas por um ácido nucleico ou são fundidas pela coexpressão de pelo menos dois ácidos nucleicos por meio do qual a fusão é causada por interações de proteínas não-covalentes ou covalentes ou são fundidas por uma combinação de ambas. A fusão genética entre um fragmento de anticorpo e outra sequência polipeptídica ou molécula proteica pode ser alcançada por engenharia genética, onde ambas as partes são codificadas por um ácido nucleico único com ou sem aminoácidos adicionais entre eles. Em outra modalidade preferida, as referidas moléculas de fusão compreendem pelo menos uma região de ligação de um fragmento de anticorpo, tal como de um único domínio de anticorpo, ou Fab ou uma sequência de ligação não derivada dos anticorpos, tal como um domínio de lectina, e uma região Fc ou suas partes compreendendo o segundo domínio (domínio Cgamma). Em outra modalidade preferida, as moléculas de fusão compreendem IL-2, IL-12, IL-15, GM-CSF uma toxina peptídica ou suas partes. Elas estão, por exemplo, fundidas por meios genéticos, onde as moléculas são codificadas por um ácido nucleico ou são fundidas pela coexpressão de pelo menos dois ácidos nucleicos por meio do que a fusão é causada por interações proteicas não-covalentes ou covalentes ou são fundidas por um "comion" de fragmento de anticorpo, tal como um anticorpo de domínio único, Fab ou Fab o qual esteja ligado a uma sequência de multimerização do MBP.

Todas aquelas moléculas de anticorpo ou suas partes, assim como os métodos para construir, identificar, testar e selecionar essas moléculas de anticorpo com ou sem sequências adicionais estáveis, assim como métodos para construir, identificar, testar e selecionar a maioria dos ácidos

nucleicos adequados codificando essas moléculas de anticorpo são conhecidos pelas pessoas versadas na técnica.

De acordo com a presente invenção, o termo "composição de molécula de anticorpo" significa as moléculas de qualquer molécula de anticorpo expressas em uma célula hospedeira da invenção, a qual pode ser isolada. A referida composição da molécula de anticorpo compreende pelo menos uma molécula de anticorpo. A referida composição de anticorpo compreende pelo menos uma glicoforma de uma molécula de anticorpo. A referida glicoforma de uma molécula de anticorpo significa uma molécula de anticorpo a qual carrega uma cadeia de carboidratos ou glicosilação particular a qual é diferente em pelo menos um bloco de construção de açúcar, por exemplo, mas sem se limitar, a uma galactose adicional, ácido siálico, bi-secGlcNAc, fucose ou outra modificação de açúcar, tal como, porém sem se limitar, a acetilação ou sulfatação de outra glicoforma da mesma molécula de anticorpo. Em outra modalidade da invenção, a composição da molécula de anticorpo pode compreender moléculas de mais de uma molécula de anticorpo expressas em uma célula hospedeira. Em uma modalidade preferida, a composição da molécula de anticorpo da invenção compreende mais moléculas em porcentagem de tal glicoforma ou tais glicoformas da molécula de anticorpo, as quais medeiam uma citotoxicidade celular mediada por Fc maior e/ou uma ligação aumentada em relação a uma composição de molécula de anticorpo da mesma molécula de anticorpo obtida a partir de pelo menos uma das linhagens celulares CHO, ou CHOdhfr-, ou BHK, ou NS0, ou SP2/0, ou PerC.6 ou hibridoma de camundongo, preferivelmente CHOdhfr- [ATCC No. CRL-9096], quando ali expressas. Em outra modalidade preferida, a composição da molécula de anticorpo da invenção compreende mais moléculas de tal glicoforma ou glicoformas da molécula de anticorpo em porcentagem, as quais medeiam uma citotoxicidade celular mediada por Fc maior e/ou uma ligação aumentada em relação a uma composição de molécula de anticorpo da mesma molécula de anticorpo obtida a partir das linhagens celulares CHO, ou CHOdhfr-, ou BHK, ou NSO, ou SP2/0, ou PerC.6 ou hibridoma de camundongo, preferivelmente CHOdhfr- [ATCC No. CRL-9096],

quando ali expressas.

De acordo com a presente invenção, o termo "célula hospedeira de origem leucêmica mieloide humana" ou formulações equivalentes significa qualquer célula ou linhagem celular de origem leucêmica mieloide humana, ou qualquer célula precursora mieloide ou mieloide humana ou linhagem celular a qual possa ser obtida a partir de um paciente com leucemia, ou qualquer célula precursora mieloide ou mieloide ou linhagem celular a qual possa ser obtida a partir de um doador humano, ou uma célula ou linhagem celular derivada a partir de qualquer uma das referidas células hospedeiras, ou uma mistura de células ou linhagens celulares compreendendo pelo menos uma daquelas células acima mencionadas.

Em outra modalidade da invenção, a referida célula hospedeira de origem leucêmica mieloide humana ou a referida célula sanguínea humana imortalizada da invenção também compreende tais células ou linhagens celulares as quais foram obtidas pela fusão de pelo menos uma das células hospedeiras acima mencionadas, particularmente aquelas de origem leucêmica mieloide humana com outra célula de origem humana ou animal, tal como, porém sem se limitar, às células B, células CHO. As pessoas versadas na técnica são capazes de identificar e usar fontes adequadas e métodos para obter, gerar e/ou imortalizar células adequadas e linhagens celulares de seres humanos para células hospedeiras adequadas de origem leucêmica mieloide humana.

O termo célula ou linhagem celular derivada da referida célula hospedeira significa qualquer célula ou linhagem celular a qual possa ser obtida através do cultivo e clonagem com ou sem mutação prévia ou engenharia genética da referida célula hospedeira de origem mieloide humana e compreende a seleção daquelas células ou linhagens celulares derivadas da referida célula hospedeira com as propriedades desejadas. O referido cultivo e clonagem é baseado no fato de que os clones de células com diferentes propriedades podem ser obtidos a partir de culturas de células primárias, culturas de células e mesmo culturas de clones de células por vários ciclos de passagem e clonagem das células usando preferivelmente métodos de

clonagem de células únicas, tais como diluição limitada ou escolha de células baseada em citometria de fluxo. Em uma modalidade preferida, a referida célula ou linhagem celular derivada das referidas células hospedeiras é selecionada pela ligação a um anticorpo de ligação a carboidrato ou lectina. A referida mutação pode ser efetuada por um tratamento conhecido pelas pessoas versadas na técnica com mutágenos, tais como, porém sem se limitar, a radiação, agentes de alquilação ou EMS (etilmetanossulfonato), proteínas tais como lectinas ou partículas virais. A referida engenharia genética pode ser efetuada por métodos conhecidos pelas pessoas versadas na técnica, tais como nocaute ou genes através de recombinação de homólogos sítio-específica, uso de transposons, mutagênese sítio-específica, transfecção e certos ácidos nucleicos ou silenciamento de genes. Métodos para o referido cultivo e clonagem, a referida mutação e mutágenos e a referida engenharia genética são conhecidos pelas pessoas versadas na técnica e alguns exemplos estão descritos detalhadamente em WO2005/017130 A2, US 2003/0115614 A1 ou estão aqui descritos. As pessoas versadas na técnica são capazes de selecionar e/ou adotar e/ou modificar um método adequado ou combinação de métodos para a geração de uma célula ou linhagem celular adequada derivada da referida célula hospedeira da invenção.

A referida célula ou linhagens celulares derivadas da referida célula hospedeira são selecionadas devido às propriedades daquelas células as quais são vantajosas em comparação com as suas células ou linhagens celulares de origem, tais como, porém sem se limitar, a tempos de duplicação dobrados, crescimento mais rápido, possibilidade de crescer sob elevadas densidades, maior produtividade, crescimento sob condições sem-soro e/ou em meio sem-proteína, maiores eficiências de clonagem, maiores eficiências de transfecção para DNA, maiores taxas de expressão das composições de moléculas de anticorpo, maiores atividades para uma composição da molécula de anticorpo ali expressa, maiores homogeneidades de uma composição de molécula de anticorpo ali expressa e/ou melhor robustez ao acúmulo. Métodos para selecionar aquelas células com propriedades vanta-

josas são conhecidos pelas pessoas versadas na técnica ou são aqui descritos. A invenção proporciona um método para gerar uma célula hospedeira da invenção, compreendendo (a) a incubação de uma célula de leucemia mieloide humana com uma lectina ou um anticorpo reconhecendo um etitopo
 5 dessialilado ou um etitopo sem um ácido siálico, porém o qual não se ligue ou se ligue significativamente menos do que a forma sialilada do etitopo, e (b) isolamento das células ligadas à referida lectina ou anticorpo, e (c) o cultivo das células isoladas por m período de tempo adequado, é (d) a seleção de uma célula, células ou de um clone celular o qual se ligue fortemente a
 10 uma lectina ou a um anticorpo o qual se ligue a um etitopo com ácido siálico.

É mais preferido o método conforme descrito acima, em que a referida lectina ou o referido anticorpo reconhecendo um etitopo dessialilado ou um etitopo sem um ácido siálico é Nemod-TF1, Nemod-TF2, A78-G/A7, ou PNA, e em que a referida célula de leucemia mieloide humana é a linha-
 15 gem celular K562, KG-1, MUTZ-3, NM-F9 [DSM ACC2606], NM-D4 [DSM ACC2605], NM-H9, H9, NM-H10.

O método para gerar uma célula hospedeira da invenção com elevada sialilação e propriedades biotecnológicas favoráveis, tais como rápido crescimento celular compreendendo (i) incubação de uma célula de leu-
 20 cemia mieloide humana da invenção como célula de origem, preferivelmente K562, com uma lectina ou preferivelmente um anticorpo reconhecendo um etitopo dessialilado ou um etitopo sem um ácido siálico, porém o qual não se ligue ou se ligue menos à forma sialilada do etitopo, tal como, porém sem se limitar, a Nemod-TF1, Nemod-TF2, A78-G/A7, ou PNA (lectina de *Arachis*
 25 *hypogaea*, aglutinina de amendoim), preferivelmente ligado a contas magnéticas, e (ii) o isolamento de células ligadas à referida lectina ou anticorpo, e (iii) o cultivo das células isoladas por um tempo adequado, e (iv) a seleção da célula, células ou um clone celular, preferivelmente depois da clonagem de célula única, a qual se liga fortemente a uma lectina ou um anticorpo o
 30 qual se liga a um etitopo com ácido siálico, tal como SNA (aglutinina de *Sambucus nigra*) ou MAL (lectina de *Maackia amurensis*), MAL I (lectina I de *Maackia amurensis*), preferivelmente SNA.

Em uma modalidade preferida, a invenção proporciona um método para gerar uma célula hospedeira da invenção com elevada sialilação e propriedades biotecnológicas favoráveis, tais como rápido crescimento celular compreendendo (i) incubação de K562 com Nemod-TF1, Nemod-TF2, 5 A78-G/A7, ou PNA ligado a contas magnéticas, e (ii) o isolamento de células ligadas à referida lectina ou anticorpo, e (iii) o cultivo das células isoladas por um tempo adequado de cerca de uma a 6 semanas, e (iv) a seleção de um clone celular depois da clonagem de célula única, a qual se liga fortemente a SNA. Em uma modalidade preferida, aquelas células se ligam mais forte- 10 mente a SNA do que a célula de origem, e em outra modalidade preferida elas crescem mais rapidamente do que a célula de origem.

Em uma modalidade preferida da invenção, a célula de origem é tratada com etilmetanossulfonato antes da etapa (i).

As pessoas versadas na técnica são capazes de selecionar condições adequadas e métodos e otimizá-los para gerar essas células hospedeiras no sentido da invenção. Mais detalhes para alguns das etapas podem 15 ser encontrados em WO2005/017130 A2 e WO2005/080585 A1.

De acordo com uma modalidade, as células sanguíneas humanas imortalizadas são usadas como células hospedeiras, as quais são selecionadas a partir dos seguintes grupos 1 a 4: 20

- (a) grupo 1, compreendendo células hospedeiras com atividade de sialilação elevada, tal como K562;
- (b) grupo 2, compreendendo células hospedeiras tendo devido a uma deficiência genética ou meios de inibição de expressão (por exemplo, RNAi) uma baixa ou ausente sialilação; 25 atividade comparável a e incluindo NM-F9 [DSM ACC2606], NM-D4 [DSM ACC2605] e GT-2X;
- (c) grupo 3, compreendendo células hospedeiras com um grau de sialilação maior do que K562, tal como NM-H9 e NM-H9D8; 30
- (d) grupo 4, compreendendo células hospedeiras com uma atividade baixa ou ausente de fucosilação, tais como NM-

H9D8-E6 e NM-H9D8-E6Q12.

Em uma modalidade preferida, a referida linhagem celular gerada é NM-H9D8. Como o clone celular mais preferido gerado pelo método descrito acima, NM-H9D8 foi selecionado e depositado sob DSM ACC 2806 em "DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH" em Braunschweig (Alemanha), por Glycotope GmbH, Robert-Rössle-Str. 10, 13125 Berlim (Alemanha) em 15 de setembro de 2006. Outros clones celulares, tais como NM-E-2F9, NM-C-2F5, ou NM-H9D8-E6 (DSM ACC 2807) foram selecionados por incubação das células de origem com uma ou mais lectinas e após a clonagem celular única usando escolha de células por citometria de fluxo por meio do qual um procedimento de seleção positivo ou uma combinação de seleções negativa e positiva foi efetuada. Para obter clones celulares com características estáveis os clones celulares obtidos foram reclonados pelo menos uma vez por diluição limitada conforme descrito acima.

Em uma modalidade preferida da invenção, a referida célula sanguínea humana imortalizada, a qual é preferivelmente uma célula hospedeira de origem de leucemia mieloide, cresce e produz a composição da molécula de proteína/anticorpo da invenção sob condições sem-soro. Em uma modalidade ainda mais preferida, a referida célula sanguínea humana imortalizada, a qual é preferivelmente uma célula hospedeira de origem mieloide humana cresce sob condições sem-soro. Além disso, também o ácido nucleico codificando a molécula de proteína/anticorpo pode ser introduzido nessas células e a composição da molécula de proteína/anticorpo pode também ser isolada sob condições sem-soro. A possibilidade de se trabalhar sob condições sem-soro é particularmente importante ao preparar proteínas terapêuticas, uma vez que contaminações com soro são inaceitáveis no processo regulatório.

Em uma modalidade preferida da invenção, a célula hospedeira de origem de leucemia mieloide humana da invenção é a célula ou linhagem celular K562, KG1, MUTZ-3, NM-F9 [DSM ACC2606], NM-D4 [DSM ACC2605] ou uma célula ou linhagem celular de qualquer uma das referidas

células hospedeiras, ou uma mistura de células ou linhagens celulares compreendendo pelo menos uma das células acima mencionadas. A célula hospedeira é preferivelmente selecionada do grupo consistindo em NM-F9 [DSM ACC2606], NM-D4 [DSM ACC2605], NM-E-2F9, NM-C-2F5, NM-H9D8 [DSM ACC 2806], ou NM-H9D8-E6 DSM ACC 2807, ou NM H9D8-E6Q12 (DSM ACC 2856), GT-2X (depositado em DSM ACC _____ em "DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH" em Braunschweig (Alemanha), por Glycotope GmbH, Robert-Rössle-Str. 10, 13125 Berlim (Alemanha) em 7 de setembro de 2007) ou uma célula ou linhagem celular derivada de qualquer uma dessas linhagens celulares.

As células NM-F9 [DSM ACC2606] e NM-D4 [DSM ACC2605] foram depositadas por Nemod Biotherapeutics GmbH & Co. KG, Robert-Rössle-Str. 10, 13125 Berlim, Alemanha, que autorizou o requerente a se referir ao material biológico depositado aqui descrito.

Em outra modalidade preferida da invenção, a célula hospedeira de origem da leucemia mieloide humana da invenção é a célula ou linhagem celular K562, NM-F9 [DSM ACC2606], NM-D4 [DSM ACC2605], ou uma célula ou linhagem celular de qualquer uma das referidas células hospedeiras.

Em uma modalidade preferida da invenção, a célula hospedeira de origem da leucemia mieloide humana da invenção é a célula ou linhagem celular K562, tal como K562 [ATCC CCL-243], ou um célula ou linhagem celular derivada da referida célula hospedeira.

Em outra modalidade preferida da invenção, a célula hospedeira de origem da leucemia mieloide humana da invenção é a célula ou linhagem celular K562, NM-F9 [DSM ACC2606], NM-D4 [DSM ACC2605], NM-E-2F9, NM-C-2F5, NM-H9D8, ou NM-H9D8-E6, ou GT-2X, ou NM H9D8-E6Q12 ou uma célula ou linhagem celular derivada de qualquer uma das referidas células hospedeiras.

Em um modalidade ainda mais preferida da invenção, a célula hospedeira de origem da leucemia mieloide humana da invenção é a célula, as células ou a linhagem celular K562, NM-F9 [DSM ACC2606], NM-D4 [DSM ACC2605], NM-E-2F9, NM-C-2F5, NM-H9D8, ou NM-H9D8-E6, ou

GT-2X, ou NM H9D8-E6Q12, as quais crescem e produzem uma composição de molécula de anticorpo da invenção sob condições sem-soro, e mais preferivelmente a célula, células ou linhagem celular abaixo crescendo sob condições sem-soro e o ácido nucleico codificando a molécula de anticorpo pode ser introduzido nessas células e uma composição de molécula de anticorpo é isolada sob condições sem-soro.

Na modalidade mais preferida da invenção, a célula hospedeira de origem da leucemia mieloide humana da invenção é a célula, as células ou a linhagem celular NM-F9 [DSM ACC2606], NM-D4 [DSM ACC2605], NM-E-2F9, NM-C-2F5, NM-H9D8, GT-2X, ou NM H9D8-E6Q12 ou NM M9D8-E6Q12, as quais crescem e produzem uma composição de molécula de anticorpo da invenção sob condições sem-soro, e mais preferivelmente a célula, células ou linhagem celular abaixo crescendo sob condições sem-soro e o ácido nucleico codificando a molécula de anticorpo pode ser introduzido nessas células e uma composição de molécula de anticorpo é isolada sob condições sem-soro.

De acordo com uma modalidade, a célula sanguínea humana imortalizada e a célula hospedeira de origem da leucemia mieloide humana não é uma das linhagens celulares deficientes de sialilação NM-F9 e NM-D4 ou uma célula ou linhagem celular derivada de qualquer uma das referidas células hospedeiras com as mesmas propriedades. Essa modalidade é benéfica no caso de um alto grau de sialilação ser objetivado. Para essas modalidades, a célula hospedeira é preferivelmente selecionada do grupo consistindo em K562, NM H9D8, NM H9D8-E6, NM H9D8-E6Q12 e células hospedeiras derivadas de qualquer uma dessas células hospedeiras.

As linhagens celulares descritas juntamente com a presente invenção têm um tempo dobrado de 14 a 24 horas, o que é muito rápido em comparação com outros sistemas de expressão mamíferos, dependendo da linhagem celular da invenção.

Além disso, nenhum sistema de vetor de expressão elevada adequado é conhecido para a expressão de anticorpo de rendimento elevado em linhagens de células humanas, uma vez que as células humanas nor-

malmente não têm o gene DHFR e, deste modo, não permitem o uso do sistema de amplificação dhfr/metotrexato. Portanto, de acordo com outra modalidade da presente invenção, é fornecida uma modalidade, a qual permite aumentar o rendimento de produto.

5 De acordo com essa modalidade, adicionalmente um ácido nucleico é introduzido na célula hospedeira, codificando uma variante DHFR resistente ao antifolato. A di-hidrofolato redutase, ou DHFR, reduz o ácido di-hidrofólico a ácido tetraidrofólico, usando NADPH como doador de elétrons, o qual pode ser convertido nos tipos de cofatores de tetra-hidrofolato usados na química de transferência de 1 carbono. Antifolatos inibem a enzima DHFR, levando até a morte celular. Para proporcionar um ácido nucleico codificando uma variante de DHFR resistente ao antifolato, é fornecida uma ferramenta para selecionar células as quais tenham sido transfectadas com o ácido nucleico e, além disso, que permita a amplificação dos ácidos nucleicos a serem expressos nas células hospedeiras.

10

15

O ácido nucleico codificando a referida variante DHFR resistente ao antifolato pode, por exemplo, ser introduzido através de um vetor separado ao invés do ácido nucleico codificando a proteína/anticorpo a ser expresso na célula hospedeira. É preferível transfectar o vetor codificando a variante DHFR resistente ao antifolato basicamente ao mesmo tempo que o vetor compreendendo o ácido nucleico codificando a proteína/anticorpo. Essa modalidade estimula que o ácido nucleico codificando a referida proteína/anticorpo a ser expresso seja integrado no genoma da célula hospedeira no mesmo sítio genético que o ácido nucleico codificando a variante DHFR resistente ao antifolato, o que é benéfico no caso de se desejar uma amplificação do ácido nucleico codificando a referida proteína/anticorpo.

20

25

Alternativamente, um sistema de vetor pode ser usado, o qual compreende o ácido nucleico codificando pelo menos uma parte da referida proteína a ser expressa, assim como o ácido nucleico codificando a variante DHFR resistente ao antifolato.

30

As células hospedeiras são, a seguir, cultivadas com o referido antifolato. Isso causa o efeito de que aquelas células hospedeiras, as quais

foram transfectadas com sucesso com o ácido nucleico codificando a referida variante DHFR resistente ao antifolato, cresçam independentemente da presença do antifolato. Deste modo, as células transfectadas com sucesso podem ser selecionadas.

5 De acordo com outra modalidade, a sequência de ácidos nucleicos codificando pelo menos parte da referida proteína/anticorpo é amplificada passo a passo, aumentando a concentração de antifolato na cultura. O aumento da concentração de antifolato no meio de cultura leva a um aumento das cópias da variante DHFR resistente ao antifolato no genoma. Assume-se que isto é conseguido pelos eventos de recombinação nas células. Deste modo, também a quantidade de cópias do ácido nucleico codificando pelo menos parte da proteína a ser expressa é aumentada se o ácido nucleico codificando a referida proteína estiver localizado próximo da variante DHFR resistente ao antifolato no genoma, o que pode ser promovido ou pela transfecção de vetores separados simultânea ou pelo uso de um vetor compreendendo ambas as sequências de ácidos nucleicos. Através deste mecanismo, as células hospedeiras são obtidas, as quais expressam a proteína/anticorpo com um rendimento aumentado.

Preferivelmente, o antifolato é metotrexato.

20 A sequência de ácido nucleico codificando a referida proteína, preferivelmente uma molécula de anticorpo ou uma parte da mesma, é preferivelmente amplificada através do cultivo da referida célula hospedeira com pelo menos dois ciclos sucessivos de antifolato, preferivelmente metotrexato, por meio do que a concentração do referido antifolato, preferivelmente metotrexato, é aumentada em pelo menos 100% em cada ciclo sucessivo.

Um ácido nucleico adequado para proporcionar a referida variante DHFR resistente ao antifolato codifica um polipeptídeo do grupo da sequência ID No. 1 a 9, preferivelmente a sequência ID No. 1.

30 Outros detalhes e modalidades dessa sistema de aplicação também estão descritos em mais detalhes abaixo.

A invenção também fornece um método para produzir uma proteína, preferivelmente uma composição de molécula de anticorpo, compre-

endendo:

- 5 (a) introduzir em uma célula hospedeira de origem leucêmica mieloide humana pelo menos um ácido nucleico codifican-
do uma proteína e preferivelmente uma molécula de anti-
corpo ou pelo menos uma parte da mesma, e pelo menos
um ácido nucleico compreendendo pelo menos uma se-
quência de ácido nucleico codificando pelo menos um poli-
peptídeo do grupo da sequência Nº 1 até a sequência Nº 9,
preferivelmente a sequência Nº 1; e
- 10 (b) amplificar a sequência de ácido nucleico codificando a refe-
rida proteína, preferivelmente uma molécula de anticorpo
ou pelo menos uma parte da mesma pelo cultivo da referi-
da célula hospedeira com metotrexato, preferivelmente pe-
lo cultivo da referida célula hospedeira com pelo menos
15 dois ciclos sucessivos de metotrexato, por meio do qual a
concentração de metotrexato é preferivelmente aumentada
em pelo menos cerca de 50%, mais preferivelmente por
pelo menos cerca de 100% em cada ciclo sucessivo; e
- 20 (c) cultivar a referida célula hospedeira sob condições as quais
permitam a produção da referida proteína, preferivelmente
uma composição da molécula de anticorpo, e
- d) isolar a referida proteína, a qual é preferivelmente uma
composição da molécula de anticorpo.

A invenção também proporciona um método para produzir uma
25 composição proteica, preferivelmente uma composição de molécula de anti-
corpo, com atividade aumentada e/ou rendimento aumentado e/ou homoge-
neidade melhorada, compreendendo:

- 30 (a) introduzir em uma célula hospedeira de origem de leuce-
mia mieloide humana pelo menos uma proteína codificado-
ra de ácido nucleico, preferivelmente uma molécula de an-
ticorpo ou pelo menos uma parte da mesma; e
- (b) cultivar a referida célula hospedeira sob condições as quais

permitam a produção da referida composição proteica, a qual é preferivelmente uma composição da molécula de anticorpo; e

- 5 (c) isolar a referida composição proteica, a qual é preferivelmente uma composição da molécula de anticorpo com atividade aumentada e/ou rendimento aumentado e/ou homogeneidade melhorada.

Além disso, a invenção fornece um método para produzir uma composição proteica, preferivelmente uma composição de molécula de anti-
10 corpo, com atividade aumentada e/ou rendimento aumentado e/ou homogeneidade melhorada, compreendendo:

- 15 (a) introduzir em uma célula hospedeira de origem leucêmica mieloide humana pelo menos um ácido nucleico codificando uma proteína, preferivelmente uma molécula de anticorpo ou pelo menos uma parte da mesma, e pelo menos um ácido nucleico compreendendo pelo menos uma sequência de ácido nucleico codificando pelo menos um polipeptídeo do grupo da sequência Nº 1 até a sequência Nº 9, preferivelmente a sequência Nº 1; e
- 20 (b) amplificar a sequência de ácido nucleico codificando a referida molécula de anticorpo ou pelo menos uma parte da mesma pelo cultivo da referida célula hospedeira com metotrexato, preferivelmente pelo cultivo da referida célula hospedeira com pelo menos dois ciclos sucessivos de metotrexato, por meio do que a concentração de metotrexato
25 é preferivelmente aumentada em pelo menos cerca de 50%, mais preferivelmente por pelo menos cerca de 100% em cada ciclo sucessivo; e
- 30 (c) cultivar a referida célula hospedeira sob condições as quais permitam a produção da referida proteína, a qual é preferivelmente uma composição da molécula de anticorpo, e
- d) isolar a referida composição proteica, a qual é preferivel-

mente uma composição da molécula de anticorpo com atividade aumentada e/ou rendimento aumentado e/ou homogeneidade melhorada.

O referido ácido nucleico codificando uma molécula de anticorpo ou pelo menos uma parte da mesma e o referido ácido nucleico compreendendo pelo menos uma sequência de ácido nucleico codificando pelo menos um polipeptídeo do grupo da sequência Nº 1 até a sequência Nº 9, preferivelmente a sequência Nº 1, pode ser um ácido nucleico ou dois ácidos nucleicos separados.

Para selecionar uma célula hospedeira adequada para obter uma proteína com um perfil de glicosilação otimizado, é vantajoso efetuar o método de varredura/seleção de acordo com a presente invenção. Depois de uma célula hospedeira adequada ser determinada pelo método de seleção de acordo com a presente invenção, a referida célula hospedeira é usada para produzir a proteína conforme definido nas reivindicações 1 a 20.

Portanto, a invenção também proporciona um método para selecionar uma célula hospedeira para produzir uma proteína com pelo menos uma das seguintes características de glicosilação:

- (i) ela não compreende NeuGc detectável; e/ou
- (ii) ela tem um grau de galactosilação nas estruturas de carboidrato total, ou nas estruturas de carboidrato em um sítio de glicosilação particular da molécula proteica das moléculas de proteína na referida composição de molécula proteica que é aumentado em comparação com a mesma quantidade de moléculas de proteína em pelo menos uma composição de molécula proteica da mesma molécula proteica isolada de CHOdhr-[ATCC No. CRL-9096] quando ali expressa; e/ou
- (iii) ela tem uma quantidade de estruturas G2 nas estruturas de carboidrato total ou nas estruturas de carboidrato em um sítio de glicosilação particular da molécula proteica das referidas moléculas de proteína na referida composição de

- molécula proteica a qual é pelo menos 5% mais alta em comparação com a mesma quantidade de moléculas de proteína em pelo menos uma composição de molécula proteica da mesma molécula proteica isolada a partir de CHOdhfr-[ATCC No. CRL-9096] quando ali expressa; e/ou
- 5 (iv) ela tem uma quantidade de estruturas G0 nas estruturas de carboidrato total ou nas estruturas de carboidrato em um sítio de glicosilação particular da molécula proteica das referidas moléculas de proteína na referida composição de
- 10 molécula proteica a qual é pelo menos 5% mais baixa em comparação com a mesma quantidade de moléculas de proteína em pelo menos uma composição de molécula proteica da mesma molécula proteica isolada a partir de CHOdhfr-[ATCC No. CRL-9096] quando ali expressa; e/ou
- 15 (v) ela não compreende Galalpha1-3Gal terminal detectável; e/ou
- (vi) ela compreende uma quantidade de fucose nas estruturas de carboidrato total ou nas estruturas de carboidrato em um sítio de glicosilação particular da molécula proteica das
- 20 referidas moléculas de proteína na referida composição de molécula proteica a qual é pelo menos 5% menor em comparação com a mesma quantidade de moléculas de proteína em pelo menos uma composição de molécula proteica da mesma molécula proteica isolada a partir de CHOdhfr-
- 25 [ATCC No. CRL-9096] quando ali expressa; e/ou
- (vii) ela compreende pelo menos uma estrutura de carboidratos contendo GlcNAc bifurcado; e/ou
- (viii) ela tem um padrão de sialilação o qual é alterado em comparação com o padrão de sialilação de pelo menos uma
- 30 composição de molécula proteica da mesma molécula proteica isolada de CHOdhfr-[ATCC No. CRL-9096] quando ali expressa;

pelas seguintes etapas

- 5 (a) introduzir em pelo menos duas células sanguíneas humanas imortalizadas diferentes como células hospedeiras pelo menos um ácido nucleico codificando uma proteína ou pelo menos uma parte da mesma; e
- 10 (b) cultivar as referidas pelo menos duas células hospedeiras diferentes, em que cada célula hospedeira diferente produz uma composição proteica com um padrão de glicosilação divergindo do padrão de glicosilação produzido pela outra célula hospedeira;
- 15 (c) isolar as referidas composições proteicas expressas carregando um diferente padrão de glicosilação a partir de pelo menos duas células hospedeiras diferentes; e
- (d) selecionar a referida célula hospedeira produzindo uma composição proteica a qual tenha pelo menos uma das características de glicosilação definidas em (i) a (viii).

Os detalhes em relação ao padrão de glicosilação e linhagens celulares adequadas para obter o referido padrão estão descritos acima e também são aplicáveis a e adequados para o método de varredura para selecionar uma célula hospedeira adequada de acordo com a presente invenção.

É vantajoso efetuar uma etapa de varredura respectivo antes de estabelecer o método de produção, conforme descrito nas reivindicações 1 a 20, uma vez que essa modalidade permite a seleção da célula hospedeira mais adequada para produzir a composição da molécula de proteína/anticorpo com um padrão de glicosilação melhorado. De acordo com a idéia básica desse sistema de varredura, a proteína de interesse é expressa em pelo menos duas linhagens celulares diferentes as quais têm um padrão de glicosilação divergente. Por exemplo, uma linhagem celular pode demonstrar um alto grau de sialilação e a outra pode demonstrar um baixo grau de sialilação (ou fucosilação e/ou galactosilação) ou mesmo características de glicosilação desconhecidas. Os produtos obtidos a partir das diferentes

linhagens celulares podem concordantemente carregar uma característica do padrão de glicosilação para a respectiva linhagem celular.

As características das proteínas produzidas nas diferentes linhagens celulares, por exemplo, em relação às suas atividades (por exemplo, ADCC e CDC nos anticorpos), afinidade, meia-vida do soro e outras características importantes podem ser, deste modo, determinadas. Os resultados permitem escolher a linhagem celular, a qual tem a melhor maquinaria de glicosilação para obter uma proteína a qual seja otimizada, considerando seu padrão de glicosilação. Uma vez que as características decisivas variam (por exemplo, afinidade, meia-vida no soro, etc.), esse método é particularmente vantajoso.

Preferivelmente, a referida proteína a ser produzida demonstra pelo menos uma das seguintes características:

- (a) no caso dela ser uma composição da molécula de anticorpo, ela tem uma citotoxicidade celular mediada por Fc a qual é pelo menos 2 vezes maior do que a citotoxicidade celular mediada por Fc de pelo menos uma composição da molécula de anticorpo a partir da mesma molécula de anticorpo quando expressa na linhagem celular CHOdhfr-[ATCC No. CRL-9096]; e/ou
- (b) no caso dela ser uma composição da molécula de anticorpo, ela tem uma ligação mediada por antígeno ou mediada por Fc aumentada a qual é pelo menos 50% maior do que a ligação de pelo menos uma composição da molécula de anticorpo a partir da mesma molécula de anticorpo quando expressa na linhagem celular CHOdhfr-[ATCC No. CRL-9096]; e/ou
- (c) ela tem uma média aumentada de rendimento máximo da referida composição da molécula proteica a qual é pelo menos 10% maior do que o rendimento de pelo menos uma composição de molécula proteica a partir da mesma

molécula de proteína quando expressa na linhagem celular CHOdhfr- [ATCC No. CRL-9096].

De acordo com uma modalidade, pelo menos uma das referidas células hospedeiras é uma célula sanguínea humana imortalizada e preferi-
5 velmente uma célula de origem leucêmica mieloide humana tal como K562, NM-F9 [DSM ACC2606], NM-D4 [DSM ACC2605], NM-E-2F9, NM-C-2F5, NM-H9D8, NM-H9D8-E6, NM-H9D8-E6Q12, GT-2X ou uma célula ou linhagem celular derivada delas.

A referida pelo menos uma célula hospedeira de origem leucêmica mieloide humana pode ser selecionada a partir de um dos seguintes grupos 1 a 4:

- (a) grupo 1, compreendendo células hospedeiras com atividade de sialilação elevada, tal como K562 ou uma célula ou linhagem celular derivada dela,
- 15 (b) grupo 2, compreendendo células hospedeiras tendo devido a uma deficiência genética ou meios de inibição de expressão (por exemplo, RNAi) uma baixa ou ausente sialilação, tais como NM-F9 [DSM ACC2606], NM-D4 [DSM ACC2605] e GT-2X ou uma célula ou linhagem celular derivada dela;
- 20 (c) grupo 3, compreendendo células hospedeiras com um grau de sialilação maior do que K562, tal como NM-H9 e NM-H9D8, ou uma célula ou linhagem celular derivada dela;
- 25 (d) grupo 4, compreendendo células hospedeiras com uma atividade baixa ou ausente de fucosilação, tais como NM-H9D8-E6 ou uma célula ou linhagem celular derivada dela.

Preferivelmente, pelo menos duas das três células hospedeiras usadas no processo de varredura são selecionadas a partir dos grupos acima. Entretanto, também é possível incluir outras células hospedeiras deriva-
30 das de outra origem (por exemplo, células Hek 293) no sistema de varredura de acordo com a presente invenção para ampliar ainda mais os diferentes padrões de glicosilação analisados.

A célula hospedeira obtida preferivelmente inclui uma proteína, particularmente um anticorpo exibindo pelo menos um dos padrões de glicosilação demonstrados na Tabela 9.

De acordo com a invenção, o termo introduzindo um ácido nucleico se refere a qualquer método conhecido pelas pessoas versadas na técnica para introduzir um ácido nucleico, ou dois ou mais ácidos nucleicos em uma célula ou células hospedeiras de mamíferos por métodos tais como, porém sem se limitar, a eletroporação, transfecção usando lipídeos catiônicos, fosfato de cálcio, DEAd-dextrano ou infecção por partículas virais, tais como adenovírus ou retrovírus ou uma combinação desses. As pessoas versadas na técnica são capazes de selecionar e otimizar um método adequado para a introdução de um ou mais ácidos nucleicos da invenção.

De acordo com a presente invenção, o ácido nucleico codifican-
do uma molécula de anticorpo é qualquer ácido nucleico o qual codifique a molécula de anticorpo ou pelo menos uma parte da mesma. A molécula de anticorpo da invenção pode, deste modo, ser codificada por moléculas de ácido nucleico únicas ou múltiplas.

A referida parte da molécula de anticorpo codificada pelo referido ácido nucleico compreende pelo menos uma sequência de 20 aminoácidos, mais preferivelmente pelo menos 100 aminoácidos de uma molécula de anticorpo ou de um domínio constante e/ou variável da molécula de anticorpo. A sequência compreendida codificando a molécula de anticorpo ou pelo menos uma parte da mesma pode ser separada por pelo menos outra sequência, tal como, por exemplo, um íntron. A sequência de um domínio pode compreender pelo menos uma mutação de aminoácido.

De acordo com a presente invenção, o ácido nucleico codifican-
do uma molécula proteica é qualquer ácido nucleico o qual codifica a molécula proteica ou pelo menos uma parte da mesma. A molécula proteica da invenção pode, deste modo, ser codificada por uma única ou por várias moléculas de ácidos nucleicos. A sequência codificando a molécula de proteína ou pelo menos uma parte da mesma pode ser separada por pelo menos outra sequência, tal como, por exemplo, um íntron. A sequência da molécula

de proteína pode compreender pelo menos uma mutação de aminoácido.

Em uma modalidade preferida, o ácido nucleico codificando uma molécula de anticorpo ou pelo menos uma parte da mesma compreende pelo menos um domínio variável e/ou pelo menos um domínio constante da molécula de anticorpo, mais preferivelmente ambos, mais particularmente de modo que compreenda uma sequência humana pelo menos na parte do domínio ou domínios constantes, e ainda mais preferivelmente de modo que a tal compreenda o domínio Cgama2 humano, e mais preferivelmente que compreenda todos os domínios constantes da região Fc de um anticorpo humano de certa classe ou subclasse e o domínio variável.

De acordo com uma modalidade, a proteína e particularmente a molécula de anticorpo particular é codificada por um único ácido nucleico. Em outra proteína da modalidade preferida, particularmente uma molécula de anticorpo é codificada por dois ácidos nucleicos ou por três ácidos nucleicos.

Em outra modalidade preferida, um ácido nucleico codifica uma parte da molécula de anticorpo, a qual codifica o domínio variável e/ou o constante da cadeia leve e outro ácido nucleico codifica outra parte da molécula de anticorpo, o qual codifica o domínio variável e/ou pelo menos um domínio constante da cadeia pesada.

De acordo com a presente invenção, o ácido nucleico compreendendo pelo menos uma sequência de ácido nucleico codificando pelo menos um polipeptídeo do grupo da sequência N° 1 até a sequência N° 9 significa que aquele ácido nucleico codifica pelo menos um polipeptídeo do grupo da sequência N° 1 até a sequência N° 9, preferivelmente a sequência N° 1. Qualquer quantidade dessas sequências é adequada, contanto que ela possa ser introduzida com sucesso na célula hospedeira da invenção. Em uma modalidade preferida, o referido ácido nucleico codifica um, dois ou três polipeptídeos do grupo da sequência N° 1 até a sequência N° 9, mais preferivelmente para um polipeptídeo, e mais preferivelmente para o polipeptídeo da sequência N° 1. No sentido da invenção, o referido ácido nucleico pode também codificar um polipeptídeo do grupo da sequência N° 1 até a sequên-

cia Nº 9, preferivelmente a sequência Nº 1, o qual tem pelo menos uma mutação de aminoácido, contanto que essa mutação permita a amplificação do ácido nucleico codificando uma molécula de anticorpo ou pelo menos uma parte da mesma por metotrexato, conforme descrito aqui em outras partes.

5 A sequência de ácido nucleico codificando pelo menos um polipeptídeo do grupo da sequência Nº 1 até a sequência Nº 9, preferivelmente sequência Nº 1, pode ser parte da mesma molécula de ácido nucleico que o ácido nucleico codificando uma molécula de anticorpo ou pelo menos uma parte da mesma conforme descrito em outros lugares aqui ou em moléculas
10 de ácido nucleico separadas.

 Em outra modalidade preferida da invenção, um ácido nucleico separado compreendendo uma sequência selecionada do grupo da sequência Nº 1 até a sequência Nº 9, mais preferivelmente sequência Nº 1, pode ser introduzido na célula hospedeira da invenção separadamente do referido
15 ácido nucleico ou ácidos nucleicos codificando a molécula de anticorpo ou partes suas da invenção. Isso pode ser feito ou pela introdução do referido ácido nucleico separado compreendendo uma sequência de ácido nucleico codificando uma sequência selecionada do grupo da sequência Nº 1 até a sequência Nº 9, juntamente, antes ou depois da introdução do referido ácido
20 nucleico ou ácidos nucleicos codificando a molécula de anticorpo ou suas partes da invenção. Em uma modalidade preferida, isso é efetuado em paralelo e em outra modalidade preferida, a célula hospedeira da invenção já compreende o referido ácido nucleico separado compreendendo uma sequência de ácido nucleico codificando uma sequência selecionada do grupo
25 da sequência Nº 1 até a sequência Nº 9, mais preferivelmente a sequência Nº 1.

 Outras modalidades preferidas estão descritas nos exemplos.

 A amplificação do referido ácido nucleico estavelmente introduzido ou várias cópias do referido ácido nucleico codificando a proteína, o
30 qual é preferivelmente uma molécula de anticorpo ou fração sua, pode ser efetuada conforme descrito aqui em outros locais e nos exemplos usando metotrexato.

Em uma modalidade preferida, o ácido nucleico codificando a proteína, o qual é preferivelmente uma molécula de anticorpo ou pelo menos uma parte da mesma compreende pelo menos outro elemento genético, o qual permite a seleção daquelas células nas quais o ácido nucleico foi introduzido de modo bem sucedido, tal como, porém sem se limitar, aos genes de resistência a antibiótico, tais como, porém sem se limitar, ao elemento genético codificando resistência a puomicina ou neomicina. Além disso, esses ácidos nucleicos compreendem um ou vários elementos genéticos tais como promotores, intensificadores, sítios de poliadenilação e/ou íntrons, para expressão da molécula de anticorpo nas células hospedeiras da invenção, e elementos genéticos tais como origem de replicação bacteriana, promotores e elementos para seleção de bactérias transfectadas, tais como genes de resistência a antibióticos para multiplicar o ácido nucleico na bactéria.

Promotores adequados incluem o promotor do gene IE (precoce imediato) do citomegalovírus (CMV), promotor precoce SV40, promotor de um retrovírus, promotor da metalotioneína, promotor do choque térmico, promotor SR alfa, promotor EF-1 alfa, etc. O intensificador do gene IE de CMV humano pode ser usado juntamente com o promotor.

Aqueles e outros elementos genéticos são conhecidos pelas pessoas versadas na técnica e podem ser selecionados, combinados, otimizados e introduzidos no referido ácido nucleico codificando a proteína, o qual é preferivelmente uma molécula de anticorpo ou pelo menos uma parte da mesma pelas pessoas versadas na técnica. Modalidades preferidas do referido ácido nucleico codificando uma proteína, o qual é preferivelmente uma molécula de anticorpo ou pelo menos uma parte da mesma ou uma combinação de ácidos nucleicos são aqui descritos e nos exemplos, assim como elementos genéticos preferidos para uso e combinação, entretanto, a invenção não está restrita ao uso desses e pode ser combinada ou ainda otimizada pelas pessoas versadas na técnica.

As pessoas versadas na técnica são capazes de selecionar e/ou combinar o elemento genético adequado, construir os elementos ou vetores de ácido nucleico adequadamente para introduzir um ou mais ácidos nucleí-

cos da invenção em uma linhagem celular de acordo com a invenção.

O referido ácido nucleico ou combinação de ácidos nucleicos codificando a proteína, a qual é preferivelmente uma molécula de anticorpo ou pelo menos uma parte da mesma, assim como os referidos elementos genéticos adicionais, assim como os métodos para introduzi-los, tais como a transferência para as células hospedeiras da invenção para expressão da composição da molécula de anticorpo ou em bactérias para multiplicação são conhecidos pelas pessoas versadas na técnica, assim como os métodos para construir, identificar, testar, otimizar, selecionar e combinar esse ácido ou ácidos nucleicos e combiná-los com sequências adicionais adequadas para seleção daquelas células as quais são transfectadas com sucesso, assim como métodos para construir, identificar, testar e selecionar a maior parte dos ácidos nucleicos codificando essas moléculas de anticorpo são conhecidos pelas pessoas versadas na técnica.

15 Modalidades preferidas da invenção estão descritas nos exemplos.

Em uma modalidade preferida da invenção, o ácido nucleico codificando uma proteína, a qual é preferivelmente uma molécula de anticorpo ou pelo menos uma parte da mesma compreende um elemento genético para a seleção daquelas células hospedeiras da invenção, nas quais o ácido nucleico é introduzido com sucesso tais como, porém sem se limitar, à neomicina ou à puromicina, mais preferivelmente ele compreende além disso um promotor, tal como EF-1alfa ou o promotor CMV, mais preferivelmente ele compreende além disso um intensificador CMV, mais preferivelmente ele compreende além disso um elemento genético o qual permita a seleção de bactérias as quais são transfectadas com o ácido nucleico e um elemento genético para a replicação, tal como a origem de replicação ColE1 para multiplicação do referido ácido nucleico em bactérias, e ainda mais preferivelmente ele compreende além disso um elemento genético para multiplicação do referido ácido nucleico em células COS tal como a origem SV40. Esses elementos são conhecidos pelas pessoas versadas na técnica e podem ser selecionados, combinados, otimizados e usados pelas pessoas versadas na técnica.

Em uma modalidade ainda mais preferida da invenção, o referido ácido nucleico descrito acima codificando uma molécula proteica ou pelo menos uma parte da mesma compreende uma sequência de ácidos nucleicos. Preferivelmente o referido ácido nucleico codificando a molécula de proteína ou pelo menos uma parte da mesma codifica adicionalmente o elemento genético codificando a resistência à puromicina, ou a resistência à neomicina, ou uma sequência de ácido nucleico codificando pelo menos uma sequência selecionada do grupo da sequência Nº 1 até a sequência Nº 9, mais preferivelmente a sequência Nº 1.

10 Em uma modalidade ainda mais preferida da invenção, o referido ácido nucleico descrito acima codificando uma molécula de anticorpo ou pelo menos uma parte da mesma compreende pelo menos uma sequência codificando o domínio variável e pelo menos um domínio constante da cadeia pesada e/ou leve da molécula de anticorpo.

15 Em uma modalidade ainda mais preferida da invenção, o referido ácido nucleico descrito acima codificando uma molécula de anticorpo ou pelo menos uma parte da mesma compreende pelo menos uma sequência codificando o domínio variável e o domínio constante da cadeia leve da molécula de anticorpo ou o domínio variável e todos os domínios constantes da cadeia pesada da molécula de anticorpo inteira.

20 Em uma modalidade ainda mais preferida da invenção, um dos referidos ácidos nucleicos descritos acima codifica pelo menos uma parte da molécula de anticorpo compreendendo pelo menos uma sequência codificando o domínio variável e o domínio constante da cadeia leve da molécula de anticorpo e uma segunda do referido ácido nucleico descrito acima codificando pelo menos outra parte da molécula de anticorpo compreendendo pelo menos uma sequência codificando o domínio variável e pelo menos um domínio constante, preferivelmente todos os domínios constantes da cadeia pesada da molécula de anticorpo, e ambos os ácidos nucleicos são introduzidos na mesma célula hospedeira da invenção. Preferivelmente, um dos referidos ácidos nucleicos codifica adicionalmente o elemento genético codificando a resistência à puromicina e o outro referido ácido nucleico codifica

adicionalmente o elemento genético codificando a resistência à neomicina.

Em uma modalidade ainda mais preferida da invenção, o referido ácido nucleico descrito acima codificando uma molécula proteica ou pelo menos uma parte da mesma compreende pelo menos duas sequências de

5 ácido nucleico codificando duas sequências de aminoácidos codificando duas sequências de aminoácidos da molécula proteica ou pelo menos uma parte da mesma.

Preferivelmente, um dos referidos ácidos nucleicos codifica adicionalmente o elemento genético codificando a resistência à puromicina, ou

10 tro referido ácido nucleico codifica adicionalmente o elemento genético codificando a resistência à neomicina. Mais preferivelmente, um dos referidos ácidos nucleicos codifica adicionalmente o elemento genético codificando a resistência à puromicina ou neomicina, preferivelmente a resistência à puromicina, e outro referido ácido nucleico compreende além disso uma se-

15 quência de ácido nucleico codificando pelo menos uma sequência selecionada do grupo de sequência Nº 1 até a sequência Nº 9, mais preferivelmente a sequência Nº 1.

Em uma modalidade ainda mais preferida da invenção, o referido ácido nucleico descrito acima codificando uma molécula proteica ou pelo

20 menos uma parte da mesma compreende três sequências de ácido nucleico codificando três sequências de aminoácidos da molécula proteica ou pelo menos uma parte da mesma.

Preferivelmente, um dos referidos ácidos nucleicos codifica adicionalmente o elemento genético codificando a resistência à puromicina, ou

25 tro referido ácido nucleico codifica adicionalmente o elemento genético codificando a resistência à neomicina, e outro referido ácido nucleico compreende além disso uma sequência de ácido nucleico codificando pelo menos uma sequência selecionada do grupo de sequência Nº 1 até a sequência Nº 9, mais preferivelmente a sequência Nº 1.

Em uma modalidade ainda mais preferida da invenção, um dos referidos ácidos nucleicos codifica adicionalmente o elemento genético que

30 codifica a resistência à puromicina ou neomicina, e o outro referido ácido

nucleico compreende além disso uma sequência de ácido nucleico que codifica pelo menos uma sequência selecionada do grupo da sequência Nº 1 até a sequência Nº 9, mais preferivelmente a sequência Nº 1. Em uma modalidade ainda mais preferida, um dos referidos ácidos nucleicos compreende as sequências codificando o domínio variável e o domínio constante da cadeia leve e compreende além disso uma sequência de ácido nucleico codificando pelo menos uma sequência selecionada do grupo da sequência Nº 1 até a sequência Nº 9, mais preferivelmente a sequência Nº 1, e o outro referido ácido nucleico compreende sequências codificando o domínio variável e pelo menos um domínio constante, preferivelmente todos os domínios constantes da cadeia pesada da molécula de anticorpo e compreende além disso uma sequência de ácido nucleico codificando a resistência à puromicina ou à neomicina, preferivelmente a resistência à puromicina.

Em uma modalidade ainda mais preferida da invenção, o referido ácido nucleico codificando a molécula de anticorpo ou pelo menos uma parte da mesma compreende pelo menos uma sequência codificando o domínio variável e o domínio constante da cadeia leve da molécula de anticorpo e pelo menos uma sequência codificando o domínio variável e pelo menos um domínio constante, preferivelmente todos os domínios constantes da cadeia pesada da molécula de anticorpo.

Em uma modalidade preferida da invenção, os domínios constantes codificados pelos ácidos nucleicos descritos acima ou em outros lugares da invenção são domínios constantes humanos de IgG ou IgM, preferivelmente IgG1, IgG4 ou IgM humana, ou um domínio ou uma combinação de seus domínios, por meio do que preferivelmente as sequências genômicas ou sequências derivadas de sequências genômicas compreendendo pelo menos um íntron são usadas, as quais podem ser selecionadas, construídas e otimizadas pelas pessoas versadas na técnica.

Em uma modalidade ainda mais preferida da invenção, o referido ácido nucleico codificando uma proteína, a qual é preferivelmente uma molécula de anticorpo ou pelo menos uma parte da mesma da invenção compreende ainda o promotor EF-1alfa / intensificador CMV ou um promotor

derivado do promotor CMV, preferivelmente CMV-E.

Em outra modalidade preferida da invenção, o referido ácido nucleico codificando uma proteína, o qual é preferivelmente uma molécula de anticorpo ou pelo menos uma parte da mesma da invenção compreende ainda um peptídeo de sinal de secreção, preferivelmente o sinal de secreção do receptor da célula T.

Em outra modalidade ainda mais preferida da invenção, o referido ácido nucleico codificando uma proteína, o qual é preferivelmente uma molécula de anticorpo ou pelo menos uma parte da mesma da invenção compreende ainda um peptídeo de sinal de secreção, preferivelmente a sequência N° 10.

O referido ácido nucleico ou combinação de ácidos nucleicos codificando a proteína, o qual é preferivelmente uma molécula de anticorpo ou pelo menos uma parte da mesma, assim como os referidos elementos genéticos adicionais, assim como os métodos para introduzi-los são conhecidos pelas pessoas versadas na técnica, assim como os métodos para construir, identificar, testar, otimizar, selecionar e combinar esse ácido ou ácidos nucleicos e combiná-los com sequências adicionais adequadas para seleção daquelas células as quais são transfectadas com sucesso, assim como métodos para construir, identificar, testar e selecionar a maior parte dos ácidos nucleicos codificando essas moléculas de anticorpo são conhecidos pelas pessoas versadas na técnica.

Modalidades preferidas da invenção estão descritas nos exemplos.

A introdução do ácido nucleico pode ser ou transiente ou estável.

De acordo com a presente invenção, o termo amplificando a sequência de ácido nucleico codificando uma proteína ou molécula de anticorpo ou pelo menos uma parte da mesma pelo cultivo da referida célula hospedeira com um antifolato, particularmente metotrexato, significa que uma célula hospedeira da invenção descrita em outros lugares aqui, nas quais pelo menos um ácido nucleico codificando a proteína a ser expressa, tal como, por exemplo, uma molécula de anticorpo ou pelo menos uma parte da

mesma, e pelo menos um ácido nucleico compreendendo pelo menos uma sequência de ácido nucleico codificando uma variante DHFR resistente ao antifolato, preferivelmente pelo menos um polipeptídeo do grupo da sequência N° 1 até a sequência N° 9, preferivelmente a sequência N° 1, foi introduzido e é cultivado por pelo menos uma antifolato, preferivelmente concentração de metotrexato. Um tempo de cultivo típico está entre uma a duas semanas para cada ciclo, em concentrações típicas de cerca de 20 nM até 3000 nM, preferivelmente entre cerca de 50 nM até 2000 nM, mais preferivelmente entre cerca de 100 nM até 2000 nM. A duração do tratamento de amplificação de antifolato/metotrexato, assim como a concentração e os vetores correspondentes dos ácidos nucleicos da invenção podem ser otimizados pelas pessoas versadas na técnica e é também descrito em uma modalidade preferida nos exemplos. As condições de amplificação ótimas podem diferir entre diferentes moléculas de proteína/anticorpo codificadas e o uso de diferentes ácidos nucleicos ou construtos de ácidos nucleicos ou combinações suas descritas anteriormente. As pessoas versadas na técnica são capazes de selecionar e otimizar as condições mais adequadas e ácidos nucleicos da invenção. A referida amplificação leva a uma integração de mais cópias de ácidos nucleicos codificando a molécula de proteína/anticorpo ou pelo menos uma parte da mesma no genoma da célula hospedeira do que sem o cultivo de antifolato/metotrexato ou do que sem a introdução da sequência de ácido nucleico codificando pelo menos uma variante DHFR resistente a antifolato, particularmente um polipeptídeo do grupo da sequência N° 1 até a sequência N° 9, e/ou leva a uma produção aumentada da composição da molécula de proteína/anticorpo.

Em uma modalidade preferida da invenção, a referida célula hospedeira para amplificação do ácido nucleico ou ácidos nucleicos codificando uma molécula proteína/anticorpo ou pelo menos uma parte da mesma, a qual foi introduzida na referida célula hospedeira na qual pelo menos um ácido nucleico compreendendo pelo menos uma sequência de ácido nucleico codificando pelo menos um polipeptídeo do grupo de sequência N° 1 até a sequência N° 9, preferivelmente a sequência N° 1, foi introduzida, con-

forme descrito em outros lugares aqui incluindo as suas modalidades preferidas, são uma célula ou linhagem celular de origem leucêmica mieloide humana KG1, MUTZ-3, K562, NM-F9 [DSM ACC2606], NM-D4 [DSM ACC2605], NM-E-2F9, NM-C-2F5, NM-H9D8, ou NM-H9D8-E6, NM-H9D8-E6Q12, GT-2X ou uma célula ou linhagem celular derivada de qualquer uma das referidas células hospedeiras, mais preferivelmente a célula ou linhagem celular K562, NM-F9 [DSM ACC2606], NM-D4 [DSM ACC2605], NM-E-2F9, NM-C-2F5, NM-H9D8, ou NM-H9D8-E6, NM-H9D8-E6Q12, GT-2X ou uma célula ou linhagem celular derivada de qualquer uma das referidas células hospedeiras, e ainda mais preferivelmente a célula ou linhagem celular NM-F9 [DSM ACC2606], NM-D4 [DSM ACC2605], NM-E-2F9, NM-C-2F5, NM-H9D8, ou NM-H9D8-E6, NM-H9D8-E6Q12, GT-2X ou uma célula ou linhagem celular derivada de qualquer uma das referidas células hospedeiras.

Em uma modalidade preferida da invenção, a referida célula hospedeira é cultivada com pelo menos dois ciclos sucessivos de antifolato/metotrexato, por meio do que a concentração de antifolato/metotrexato é preferivelmente aumentada em pelo menos cerca de 50%, mais preferivelmente por pelo menos cerca de 100% em cada ciclo sucessivo. Em uma modalidade ainda mais preferida da invenção, a referida célula hospedeira é cultivada com pelo menos três, mais preferivelmente com quatro, mais preferivelmente com 5, e ainda mais preferivelmente com 6 ciclos sucessivos de antifolato/metotrexato, por meio do que a concentração de antifolato/metotrexato é preferivelmente aumentada em pelo menos cerca de 50%, mais preferivelmente por pelo menos cerca de 100% em cada ciclo sucessivo. São ainda mais preferidas as concentrações de antifolato/metotrexato entre cerca de 20 nM e 3000 nM, mais preferidas entre cerca de 50 nM a 2000 nM, mais preferivelmente entre cerca de 100 nM a 2000 nM, e ainda mais preferidas de cerca de 100 nM, 200 nM, 500 nM, 1000 nM 2000 nM, as quais estão na modalidade preferida e são usadas em ciclos sucessivos, a partir de 100 nM.

É surpreendente que a introdução de uma sequência de ácido nucleico codificando uma variante DHFR resistente ao antifolato e preferivelmente pelo menos um polipeptídeo do grupo de sequência N° 1 até a se-

quência N° 9 permita a amplificação da sequência de ácido nucleico codificando a referida molécula de proteína/anticorpo ou pelo menos uma parte da mesma na célula hospedeira de origem leucêmica mieloide humana da invenção, e especialmente em K562, NM-F9 [DSM ACC2606], NM-D4 [DSM ACC2605], NM-E-2F9, NM-C-2F5, NM-H9D8, ou NM-H9D8-E6, NM-H9D8-E6Q12, GT-2X ou uma célula ou linhagem celular derivada de qualquer uma das referidas células hospedeiras, pelo cultivo com antifolato/metotrexato.

É especialmente surpreendente que a introdução de uma sequência de ácido nucleico codificando pelo menos um polipeptídeo da sequência N° 1 permita a amplificação da sequência de ácido nucleico codificando a referida molécula de anticorpo ou pelo menos um aparte da mesma na célula hospedeira da invenção, e especialmente em K562, NM-F9 [DSM ACC2606], NM-D4 [DSM ACC2605], NM-E-2F9, NM-C-2F5, NM-H9D8, ou NM-H9D8-E6, NM-H9D8-E6Q12, GT-2X ou em uma célula ou linhagem celular derivada de qualquer uma das referidas células hospedeiras, pelo cultivo com metotrexato.

É ainda mais surpreendente que a introdução de uma sequência de ácido nucleico codificando pelo menos um polipeptídeo do grupo de sequência N° 1 até a sequência N° 9 permita uma amplificação ainda maior de ácido nucleico codificando a referida molécula de anticorpo ou pelo menos um aparte da mesma na célula hospedeira da invenção, e especialmente em K562, NM-F9 [DSM ACC2606], NM-D4 [DSM ACC2605], NM-E-2F9, NM-C-2F5, NM-H9D8, ou NM-H9D8-E6, NM-H9D8-E6Q12, GT-2X ou em uma célula ou linhagem celular derivada de qualquer uma das referidas células hospedeiras, pelo cultivo da referida célula hospedeira com pelo menos dois ciclos sucessivos de metotrexato, por meio do que a concentração de metotrexato é aumentada por pelo menos cerca de 50%, mais preferivelmente por pelo menos cerca de 100% em cada ciclo sucessivo.

É ainda mais surpreendente que a introdução de uma sequência de ácido nucleico codificando pelo menos um polipeptídeo do grupo de sequência N° 1 permita uma amplificação ainda maior da sequência de ácido nucleico codificando a referida molécula de anticorpo ou pelo menos uma

parte da mesma na célula hospedeira da invenção, e especialmente em K562, NM-F9 [DSM ACC2606], NM-D4 [DSM ACC2605], NM-E-2F9, NM-C-2F5, NM-H9D8, ou NM-H9D8-E6, NM-H9D8-E6Q12, GT-2X ou em uma célula ou linhagem celular derivada de qualquer uma das referidas células hospedeiras, pelo cultivo da referida célula hospedeira com pelo menos dois ciclos sucessivos de metotrexato, por meio do que a concentração de metotrexato é aumentada por pelo menos cerca de 50%, mais preferivelmente por pelo menos cerca de 100% em cada ciclo sucessivo.

Em uma modalidade preferida, o termo que amplificação é estável significa que ela leva à produção de altos rendimentos da composição da molécula de anticorpo em pelo menos 35 gerações de ciclos de divisão de células hospedeiras. A amplificação do referido ácido nucleico ou ácidos nucleicos estavelmente introduzidos codificando a molécula de proteína/anticorpo ou fração sua pode ser efetuada conforme descrito acima e nos exemplos usando metotrexato.

Modalidades ainda mais preferidas estão descritas nos exemplos.

Em uma modalidade preferida da invenção, as células hospedeiras da invenção com ácidos nucleicos introduzidos são preferivelmente usadas depois de pelo menos um ciclo de clonagem celular individual e a seleção daqueles clones celulares com expressão adequada e secreção da referida composição de proteína/anticorpo. Preferivelmente, a referida clonagem de célula única e seleção daqueles clones celulares com expressão e seleção adequados da referida composição de proteína/anticorpo ocorre depois de pelo menos um ciclo de amplificação de metotrexato descrito aqui em outros locais. Em uma modalidade ainda mais preferida, os referidos clones celulares são adicionalmente amplificados por pelo menos um ciclo adicional de amplificação com metotrexato, preferivelmente uma concentração aumentada de metotrexato, preferivelmente pelo menos aproximadamente o dobro da concentração de metotrexato, e ainda mais preferivelmente seguido por outro ciclo de clonagem e seleção de célula única daqueles clones celulares com expressão e secreção adequados da referida composição de proteína/anticorpo. Com essas modalidades preferidas, os clones celulares

com rendimentos de expressão particularmente elevados podem ser selecionados.

De acordo com a presente invenção, o termo cultivo da referida célula hospedeira sob condições as quais permitam a produção da referida
5 composição da molécula de anticorpo ou uma formulação respectiva para proteínas em geral significa que a célula hospedeira da invenção compreendendo pelo menos um ácido nucleico codificando uma molécula de proteína/anticorpo, preferivelmente as modalidades preferidas do referido ácido nucleico da invenção descritos em outros lugares por aqui é cultivada sob
10 condições de cultivo as quais permitem a expressão da molécula de proteína/anticorpo na forma de uma composição de molécula de proteína/anticorpo, preferivelmente a secreção no meio, preferivelmente com altos rendimentos e/ou atividade elevada e/ou alta homogeneidade, conforme descrito aqui em outros locais. As pessoas versadas na técnica são capazes
15 de selecionar as condições de cultivo mais adequadas através do uso de meios e condições de cultivo tais como, porém sem se limitar, a tempo adequado, temperatura, pH, gaseificação, alimentação, meio, suplementos de meio, tamanhos do reator ou frasco e princípios conhecidos pelas pessoas versadas na técnica. As pessoas versadas na técnica são capazes de selecionar e otimizar as condições mais adequadas. Modalidades preferidas são
20 descritas nos exemplos, porém não estão limitadas a esses.

O cultivo das células da presente invenção pode ser efetuado por qualquer um dos métodos de cultivo gerais para células animais capazes de produzir eficientemente a composição da molécula de anticorpo desejada, por exemplo, cultura em batelada, cultura em batelada repetida, cultura
25 em alimentação em batelada e cultura em perfusão. Preferivelmente, cultura em alimentação-batelada ou cultura em perfusão são empregadas para elevar a produtividade dos polipeptídeos desejados.

Em outra modalidade da invenção, o referido cultivo é efetuado
30 sob condições livres de soro e ainda mais preferivelmente com meio livre de proteína ou meio livre de componentes animais.

A adaptação das células hospedeiras da presente invenção a

um meio sem-soro de acordo com a presente invenção é surpreendentemente rápido e robusto. A adaptação pode ser efetuada, por exemplo, através da adaptação de células subcultivadas em um meio contendo soro diretamente em um meio livre de soro comercialmente disponível, ou pela adaptação contínua por meio do que a adaptação direta ao meio sem-soro é preferida e vantajosa. Durante o processo de adaptação a um meio sem-soro, a viabilidade das células reduz temporariamente, o que em algumas vezes causa a extinção das células. Consequentemente, é preferível inocular as células em um meio para a adaptação a um meio sem-soro em uma densidade celular de 1×10^5 a 5×10^5 células/mL, preferivelmente 2×10^5 células/mL, para restaurar a viabilidade das células ou mantê-la alta. Depois de 4 a 7 dias de cultivo, as células cuja densidade alcançou 5×10^5 a 10×10^5 células/mL são selecionadas como as células adaptadas a um meio sem-soro. A adaptação a meio sem-soro pode também ser efetuada pela diluição sucessiva do meio suplementado com FCS por uma composição de meio livre de soro (adaptação contínua). As pessoas versadas na técnica são capazes de selecionar e otimizar as condições mais adequadas. Modalidades preferidas são descritas nos exemplos, porém não estão limitadas a esses.

Depois de as células da presente invenção estarem adaptadas a um meio sem-soro, uma linhagem celular clonada pode ser preparada pelo uso do método de diluição limitada com uma placa de 96 cavidades, o método de formação de colônia ou similar, e as células ou linhagem celular são selecionadas devido às propriedades daquelas células as quais são vantajosas em comparação com a sua célula ou linhagem celular de origem tal como, porém sem se limitar a tempos de duplicação reduzidos, crescimento mais rápido, possibilidade de crescer sob elevadas densidades, maior capacidade de produção, maiores eficiências de clonagem, maiores eficiências de transfecção para o DNA, maiores taxas de expressão de composições de molécula de anticorpo, maiores atividades para uma composição de molécula de anticorpo ali expressa, maiores homogeneidades de uma composição de molécula de anticorpo aqui expressa e/ou maior robustez ao aumento.

Métodos para a seleção da célula com propriedades vantajosas são conhecidos pelas pessoas versadas na técnica ou aqui descritos.

De acordo com a presente invenção, o termo isolamento da referida composição da molécula de anticorpo ou uma formulação correspondente para proteínas em geral significa que a composição da molécula de proteína/anticorpo expressa pela célula hospedeira compreendendo pelo menos um dos referidos ácidos nucleicos codificando molécula de proteína/anticorpo ou fração sua descrita aqui em outros locais é ganha pelo uso de meio de cultura depois do cultivo ou enriquecimento ou purificação adicional da composição de molécula de proteína/anticorpo ou partes da composição da molécula de proteína/anticorpo por métodos conhecidos pelas pessoas versadas na técnica. A referida composição da molécula de proteína/anticorpo no sentido da invenção também significa partes da referida composição da molécula de proteína/anticorpo enriquecida para certas moléculas de proteína/anticorpo descritas aqui em outros locais.

Em uma modalidade preferida, a composição da molécula de proteína/anticorpo é isolada pela separação do meio após o cultivo das células e/ou fragmentos celulares, por exemplo, através de técnicas de centrifugação.

Em outra modalidade preferida da invenção, uma composição da molécula de proteína/anticorpo da invenção é isolada ou adicionalmente enriquecida por ultrafiltração, métodos de precipitação ou outros métodos de concentração conhecidos pelas pessoas versadas na técnica.

Em outra modalidade preferida da invenção, uma composição da molécula de proteína/anticorpo da invenção é isolada por purificação da composição da molécula de proteína/anticorpo por métodos cromatográficos, tais como, porém sem se limitar, a cromatografia de afinidade usando materiais de afinidade apropriados tais como, porém sem se limitar, a proteína A, proteína G, anticorpos de isotipo antianticorpo, cromatografia de lectina, anticorpos contra certa etiqueta introduzida na molécula de anticorpo, tal como rótulo HIS ou rótulo myc, ou antígeno, ou por cromatografia de troca iônica conhecida pelas pessoas versadas na técnica.

Outros métodos de purificação ou enriquecimento de proteínas ou certas glicoformas de proteínas são conhecidos pelas pessoas versadas na técnica e podem ser selecionados, adotados, otimizados e usados sozinhos ou em combinação com os métodos anteriormente descritos pelas
5 pessoas versadas na técnica para isolar ou adicionalmente purificar, fracionar ou enriquecer a composição da molécula de proteína ou suas frações da invenção.

Em uma modalidade preferida da invenção, uma composição da molécula de anticorpo da invenção principalmente de IgG é isolada por cromatografia da proteína A com ou sem prévia ultracentrifugação.
10

Em outra modalidade preferida da invenção, uma composição da molécula de anticorpo da invenção principalmente de IgM é isolada por cromatografia de anticorpo anti-IgM com ou sem prévia ultracentrifugação.

Em outra modalidade preferida da invenção, uma composição da
15 molécula de anticorpo da invenção enriquecida em certas glicoformas da molécula de anticorpo é isolada por cromatografia de afinidade de lectina com ou sem prévia ultracentrifugação. Outros métodos de purificação ou enriquecimento das proteínas ou certas glicoformas de proteínas são conhecidos pelas pessoas versadas na técnica e podem ser selecionados, adotados, otimizados e usados sozinhos ou em combinação com os métodos anteriormente descritos pelas pessoas versadas na técnica para isolar ou adicionalmente purificar, fracionar ou enriquecer a composição da molécula de
20 anticorpo ou suas frações da invenção.

Em uma modalidade preferida, a composição da molécula de anticorpo é isolada usando colunas de proteína A. Em outra modalidade preferida, a composição da molécula de anticorpo é isolada usando uma coluna anti-IgM.
25

De acordo com a presente invenção, o termo "atividade aumentada" significa que a atividade de uma composição de molécula de proteína e/ou anticorpo da invenção expressa em uma célula hospedeira de origem leucêmica mieloide humana é maior do que a atividade de pelo menos uma
30 composição da molécula de proteína/anticorpo da mesma molécula de prote-

ina/anticorpo quando expressa em pelo menos uma das linhagens celulares CHO, ou CHOdhfr-, ou BHK, ou NS0, ou SP2/0, ou PerC.6 ou hibridoma de camundongo. Na modalidade preferida da invenção, isso significa que a atividade de uma composição da molécula de proteína/anticorpo da invenção
5 expressa em uma célula hospedeira de origem leucêmica mieloide humana é maior do que a atividade de uma composição da molécula de proteína/anticorpo da mesma molécula de proteína/anticorpo quando expressa em CHOdhfr- [ATCC No. CRL-9096]. Para os anticorpos, a referida atividade aumentada é uma citotoxicidade celular mediada por Fc aumentada ou uma
10 atividade de ligação aumentada.

No sentido da invenção, "atividade" é também uma função ou grupo de funções efetuado por uma molécula proteica em um contexto biológico. No sentido da invenção, o termo "atividade aumentada", equivalentes dos teors e seus equivalente gramaticais é para ser entendido como uma
15 atividade melhorada ou ótima em relação à aplicação selecionada, por meio do que a atividade poderia ser ou aproximada até um valor limitante, por exemplo, sendo minimizada ou maximizada, ou estabelecida em um valor médio representando uma atividade maior ou menor em comparação com a molécula proteica correspondente produzida pela técnica anterior. A atividade
20 de melhorada ou aumentada no sentido da invenção também significa uma atividade favorável no sentido de seu significado biológico e/ou farmacêutico, como meia-vida no soro, farmacocinética, estabilidade, atividade biológica, ligação, antigenicidade e/ou imunogenicidade aumentados. Por exemplo, a atividade biológica de uma composição da molécula proteica poderia ser
25 aumentada até uma extensão através da redução dos efeitos biológicos adversos, por exemplo, pela estimulação reduzida dos efeitos imunes adversos ou uma imunogenicidade reduzida.

A atividade da composição da molécula proteica de acordo com a invenção pode ser determinada em um bioensaio adequado, o qual é ca-
30 paz de determinar a atividade da proteína. As pessoas versadas na técnica são capazes de identificar bioensaios adequados ou de construir bioensaios adequados. De acordo com a presente invenção, tais bioensaios incluem,

por exemplo, ensaios biológicos *in vitro*, incluindo ensaios celulares ou moleculares ou misturados, tais como ensaios de proliferação, ensaios de apoptose, ensaios de adesão celular, ensaios de sinalização, ensaios de migração, ensaios de citotoxicidade celular, ensaios de fagocitose, ensaios de lise e ensaios de ligação. Tais bioensaios também incluem ensaios *in vivo* usando modelos animais ou humanos, tais como biodistribuição, farmacocinética, teste farmacodinâmico, testes de meia-vida no soro, testes para a biodisponibilidade, teste de eficácia, testes de localização, tratamento e testes de profilaxia de doenças incluindo estudos clínicos. Tais bioensaios também incluem testes químicos, físicos, físico-químicos, biofísicos e bioquímicos, tais como estabilidade em relação à temperatura, estresse de cisalhamento, pressão, pH, conjugação e outros. Tais bioensaios também incluem testes para a imunogenicidade e/ou antigenicidade para melhorar as propriedades da composição da molécula proteica em relação ao seu uso clínico. As pessoas versadas na técnica são capazes de determinar a atividade ou uma combinação de atividades descritas das composições da molécula proteica.

Em uma modalidade preferida, a atividade mais elevada da composição da molécula proteica é caracterizada por uma maior atividade em pelo menos um modelo *in vitro* e/ou uma atividade maior em pelo menos um modelo *in vivo* e/ou uma maior estabilidade e/ou uma maior meia-vida no soro e/ou uma biodisponibilidade mais longa e/ou uma imunogenicidade melhorada e/ou uma antigenicidade melhorada determinada por pelo menos um bioensaio. A melhoria na atividade global a qual é também chamada aqui atividade mais alta pode levar, por exemplo, a melhorias como dosagens mais baixas, intervalos de tempo mais longos para administração, menos efeitos colaterais e ausência ou baixa toxicidade do produto quando usado em seres humanos ou organismos correspondentes, resultando em medicamentos muito melhorados.

Em uma modalidade preferida da invenção, a atividade de uma composição da molécula proteica da invenção expressa em uma célula hospedeira de origem leucêmica mieloide humana é maior do que a atividade de pelo menos uma composição da molécula de proteína a partir da mesma

molécula proteica produzida pela técnica anterior.

A referida citotoxicidade celular mediada por Fc aumentada é uma citotoxicidade celular dependente de anticorpo melhorada (atividade ADCC), citotoxicidade dependente do complemento (atividade CDC) e/ou
5 citotoxicidade causada por fagocitose (atividade de fagocitose). A citotoxicidade celular mediada por Fc aumentada incluindo atividade ADCC, atividade CDC ou atividade de fagocitose pode ser determinada por vários métodos conhecidos pelas pessoas versadas na técnica e alguns estão descritos em
10 detalhes nos exemplos sem limitá-la àqueles métodos por meio dos quais os métodos descritos nos exemplos são modalidades preferidas da invenção.

A referida atividade de ligação aumentada é uma ligação aumentada ao etitopo da molécula de anticorpo, tal como o etitopo, o antígeno, outro polipeptídeo compreendendo o etitopo ou uma célula compreendendo o etitopo da molécula de anticorpo, ou uma ligação aumentada a pelo menos
15 um receptor Fc ou outro ligante efetor, tal como Fc-gamaRI, Fc-gamaRII, Fc-gamaRIII e suas subclasses tais como Fc-gamaRIIa, Fc-gamaRIIb, Fc-gamaRIIIa, Fc-gamaRIIIb ou o componente C1q do complemento, ou FcRn ou uma molécula ou célula compreendendo qualquer um daqueles receptores Fc ou ligantes efetores. A atividade de ligação aumentada pode ser uma maior afinidade,
20 uma avidéz aumentada e/ou um número maior de sítios de ligação ou suas combinações. A atividade de ligação aumentada pode resultar em vários efeitos e atividades tais como, porém sem se limitar, às formas de atividade mediada por receptor conforme descrito nos antecedentes da técnica. A afinidade, avidéz de ligação e atividade mediada por receptor aumentados po-
25 dem ser determinados por pelo menos um dos vários métodos conhecidos pelas pessoas versadas na técnica tais como, porém sem se limitara, medição Biacore, análise de Scatchard, medições baseadas em ELISA ou RIA, medições de citometria de fluxo, teste para determinar a indução de apoptose em células-alvo adequadas, testes para a determinação da proliferação
30 de células-alvo adequadas, teste para bloqueio antagonístico, agonístico e/ou de receptor de uma composição da molécula de anticorpo tal como, porém sem se limitar, a inibição da ligação mediada célula-célula, desensa-

deamento de eventos moleculares internos celulares. As pessoas versadas na técnica são capazes de selecionar e/ou de adotar e/ou de modificar um método adequado ou combinação de métodos para testar a afinidade de ligação, avidéz, quantidade de sítios de ligação e/ou atividade mediada por receptor.

Os métodos da invenção podem ser usados para testar a capacidade de um anticorpo ser capaz de obter uma citotoxicidade celular mediada por Fc aumentada, preferivelmente a atividade ADCC, a atividade CDC e/ou a citotoxicidade causada por fagocitose, e/ou uma atividade de ligação aumentada ao etitopo da molécula de anticorpo ou preferivelmente a pelo menos um receptor Fc ou outro ligante efetor, em geral e/ou particularmente com as células hospedeiras da invenção e suas modalidade preferidas descritas aqui em outros locais.

Em uma modalidade preferida da invenção, a atividade de uma composição da molécula de proteína/anticorpo da invenção expressa em uma célula hospedeira de origem leucêmica mieloide humana é maior do que a atividade de pelo menos uma composição da molécula de anticorpo a partir da mesma molécula de anticorpo a parte de pelo menos uma das linhagens celulares CHO, ou CHOdhfr- ou BHK, ou NS0, ou SP2/0, ou PerC.6 ou hibridoma de camundongo, preferivelmente CHOdhfr- [ATCC No. CRL-9096], quando ali expressas.

Em uma modalidade preferida da invenção, a atividade de uma composição da molécula de proteína/anticorpo da invenção expressa em uma célula hospedeira de origem leucêmica mieloide humana é pelo menos 50% maior do que a atividade da composição da molécula de anticorpo a partir da mesma molécula de anticorpo expressa na linhagem celular CHOdhfr- [ATCC No. CRL-9096], mais preferivelmente pelo menos 2 vezes, mais preferivelmente pelo menos 3 vezes, mais preferivelmente pelo menos 4 vezes, mais preferivelmente pelo menos 5 vezes, mais preferivelmente pelo menos 7 vezes, mais preferivelmente pelo menos 10 vezes, mais preferivelmente pelo menos 15 vezes, mais preferivelmente pelo menos 23 vezes, mais preferivelmente pelo menos 30 vezes, mais preferivelmente pelo me-

nos 50 vezes, mais preferivelmente pelo menos 75 vezes, mais preferivelmente pelo menos 100 vezes, mais preferivelmente pelo menos 150 vezes, mais preferivelmente pelo menos 150 vezes, mais preferivelmente pelo menos 230 vezes, mais preferivelmente pelo menos 300 vezes, mais preferivelmente pelo menos 500 vezes, mais preferivelmente pelo menos 750 vezes e mais preferivelmente pelo menos mais de 1000 vezes.

Por meio disso cada bioensaio não tem que mostrar uma atividade maior, porém dependendo do uso e das características de uma composição da molécula de proteína particular, alguns efeitos biológicos favoráveis podem compensar outros os quais sejam menos favoráveis e ainda resultar em uma atividade global maior da composição da molécula de proteína no sentido da invenção. Por exemplo, certa composição de molécula proteica pode resultar em uma atividade muito maior através da ligação aos seus receptores às células, deste modo desencadeando um efeito secundário, tal como indução da proliferação, porém exibir uma meia-vida séria levemente reduzida. Em combinação, a maior atividade desencadeando o receptor mais do que compensa a biodisponibilidade mais curta na bioatividade global. Em outro exemplo, uma meia-vida mais curta e uma atividade maior em relação ao desencadeamento do receptor são ambas vantajosas. Em ainda outra modalidade, atividade *in vivo* não é melhorada, porém a estabilidade *in vitro* melhora a produção e o armazenamento da composição da molécula proteica. Em ainda outro exemplo, uma meia-vida mais longa, porém com uma atividade menor é necessária.

Em uma modalidade preferida da invenção, a atividade aumentada de uma composição da molécula de anticorpo é uma atividade ADCC aumentada. Em outra modalidade preferida, a atividade aumentada de uma composição da molécula de anticorpo é uma CDC aumentada. Em outra modalidade preferida, a atividade aumentada de uma composição da molécula de anticorpo é uma citotoxicidade causada por fagocitose. Em outra modalidade preferida a atividade aumentada de uma composição da molécula de anticorpo é uma atividade de ligação aumentada ao etitopo. Em outra modalidade preferida, a atividade aumentada de uma composição da molé-

cula de anticorpo é uma atividade de ligação aumentada a pelo menos um receptor Fc, preferivelmente Fc γ RIIIA. Em outra modalidade preferida, a atividade aumentada de uma composição da molécula de anticorpo é uma citotoxicidade celular mediada por Fc aumentada e uma atividade de ligação aumentada ao etitopo. Em outra modalidade preferida, a atividade aumentada de uma composição da molécula de anticorpo é uma atividade ADCC aumentada e uma atividade de ligação aumentada ao etitopo. Em outra modalidade preferida, a atividade aumentada de uma composição da molécula de anticorpo é uma atividade ADCC aumentada, uma atividade CDC aumentada, uma atividade de ligação aumentada ao etitopo e uma atividade de ligação aumentada a pelo menos um receptor Fc. Em outra modalidade preferida, a atividade aumentada de uma composição da molécula de anticorpo é uma atividade ADCC aumentada, uma citotoxicidade aumentada causada por fagocitose, uma atividade de ligação aumentada ao etitopo e uma atividade de ligação aumentada a pelo menos um receptor Fc. Na modalidade mais preferida, a atividade aumentada de uma composição da molécula de anticorpo é uma ADCC aumentada, citotoxicidade aumentada causada por fagocitose, uma atividade CDC aumentada e uma atividade de ligação aumentada ao etitopo e uma atividade de ligação aumentada a pelo menos um receptor Fc.

De acordo com a presente invenção, o termo "homogeneidade melhorada" significa que uma composição da molécula de proteína/anticorpo da invenção expressa em uma célula hospedeira de origem leucêmica mielóide humana da invenção compreende menos glicoformas diferentes, ou mais de uma glicoforma favorável ou de glicoformas favoráveis, ou pelos de pelo menos uma glicoforma de uma molécula de anticorpo (preferivelmente daquelas glicoformas as quais representam pelo menos 1% da composição da molécula de anticorpo total por si só) do que pelo menos uma composição da molécula de anticorpo da mesma molécula de anticorpo isolada a partir de pelo menos uma das linhagens celulares CHO, CHOdhfr-, ou BHK, ou NS0 ou SP2/0 ou PerC.6 ou hibridoma de camundongo quando ali expressa. Em uma modalidade preferida da invenção, isso significa que uma

composição da molécula de anticorpo da invenção expressa em uma célula hospedeira de origem leucêmica mieloide humana da invenção compreende menos glicoformas diferentes, ou mais de uma glicoforma favorável ou de glicoformas favoráveis, ou menos de pelo menos uma glicoforma de uma molécula de anticorpo do que uma composição da molécula de anticorpo da mesma molécula de anticorpo isolada da linhagem celular CHOdhfr- [ATCC No. CRL-9096/ quando ali expressa.

Uma heterogeneidade particularmente problemática para a produção e uso em seres humanos é a sialilação. Em uma modalidade preferida, a composição da molécula de proteína/anticorpo da invenção tem uma homogeneidade melhorada compreendendo nenhuma glicoforma com o ácido siálico ácido N-glicolilneuramínico (NeuGC), por meio do que neste caso nenhuma glicoforma significa ausência de glicoforma de mais de 1% de todas as cadeias de carboidrato obteníveis a partir da composição da molécula de anticorpo purificada e mais preferivelmente ausência de cadeias de carboidrato detectáveis em qualquer caso, como sendo detectável pelos métodos conhecidos pelas pessoas versadas na técnica. Uma vez que NeuGc é conhecido como sendo capaz de ser imunogênico em seres humanos, isto é uma grande vantagem das células hospedeiras da invenção em relação aos outros sistemas de produção tais como CHO, NSO, SP2/0.

Em uma modalidade preferida, a composição da molécula de proteína/anticorpo da invenção tem uma homogeneidade melhorada em relação à sialilação compreendendo menos de 5% de glicoformas, mais preferivelmente menos de 3%, e ainda mais preferivelmente menos de 1%, e mais preferivelmente ausência de glicoformas da composição da molécula de proteína/anticorpo com ácido siálico detectável conforme descrito nos exemplos. Em outra modalidade preferida, uma composição da molécula de proteína/anticorpo com homogeneidade melhorada em relação à sialilação é alcançada pelo uso de uma célula hospedeira de origem leucêmica mieloide humana da invenção, a qual tem um defeito na via do precursor do açúcar nucleotídico e, deste modo, é deficiente para ou tem CMP-ácido siálico reduzido e a qual resulta em ausência de sialilação ou em sialilação muito re-

duzida das cadeias de açúcares de carboidratos das moléculas de proteína/anticorpo quando as células crescem em um meio sem-soro. Em uma modalidade ainda mais preferida, tal composição da molécula de proteína/anticorpo com homogeneidade melhorada em relação à sialilação pode ser alcançada pelo uso de NM-F9 [DSM ACC2606] ou NM-D4 DSM ACC2605 como uma célula hospedeira da invenção que cresceu em um meio sem-soro conforme descrito em mais detalhes nos exemplos.

Em outra modalidade ainda mais preferida, uma composição da molécula de proteína/anticorpo com homogeneidade melhorada em relação à sialilação é alcançada pelo uso de uma célula hospedeira de origem leucêmica mieloide humana a invenção, a qual tem um defeito no transportador de açúcar de nucleotídeo do GMP-ácido siálico ou em pelo menos uma sialiltransferase, o que resulta em ausência ou em reduzida sialilação das cadeias de açúcares de carboidratos das moléculas de proteína/anticorpo quando as células crescem em um meio sem-soro. São exemplos NM-F9, NM-D4 e GT-2X.

Em outra modalidade preferida da invenção, a composição da molécula de proteína/anticorpo com homogeneidade melhorada em relação à sialilação é alcançada pelo uso de uma célula hospedeira de origem leucêmica mieloide humana da invenção, a qual tem grau de sialilação aumentado. O referido grau de sialilação significa que a quantidade de ácido siálico N-acetilneuramínico (NeuNc ou NeuNAc) nas moléculas de proteína/anticorpo em uma composição da molécula de anticorpo é de pelo menos 5%, mais preferivelmente de pelo menos 15%, mais preferivelmente de pelo menos 20%, mais preferivelmente de pelo menos 25%, mais preferivelmente de pelo menos 30%, mais preferivelmente de pelo menos 35%, mais preferivelmente de pelo menos 40%, mais preferivelmente de pelo menos 50%, mais preferivelmente de pelo menos 60%, mais preferivelmente de pelo menos 70%, mais preferivelmente de pelo menos 80%, mais preferivelmente de pelo menos 90%, mais preferivelmente de pelo menos 100%, mais preferivelmente pelo menos 3 vezes, mais preferivelmente pelo menos 5 vezes, mais preferivelmente pelo menos 10 vezes, mais preferivelmente pelo me-

nos 25 vezes, mais preferivelmente pelo menos 50 vezes e mais preferivelmente pelo menos 100 vezes maior do que a quantidade de ácido siálico N-acetilneuramínico (NeuNc ou NeuNAc) das unidades de carboidrato total ou da cadeia de carboidrato particular em um sítio de glicosilação particular da

5 molécula de proteína/anticorpo em comparação com a mesma quantidade de moléculas de proteína/anticorpo de uma composição da molécula de proteína/anticorpo da mesma molécula de proteína/anticorpo isolada de pelo menos uma das linhagens celulares CHO, ou CHOdhfr-, ou BHK, ou NS0, ou SP2/0, ou PerC.6 ou hibridoma de camundongo, preferivelmente CHOdhfr-

10 [ATCC No. CRL-9096] quando ali expressa. O grau de sialilação pode ser detectado por métodos conhecidos pelas pessoas versadas na técnica, tais como, porém sem se limitar, a análise de imunoblot ou ELISA usando lectinas cujas ligações dependem da sialilação da estrutura do carboidrato, tal como SNA, MAL, MAL I ou PNA, por métodos de detecção químicos tal como

15 o método do ácido tiobarbitúrico, por HPLC ou espectrometria de massa ou uma combinação desses. As pessoas versadas na técnica podem selecionar o método mais adequado e adotá-lo e otimizá-lo para o propósito e maiores detalhes são descritos nos exemplos. É preferível uma análise de imunoblot usando SNA.

20 Em outra modalidade ainda mais preferida uma composição da molécula de proteína/anticorpo com homogeneidade melhorada em relação à sialilação é alcançada pelo uso de uma célula hospedeira de origem leucêmica mieloide humana da invenção, preferivelmente K562, NM-F9 [DSM ACC2606], NM-D4 [DSM ACC2605], NM-E- 2F9, NM-C-2F5, NM-H9D8, ou

25 NM-H9D8-E6, NM-H9D8-E6Q12, GT-2X e células ou linhagens celulares derivadas dessas, e mais preferivelmente K562, NM-E-2F9, NM-C-2F5, NM-H9D8, ou NM-H9D8-E6, NM-H9D8-E6Q12, GT-2X, as quais têm um grau de sialiação aumentado, e resulta em uma composição da molécula de proteína/anticorpo a qual compreende ácido siálico alfa 2-6 ligado, para ser detectável, por exemplo, por ligação de SNA, em uma versão mais preferida a

30 composição da molécula de proteína/anticorpo compreende ácidos siálicos alfa 2-6 e alfa 2-3 ligados.

Em outra modalidade preferida, uma composição da molécula de proteína/anticorpo com homogeneidade melhorada em relação à sialilação é obtida pelo uso de uma célula hospedeira de origem leucêmica mieloide humana, a qual compreende pelo menos uma sialiltransferase capaz de ligar NeuNAc em alfa 2-3 e pelo menos uma sialiltransferase capaz de ligar NeuNAc na ligação alfa 2-6 em grupos de açúcares, tais como, porém sem se limitar, a K562, NM-F9 [DSM ACC2606], NM-D4 [DSM ACC2605], NM-E-2F9, NM-C-2F5, NM- H9D8, ou NM-H9D8-E6, NM-H9D8-E6Q12, GT-2X e células ou linhagens celulares derivadas dessas, resultando dessa forma em uma composição mais preferida de glicoformas da molécula de proteína/anticorpo na composição da molécula de proteína/anticorpo.

Em uma modalidade ainda mais (preferida) da invenção, a referida composição da molécula de anticorpo com homogeneidade aumentada em relação à sialilação compreende pelo menos uma glicoforma de uma molécula de anticorpo com pelo menos uma cadeia de carboidratos ligada a outro sítio de glicosilação da molécula de anticorpo do que o aminoácido Asn-297 no segundo domínio (domínio Cgamma2) da região Fc.

Em uma modalidade ainda mais preferida da composição da molécula de anticorpo inicial com homogeneidade melhorada em relação à sialilação é expressa em uma célula hospedeira de origem leucêmica mieloide humana a qual tem um grau de sialilação aumentado e/ou compreende pelo menos uma sialiltransferase capaz de se ligar ao ácido siálico em alfa 2-3 e pelo menos uma sialiltransferase capaz de se ligar ao ácido siálico na ligação alfa 2-6 aos grupos de açúcares, tais como K562, NM-E-2F9, NM-C-2F5, NM- H9D8, ou NM-H9D8-E6, NM-H9D8-E6Q12, GT-2X e células ou linhagens celulares dela derivadas.

Em uma modalidade ainda mais preferida, a primeira molécula de anticorpo tem pelo menos um sítio de N-glicosilação (Asn-X-Ser/Thr, por meio do qual X pode ser qualquer aminoácido, exceto Pro) e/ou pelo menos um sítio de O-glicosilação em uma sequência da região Fab.

Em outra modalidade, a composição da molécula de anticorpo da invenção com homogeneidade em relação à sialilação melhorada com-

preendendo uma molécula de anticorpo a qual compreende pelo menos uma cadeia de carboidrato ligada a outro sítio de glicosilação da molécula de anticorpo diferente de Asn-297 no segundo domínio (domínio C γ 2) da parte Fc tem uma meia-vida no soro prolongada e/ou biodisponibilidade quando

5 medida em pelo menos um mamífero, tal como camundongos, ratos ou preferivelmente em seres humanos em relação à composição da molécula de anticorpo da mesma molécula de anticorpo isolada de pelo menos uma das linhagens celulares CHO, CHOdhfr- ou BHK, ou NS0 ou SP2/0, NM-F9, NM-D4 ou PerC6 ou hibridoma de camundongo, preferivelmente a linhagem celular CHOdhfr- [ATCC No. CRL-9096] quando ali expressa.

10

A biodisponibilidade dos anticorpos pode ser otimizada usando a presente invenção. A expressão das moléculas de anticorpo, particularmente em células com uma alta ou mesmo uma sialilação muito alta (grupos 1 e 3 discutidos acima) pode levar a uma composição de anticorpo com uma bio-

15 disponibilidade prolongada, enquanto que a expressão das moléculas de anticorpo nas células do grupo 2 pode levar a uma composição de anticorpo com uma biodisponibilidade comparavelmente reduzida. A biodisponibilidade pode ser testada conforme é conhecido pelas pessoas versadas na técnica e conforme descrito nos exemplos usando animais ou preferivelmente seres

20 humanos. Animais incluem camundongos, ratos, porquinhos-da-índia, cachorros ou macacos, porém não estão restrito àquelas espécies. Devido à natureza humana, aqueles animais os quais têm uma glicosilação e mais importante sialilação mais próxima do ser humano são preferidos, sendo os mais preferidos os seres humanos.

25 Em uma modalidade ainda mais preferida, a composição da molécula de anticorpo com homogeneidade melhorada em relação à sialilação é expressa em uma célula hospedeira de origem leucêmica mieloide humana da invenção, a qual tem um grau de sialilação aumentado e/ou compreende pelo menos uma sialiltransferase capaz de ligar o ácido siálico em alfa

30 2-3 e pelo menos uma sialiltransferase capaz de ligar ácido siálico na ligação alfa 2-6 em grupos de açúcares, tais como K562, NM-F9 [DSM ACC2606], NM-D4 [DSM ACC2605], NM-E-2F9, NM-C-2F5, NM-H9D8, ou NM-H9D8-

E6, e células ou linhagens celulares delas derivadas, e compreende pelo menos uma cadeia de carboidrato ligada a pelo menos um sítio de glicosilação e/ou pelo menos um sítio de O-glicosilação em uma sequência da região Fab da molécula de anticorpo e tem uma meia-vida no soro e/ou biodisponibilidade prolongada quando medida em pelo menos um mamífero tal como camundongo, ratos ou preferivelmente em seres humanos, do que a composição da molécula de anticorpo da mesma molécula de anticorpo isolada de pelo menos uma das linhagens celulares CHO, ou CHOdhfr-, ou BHK, ou NS0, ou SP2/0, ou PerC.6 ou hibridoma de camundongo, preferivelmente a linhagem celular CHOdhfr- [ATCC No. CRL-9096] quando ali expressa. Em outra modalidade preferida, a molécula de anticorpo expressa é Erbitux (Cetuximab).

De acordo com a presente invenção, o termo "rendimento aumentado" significa que a média do rendimento máximo de uma composição da molécula de proteína/anticorpo da invenção produzida em uma célula hospedeira de origem leucêmica mieloide humana é maior do que a respectiva média ou rendimento máximo de pelo menos uma composição da molécula de proteína/anticorpo da mesma molécula de proteína/anticorpo quando expressa em pelo menos uma das linhagens celulares CHO, ou CHOdhfr-, ou BHK, ou NS0, ou SP2/0 ou PerC.6 ou hibridoma de camundongo. Na modalidade preferida da invenção, isso significa que o rendimento médio ou máximo de uma composição da molécula de proteína/anticorpo da invenção expresso em uma célula hospedeira de origem leucêmica mieloide humana é maior do que a média respectiva ou rendimento máximo de uma composição da molécula de proteína/anticorpo da mesma molécula de proteína/anticorpo quando expressa em CHOdhfr- [ATCC No. CRL-9096] usando o gene dhfr de murino e metotrexato para amplificação em CHOdhfr-. O rendimento máximo e médio é medido em SPR, o qual reflete a produtividade de uma célula, mistura celular ou linhagem celular, pode ser determinado pelas pessoas versadas na técnica e é descrito na sua modalidade preferida nos exemplos.

Em uma modalidade ainda mais preferida da invenção pelo me-

nos o rendimento máximo ou o médio de uma composição da molécula de proteína/anticorpo da invenção em uma célula hospedeira de origem leucêmica mieloide humana, preferivelmente K562, NM-F9 [DSM ACC2606], NM-D4 [DSM ACC2605], NM-E-2F9, NM-C-2F5, NM-H9D8, ou NM-H9D8-E6, NM-H9D8-E6Q12, GT-2X ou uma célula ou linhagem celular derivada delas, é pelo menos 10% maior do que de acordo com a composição da molécula de proteína/anticorpo da mesma molécula de proteína/anticorpo expressa na linhagem celular CHOdhfr- [ATCC No. CRL-9096] usado o gene dhfr de murino e metotrexato para amplificação em CHOdhfr-, mais preferivelmente pelo menos 15%, mais preferivelmente pelo menos 20%, mais preferivelmente pelo menos 25%, mais preferivelmente pelo menos 30%, mais preferivelmente pelo menos 35%, mais preferivelmente pelo menos 45%, mais preferivelmente pelo menos 50%, mais preferivelmente pelo menos 55%, mais preferivelmente pelo menos 60%, mais preferivelmente pelo menos 70%, mais preferivelmente pelo menos 80%, mais preferivelmente pelo menos 90%, mais preferivelmente pelo menos 100%, mais preferivelmente pelo menos 3 vezes, mais preferivelmente pelo menos 4 vezes e mais preferivelmente mais de 5 vezes.

A invenção ainda fornece um ácido nucleico compreendendo

(a) uma sequência codificadora de uma proteína, preferivelmente uma molécula de anticorpo ou pelo menos uma parte da mesma, conforme descrito aqui em outros locais, e

(b) pelo menos uma sequência codificando uma sequência do grupo da sequência Nº 1 até a sequência Nº 9.

Em uma modalidade preferida da invenção, o ácido nucleico da invenção compreende

(a) uma sequência codificadora de uma proteína, preferivelmente uma molécula de anticorpo ou pelo menos uma parte da mesma, conforme descrito aqui em outros locais, e

(b) sequência codificando a sequência Nº 1.

Em outra modalidade preferida da invenção, o ácido nucleico acima descrito da invenção ainda compreende uma sequência codificando um

marcador de seleção, preferivelmente uma sequência codificando um polipeptídeo o qual induz uma resistência a antibiótico de células hospedeiras nas quais o referido ácido nucleico é introduzido, tal como, porém sem se limitar, à neomicina ou à puromicina.

- 5 Em outra modalidade preferida da invenção, o ácido nucleico acima descrito da invenção compreende ainda pelo menos uma sequência de pelo menos um elemento genético descrito aqui em outros lugares.

- A invenção ainda fornece uma célula hospedeira de origem leucêmica mieloide humana ou qualquer célula precursora ou linhagem celular
 10 mieloide ou mieloide humana a qual possa ser obtida a partir de um paciente com leucemia, ou qualquer célula precursora ou linhagem celular mieloide ou mieloide humana a qual possa ser obtida a partir de um doador humano ou uma mistura de células ou linhagens celulares compreendendo pelo menos uma célula de origem leucêmica mieloide humana, ou célula, células ou
 15 linhagem celular a qual tenha sido obtida pela fusão de pelo menos uma célula, células ou linhagem celular de origem leucêmica mieloide humana ou qualquer célula precursora ou linhagem celular mieloide ou mieloide humana a qual tenha sido obtida a partir de um paciente com leucemia, ou qualquer célula precursora ou linhagem celular mieloide ou mieloide humana a qual
 20 tenha sido obtida a partir de um doador humano, com outra célula de origem animal ou humana, tal como, porém sem se limitar, às células B, células CHO, compreendendo pelo menos um ácido nucleico codificando uma molécula de proteína/anticorpo ou partes suas, as quais tenham sido introduzidas nas referidas células.

- 25 A invenção fornece uma célula hospedeira da invenção descrita acima compreendendo pelo menos um ácido nucleico codificando uma molécula de proteína/anticorpo ou pelo menos uma parte da mesma.

- Em uma modalidade preferida, a invenção proporciona a célula hospedeira K562, NM-F9 [DSM ACC2606], NM-D4 [DSM ACC2605], NM-E-
 30 2F9, NM-C-2F5, NM-H9D8, ou NM-H9D8-E6, NM-H9D8-E6Q12, GT- 2X ou uma célula ou linhagem celular derivada de qualquer uma das referidas células hospedeiras, preferivelmente aquelas que crescem sob condições livres

de soro e a partir das quais uma composição da molécula de proteína/anticorpo é isolada sob condições livres de soro, e ainda mais preferivelmente aquelas nas quais o ácido nucleico codificando a molécula de anticorpo tenha sido introduzido sob condições livres de soro, compreendendo pelo menos um ácido nucleico codificando uma molécula de proteína/anticorpo ou partes suas, preferivelmente um ácido nucleico compreendendo uma sequência codificando uma molécula de proteína/anticorpo ou pelo menos uma parte da mesma, conforme descrito aqui em outros locais.

A invenção proporciona uma célula hospedeira da invenção descrita acima compreendendo pelo menos um ácido nucleico codificando pelo menos um polipeptídeo do grupo da sequência Nº 1 até a sequência Nº 9, preferivelmente sequência Nº 1.

A invenção proporciona uma célula hospedeira da invenção descrita acima compreendendo pelo menos um ácido nucleico codificando uma molécula de anticorpo ou partes suas e pelo menos um ácido nucleico codificando pelo menos um polipeptídeo do grupo da sequência Nº 1 até a sequência Nº 9, preferivelmente sequência Nº 1.

Em uma modalidade preferida, a invenção fornece a célula hospedeira K562, NM-F9 [DSM ACC2606], NM-D4 [DSM ACC2605], NM-E-2F9, NM-C-2F5, NM-H9D8, ou NM-H9D8-E6, NM-H9D8-E6Q12, GT- 2X ou uma célula ou linhagem celular derivada de qualquer uma das referidas células hospedeiras, preferivelmente aquelas que crescem sob condições livres de soro e a partir das quais uma composição da molécula de proteína/anticorpo é isolada sob condições livres de soro, e ainda mais preferivelmente aquelas nas quais o ácido nucleico codificando a molécula de proteína/anticorpo tenha sido introduzido sob condições livres de soro, compreendendo pelo menos um ácido nucleico codificando uma molécula de proteína/anticorpo ou partes suas, preferivelmente um ácido nucleico compreendendo uma sequência codificando uma molécula de proteína/anticorpo ou pelo menos uma parte da mesma, conforme descrito aqui em outros locais, e pelo menos uma sequência codificando uma sequência do grupo de sequência Nº 1 até a sequência Nº 9, preferivelmente a sequência Nº 1.

Em outra modalidade preferida, a invenção proporciona as células hospedeiras descritas acima, em que a molécula de anticorpo codificada é um anticorpo de WO2004/065423.

Em uma modalidade ainda mais preferida, a invenção proporciona as células hospedeiras acima descritas, em que a molécula de anticorpo codificada é o anticorpo PankoMab [Cancer Immunol Immunother. Novembro de 2006; 55 (11): 1337-47. Epub Fevereiro de 1996. PankoMab: a potent new generation anti-tumour MUC1 antibody. Danielczyk et al], preferivelmente uma forma quimérica de PankoMab com todos os domínios constantes humanos, e mais preferivelmente um PankoMab humanizado.

A invenção ainda fornece uma composição de molécula de proteína/anticorpo com atividade aumentada e/ou rendimento aumentado e/ou homogeneidade melhorada e glicosilação totalmente humana produzida por qualquer um dos métodos da invenção, conforme aqui descrito em outros locais.

Em uma modalidade preferida, a invenção proporciona uma composição da molécula de proteína/anticorpo produzida por qualquer um dos métodos da invenção que tem uma atividade aumentada e/ou rendimento aumentado e/ou homogeneidade melhorada e glicosilação totalmente humana produzida por qualquer um dos métodos da invenção, em comparação com uma composição da molécula de proteína/anticorpo da mesma molécula de proteína/anticorpo isolada de pelo menos uma das linhagens celulares CHO, ou CHOdhfr-, ou BHK, ou NS0, ou SP2/0, ou PerC.6 ou hibridoma de camundongo, preferivelmente CHOdhfr- [ATCC No. CRL-9096], quando ali expressa.

A molécula proteica ou parte da mesma expressa pode ser qualquer proteína ou parte de proteína ou fragmento de proteína. A molécula de proteína ou parte da mesma expressa pode ser qualquer anticorpo ou parte de anticorpo ou fragmento de anticorpo.

Composições de moléculas proteicas da presente invenção podem ser usadas para o tratamento terapêutico ou profilático de doenças, tais como leucemia, neutropenia, citopenia, câncer, transplante de medula ós-

sea, doenças dos sistemas hematopoiéticos, infertilidade e doenças autoimunes. O espectro de aplicações terapêuticas conhecidas pelas pessoas no campo da técnica, das composições de moléculas proteicas, é muito extenso. Por exemplo, G-CSF é um importante terapêutico para tratar neutropenia, um decréscimo de neutrófilos que põe a vida em risco como consequência de uma quimioterapia de pacientes com câncer leucêmico. GM-CSF é especificamente usado para o tratamento de pacientes AML em idade relativamente avançada depois de quimioterapia para obter uma rápida recuperação de neutropenia. GM-CSF é adicionalmente aprovado como terapêutico para várias aplicações em transplantes de medula óssea e para a mobilização de células tronco do sangue periféricas. Além disso, existem várias aplicações clínicas de GM-CSF que estão atualmente sob investigação, tais como para o tratamento de HIV e câncer. Certas doenças do sistema hematopoiético são tratadas com EPO, e IFN-beta é atualmente um importante terapêutico para o tratamento de esclerose múltipla, uma doença autoimune. Outro exemplo é FSH, o qual é amplamente utilizado para o tratamento de infertilidade masculina ou feminina. hCG é também aplicado para o tratamento de infertilidade, porém com foco na anovulação em mulheres. hGH tem benefícios clinicamente comprovados, tais como redução da gordura corporal e aumento no tecido muscular.

Composições de moléculas proteicas da presente invenção também podem ser usadas para a produção de um medicamento para tratamentos profiláticos e/ou terapêuticos de doenças selecionadas do grupo compreendendo leucemia, neutropenia, citopenia, câncer, transplante de medula óssea, doenças do sistema hematopoiético, infertilidade e doenças autoimunes.

Em uma modalidade preferida da invenção, a molécula de anticorpo expressa é uma molécula de anticorpo reconhecendo psoríase, artrite reumatoide, doença de Crohn, colite ulcerativa, doenças autoimunes, SLE, esclerose múltipla, distúrbios hematológicos autoimunes, asma, alergia, doença de enxerto versus hospedeiro, rejeição de aloenxerto, cirurgia de glaucoma, enfarte do miocárdio, vírus como RSV, HIV, Hep B ou CMV, câncer,

sarcoma, CLL, AML ou NHL.

Em uma modalidade ainda mais preferida da invenção, a molécula de anticorpo expressa é uma molécula de anticorpo reconhecendo câncer, tumor ou metástase, pelo menos uma célula cancerígena ou célula tumoral em pelo menos um ser humano, preferivelmente selecionada do grupo das doenças cancerígenas ou doenças tumorais da região ouvido-nariz-garganta, dos pulmões, mediastino, trato gastrointestinal, sistema urogenital, sistema ginecológico, mama, sistema endócrino, sarcomas de tecido conjuntivo, pele e osso, mesoteliomas, melanomas, neoplasmas do sistema nervoso central, doenças cancerígenas ou doenças tumorais durante a infância, linfomas, leucemias, síndromes paraneoplásticas, metástases com tumor primário desconhecido (síndrome CPU), carcinomatoses peritoneais, malignidades relacionadas à imunossupressão e/ou metástases tumorais.

Em uma modalidade preferida da invenção, o anticorpo expresso ou parte da mesma é um anticorpo anti-MUC1.

Em outra modalidade preferida da invenção, a molécula de anticorpo codificada pelo ácido nucleico ou ácidos nucleicos da invenção é o anticorpo Rituximab, Herceptina, Erbitux, Campath 1H ou anticorpos destes derivados.

Em uma modalidade ainda mais preferida da invenção, a molécula de anticorpo codificada pelo ácido nucleico ou ácidos nucleicos da invenção é um anticorpo de WO2004/050707, e ainda mais preferivelmente de WO2004/065423, e ainda mais preferivelmente PankoMab [Cancer Immunol Immunother. Novembro de 2006; 55 (11): 1337-47. Epub Fevereiro de 2006. PankoMab: a potent new generation anti-tumour MUC1 antibody. Danielczyk et al], e ainda mais preferivelmente uma versão quimérica sua compreendendo todos os domínios constantes humanos, e ainda mais preferivelmente um anticorpo humanizado seu.

Em uma modalidade ainda mais preferida da invenção, a molécula de anticorpo codificada pelo ácido nucleico ou ácidos nucleicos da invenção são qualquer molécula inteira da invenção, preferivelmente Rituximab, Herceptina, Erbitux, mais preferivelmente WO2004/065423, mais prefe-

5 rivelmente PankoMab, por meio do que a composição da molécula de anticorpo isolada de qualquer célula hospedeira da invenção, preferivelmente K562, NM-F9 [DSM ACC2606], NM-D4 [DSM ACC2605], NM-E-2F9, NM-C-2F5, NM-H9D8 ou NM-H9D8-E6, NM-H9D8-E6Q12, GT-2X ou uma célula ou linhagem celular derivada de qualquer uma das referidas células hospedeiras compreende nenhum NeuGc detectável. O mesmo se aplica às proteínas em geral.

10 Em uma modalidade ainda mais preferida da invenção, a molécula de anticorpo codificada pelo ácido nucleico ou ácidos nucleicos da invenção é qualquer molécula de anticorpo inteira ou uma molécula de anticorpo compreendendo o domínio Cgamma2 da invenção, preferivelmente Rituximab, Herceptina, Erbitux, mais preferivelmente WO2004/065423, mais preferivelmente PankoMab, por meio do que a composição da molécula de anticorpo isolada de uma célula hospedeira da invenção, preferivelmente
15 K562, NM-F9 [DSM ACC2606], NM-D4 [DSM ACC2605], NM-E-2F9, NM-C-2F5, NM-H9D8 ou NM-H9D8-E6, NM-H9D8-E6Q12, GT-2X ou uma célula ou linhagem celular derivada de qualquer uma das referidas células hospedeiras compreende pelo menos uma glicoforma com ácido alfa 2-6 siálico. O mesmo se aplica às proteínas em geral.

20 Em uma modalidade ainda mais preferida da invenção, a molécula de anticorpo codificada pelo ácido nucleico ou ácidos nucleicos da invenção é qualquer molécula de anticorpo inteira ou uma molécula de anticorpo compreendendo o domínio Cgamma2 da invenção, preferivelmente Rituximab, Herceptina, Erbitux, Campath 1H, mais preferivelmente
25 WO2004/065423, mais preferivelmente PankoMab, por meio do que a composição da molécula de anticorpo isolada de uma célula hospedeira NM-E-2F9, NM-C-2F5, NM-H9D8 ou NM-H9D8-E6, NM-H9D8-E6Q12, GT-2X ou uma célula ou linhagem celular derivada de qualquer uma das referidas células hospedeiras compreende ácido alfa 2-6 siálico, o qual é detectável por
30 análise de imunoblot com a lectina SNA conforme descrito nos exemplos. O mesmo se aplica às proteínas em geral.

Em uma modalidade preferida da invenção, a molécula de anti-

corpo codificada pelo ácido nucleico ou ácidos nucleicos da invenção é qualquer molécula de anticorpo, preferivelmente Rituximab, Herceptina, Erbitux, Campath 1H, mais preferivelmente WO2004/065423, mais preferivelmente PankoMab, e a composição da molécula de anticorpo isolada de uma
5 célula hospedeira NM-F9 ou NM-D4 da invenção após o cultivo em meio livre de soro e mais preferivelmente em meio sem-proteína tem uma homogeneidade melhorada sem ácidos siálicos detectáveis. O mesmo se aplica às proteínas em geral.

Em uma modalidade preferida da invenção, a molécula de anticorpo codificada pelo ácido nucleico ou ácidos nucleicos da invenção é o
10 anticorpo Rituximab, Herceptina, Campath 1H ou anticorpos desses derivados, e a composição da molécula de anticorpo isolada da célula hospedeira da invenção tem uma atividade ADCC aumentada de pelo menos 4 vezes em relação à atividade da composição da molécula de anticorpo a partir da
15 mesma molécula de anticorpo expressa na linhagem celular de CHOdhfr-[ATCC No. CRL-9096].

Em uma modalidade ainda mais preferida da invenção, a molécula de anticorpo codificada pelo ácido nucleico ou ácidos nucleicos da invenção é qualquer molécula de WO2004/065423, mais preferivelmente Pan-
20 koMab, e a composição da molécula de anticorpo isolada da célula hospedeira da invenção tem uma atividade ADCC aumentada de pelo menos 4 vezes maior quando produzida em pelo menos uma das células K562, NM-F9 [DSM ACC2606], NM-D4 [DSM ACC2605], NM-E-2F9, NM-C-2F5, NM-H9D8, ou NM-H9D8-E6, NM-H9D8-E6Q12, GT-2X ou uma célula ou linha-
25 gem celular derivada de qualquer uma das referidas células hospedeiras em relação à atividade da composição da molécula de anticorpo a partir da mesma molécula de anticorpo expressa na linhagem celular CHOdhfr-[ATCC No. CRL-9096].

Em outra modalidade preferida da invenção, a molécula de anticorpo codificada pelo ácido nucleico ou ácidos nucleicos da invenção é um
30 anticorpo de WO2004/065423, mais preferivelmente PankoMab, e a composição da molécula de anticorpo isolada da célula hospedeira da invenção

K562, NM-F9 [DSM ACC2606], NM-D4 [DSM ACC2605], NM-E-2F9, NM-C-2F5, NM-H9D8, ou NM-H9D8-E6, NM-H9D8-E6Q12, GT-2X ou uma célula ou linhagem celular derivada de qualquer uma das referidas células hospedeiras tem uma atividade de ligação aumentada ao seu etitopo pelo menos 50% maior, preferivelmente 2 vezes maior do que a atividade da composição da molécula de anticorpo a partir da mesma molécula de anticorpo expressa na linhagem celular CHOdhfr- [ATCC No. CRL-9096].

Em outra modalidade preferida da invenção, a molécula de anticorpo codificada pelo ácido nucleico ou ácidos nucleicos da invenção é um anticorpo de WO 2004/065423, mais preferivelmente PankoMab, e a composição da molécula de anticorpo isolada da célula hospedeira NM-F9 ou NM-D4 da invenção após o cultivo em meio sem-soro e mais preferivelmente sem-proteína tem uma homogeneidade melhorada sem ácidos siálicos detectáveis. O mesmo se aplica às proteínas em geral.

Em outra modalidade preferida da invenção, a molécula de anticorpo codificada pelo ácido nucleico ou ácidos nucleicos da invenção é um anticorpo de WO2004/065423, mais preferivelmente PankoMab, e a composição da molécula de anticorpo isolada da célula hospedeira da invenção K562, NM-F9 [DSM ACC2606], NM-D4 [DSM ACC2605], NM-E-2F9, NM-C-2F5, NM-H9D8, ou NM-H9D8-E6, NM-H9D8-E6Q12, GT-2X ou uma célula ou linhagem celular derivada de qualquer uma das referidas células hospedeiras tem uma homogeneidade melhorada com pelo menos 10% a mais de ácidos siálicos do que a composição da molécula de anticorpo a partir da mesma molécula de anticorpo expressa na linhagem celular CHOdhfr- [ATCC No. CRL-9096]. O mesmo se aplica às proteínas em geral.

Em outra modalidade preferida da invenção, a molécula de anticorpo codificada pelo ácido nucleico ou ácidos nucleicos da invenção é um anticorpo de WO2004/065423, mais preferivelmente PankoMab, e a composição da molécula de anticorpo isolada da célula hospedeira da invenção tem uma homogeneidade melhorada com um grau mais elevado de ausência de ácidos siálicos detectáveis quando expresso em NM-F9 ou NM-D4 em comparação com uma composição da molécula de anticorpo a partir da

mesma molécula de anticorpo expressa na linhagem celular de CHOdhfr- [ATCC No. CRL-9096]. O mesmo se aplica às proteínas em geral.

Em outra modalidade preferida da invenção, a molécula de anticorpo codificada pelo ácido nucleico ou ácidos nucleicos da invenção é um anticorpo de WO2004/065423, mais preferivelmente PankoMab, e a composição da molécula de anticorpo isolada da célula hospedeira da invenção tem uma homogeneidade melhorada conforme descrito acima, e uma atividade ADCC de pelo menos 4 vezes maior do que a atividade da composição da molécula de anticorpo a partir da mesma molécula de anticorpo expressa na linhagem celular de CHOdhfr- [ATCC No. CRL-9096].

Na modalidade mais preferida da invenção, a molécula de anticorpo codificada pelo ácido nucleico ou ácidos nucleicos da invenção é um anticorpo de WO2004/065423, mais preferivelmente PankoMab.

A invenção ainda fornece uma célula hospedeira para produzir uma composição da molécula de proteína/anticorpo com atividade aumentada e/ou rendimento aumentado e/ou homogeneidade melhorada e glicosilação totalmente humana no sentido da invenção, conforme descrito aqui em outros locais, em que a célula hospedeira é qualquer célula, células ou linhagem celular de origem leucêmica mieloide humana ou qualquer célula precursora ou linhagem celular mieloide ou mieloide humana a qual pode ser obtida a partir de um paciente com leucemia, ou qualquer célula precursora ou linhagem celular mieloide ou mieloide humana a qual pode ser obtida a partir de um doador humano ou uma mistura de células ou linhagens celulares compreendendo pelo menos uma célula de origem leucêmica mieloide humana, ou uma célula ou linhagem celular derivada delas conforme descrito aqui em outros locais, ou uma mistura de células ou linhagens celulares compreendendo pelo menos uma daquelas células anteriormente mencionadas.

A invenção também fornece uma célula hospedeira para produzir uma composição de molécula de proteína/anticorpo com atividade aumentada e/ou rendimento aumentado e/ou homogeneidade melhorada e glicosilação totalmente humana no sentido da invenção, conforme descrito aqui

em outros locais, em que a célula hospedeira é qualquer célula, células ou linhagem celular a qual tenha sido obtida pela fusão de pelo menos uma célula, células ou uma linhagem celular de origem leucêmica mieloide humana ou qualquer célula ou linhagem celular precursora mieloide ou mieloide humana a qual possa ser obtida a partir de um paciente com leucemia, ou qualquer célula ou linhagem celular precursora mieloide ou mieloide humana a qual possa ser obtida a partir de um doador humano, com outra célula de origem humana ou animal, tal como, porém sem se limitar, às células B e células CHO.

10 Em uma modalidade preferida, a referida célula hospedeira da invenção que proporciona a produção de uma composição de molécula de proteína/anticorpo com atividade aumentada e/ou rendimento aumentado e/ou homogeneidade melhorada no sentido da invenção conforme descrito aqui em outros locais, é a célula ou linhagem celular KG1, MUTZ-3, K562, 15 NM-F9 [DSM ACC2606], NM-D4 [DSM ACC2605], NM-E-2F9, NM-C-2F5, NM-H9D8 ou NM-H9D8-E6, NM-H9D8-E6Q12, GT-2X ou uma célula ou linhagem celular derivada destas, ou uma mistura de células ou linhagens celulares compreendendo uma daquelas células anteriormente mencionadas.

20 Em outra modalidade preferida, a referida célula hospedeira da invenção que proporciona a produção de uma composição de molécula de proteína/anticorpo com atividade aumentada e/ou rendimento aumentado e/ou homogeneidade melhorada no sentido da invenção conforme descrito aqui em outros locais, é a célula ou linhagem celular K562, NM-F9 [DSM 25 ACC2606], NM-D4 [DSM ACC2605], NM-E-2F9, NM-C-2F5, NM-H9D8, ou NM-H9D8-E6, NM-H9D8-E6Q12, GT-2X ou uma célula ou linhagem celular derivada destas.

30 Em outra modalidade preferida, a referida célula hospedeira da invenção que proporciona a produção de uma composição de molécula de proteína/anticorpo com atividade aumentada e/ou rendimento aumentado e/ou homogeneidade melhorada no sentido da invenção conforme descrito aqui em outros locais, é a célula ou linhagem celular NM-F9 [DSM ACC2606],

NM-D4 [DSM ACC2605], NM-E-2F9, NM-C-2F5, NM-H9D8, ou NM-H9D8-E6, NM-H9D8-E6Q12, GT-2X ou uma célula ou linhagem celular derivada destas ou uma célula ou linhagem celular derivada destas conforme descrito aqui em outros locais.

5 Em uma modalidade ainda mais preferida, a referida célula hospedeira da invenção que proporciona a produção de uma composição de molécula de proteína/anticorpo com atividade aumentada e/ou rendimento aumentado e/ou homogeneidade melhorada no sentido da invenção conforme descrito aqui em outros locais, é a célula ou linhagem celular derivada de

10 KG1, MUTZ-3, K562, NM-F9 [DSM ACC2606], NM-D4 [DSM ACC2605], NM-E-2F9, NM-C-2F5, NM-H9D8 ou NM-H9D8-E6, NM-H9D8-E6Q12, GT-2X ou uma célula ou linhagem celular derivada destas conforme descrito aqui em outros locais, as quais crescem sob condições sem-soro, e preferivelmente aquelas nas quais o ácido nucleico codificando a molécula de proteína/anticorpo pode ser introduzida nessas células e uma composição da molécula de anticorpo é isolada sob condições sem-soro.

15

 Em uma modalidade ainda mais preferida, a referida célula hospedeira da invenção que proporciona a produção de uma composição de molécula de proteína/anticorpo com atividade aumentada e/ou rendimento

20 aumentado e/ou homogeneidade melhorada no sentido da invenção conforme descrito aqui em outros locais é a célula ou linhagem celular derivada de K562, NM-F9 [DSM ACC2606], NM-D4 [DSM ACC2605], NM-E-2F9, NM-C-2F5, NM-H9D8 ou NM-H9D8-E6, NM-H9D8-E6Q12, GT-2X ou uma célula ou linhagem celular derivada destas conforme descrito aqui em outros locais, as

25 quais crescem sob condições sem-soro.

 Em uma modalidade ainda mais preferida, a referida célula hospedeira da invenção que proporciona a produção de uma composição de molécula de proteína/anticorpo com atividade aumentada e/ou rendimento aumentado e/ou homogeneidade melhorada no sentido da invenção conforme descrito aqui em outros locais é a célula ou linhagem celular derivada de

30 K562, NM-F9 [DSM ACC2606], NM-D4 [DSM ACC2605], NM-E-2F9, NM-C-2F5, NM-H9D8 ou NM-H9D8-E6, NM-H9D8-E6Q12, GT-2X ou uma célula ou

linhagem celular derivada destas conforme descrito aqui em outros locais, as
quais crescem sob condições sem-soro e nas quais o ácido nucleico codifi-
cando a molécula de proteína/anticorpo pode ser introduzido nessas células
e uma composição da molécula de proteína/anticorpo é isolada sob condi-
5 ções sem-soro.

Na modalidade mais preferida, a referida célula hospedeira da
invenção que proporciona a produção de uma composição de molécula de
proteína/anticorpo com atividade aumentada e/ou rendimento aumentado
e/ou homogeneidade melhorada no sentido da invenção conforme descrito
10 aqui em outros locais é a célula ou linhagem celular NM-F9 [DSM ACC2606],
NM-D4 [DSM ACC2605], NM-E-2F9, NM-C-2F5, NM-H9D8 ou NM-H9D8-E6,
NM-H9D8-E6Q12, GT-2X ou uma célula ou linhagem celular derivada destas
conforme descrito aqui em outros locais, as quais crescem sob condições
sem-soro e preferivelmente aquelas nas quais o ácido nucleico codificando a
15 molécula de proteína/anticorpo pode ser introduzido nessas células e a
composição da molécula de proteína/anticorpo é isolada sob condições sem-
soro.

A invenção ainda fornece uma composição de proteína/proteína
isolada por qualquer um dos métodos da invenção descritos em outros locais
20 aqui.

A invenção ainda fornece uma composição da molécula de pro-
teína isolada por qualquer um dos métodos da invenção descritos em outros
locais aqui, a qual tem uma atividade aumentada e/ou rendimento aumenta-
do e/ou homogeneidade melhorada e glicosilação totalmente humana no
25 sentido da invenção e descrita aqui em outros locais.

Em outra modalidade preferida da invenção, a molécula de pro-
teína ou parte da mesma tem um tamanho de pelo menos 10 KDa, preferi-
velmente um tamanho de pelo menos 15 KDa, mais preferivelmente um ta-
manho de pelo menos 20 KDa, mais preferivelmente um tamanho de pelo
30 menos 25 KDa, mais preferivelmente um tamanho de pelo menos 30 KDa,
mais preferivelmente um tamanho de pelo menos 35 KDa, mais preferivel-
mente um tamanho de pelo menos 40 KDa, mais preferivelmente um tama-

nho de pelo menos 45 KDa, mais preferivelmente um tamanho de pelo menos 50 KDa, mais preferivelmente um tamanho de pelo menos 55 KDa, mais preferivelmente um tamanho de pelo menos 60 KDa, mais preferivelmente um tamanho de pelo menos 65 KDa, mais preferivelmente um tamanho de pelo menos 70 KDa, mais preferivelmente um tamanho de pelo menos 75 KDa, mais preferivelmente um tamanho de pelo menos 80 KDa, mais preferivelmente um tamanho de pelo menos 85 KDa, mais preferivelmente um tamanho de pelo menos 90 KDa, mais preferivelmente um tamanho de pelo menos 95 KDa, mais preferivelmente um tamanho de pelo menos 100 KDa, mais preferivelmente um tamanho de pelo menos 105 KDa, mais preferivelmente um tamanho de pelo menos 110 KDa, mais preferivelmente um tamanho de pelo menos 115 KDa, mais preferivelmente um tamanho de pelo menos 120 KDa, mais preferivelmente um tamanho de pelo menos 125 KDa, mais preferivelmente um tamanho de pelo menos 130 KDa, mais preferivelmente um tamanho de pelo menos 135 KDa, mais preferivelmente um tamanho de pelo menos 140 KDa, mais preferivelmente um tamanho de pelo menos 145 KDa, mais preferivelmente um tamanho de pelo menos 150 KDa, mais preferivelmente um tamanho de pelo menos 155 KDa, mais preferivelmente um tamanho de pelo menos 160 KDa, mais preferivelmente um tamanho de pelo menos 165 KDa, mais preferivelmente um tamanho de pelo menos 170 KDa, mais preferivelmente um tamanho de pelo menos 175 KDa, mais preferivelmente um tamanho de pelo menos 180 KDa, mais preferivelmente um tamanho de pelo menos 185 KDa, mais preferivelmente um tamanho de pelo menos 190 KDa, mais preferivelmente um tamanho de pelo menos 195 KDa, mais preferivelmente um tamanho de pelo menos 200 KDa.

Em uma modalidade preferida da invenção, a referida composição de molécula de proteína originada de qualquer molécula proteica do grupo das citocinas e seus receptores, por exemplo, os fatores de necrose tumoral TNF-alfa e TNF-beta; renina; hormônio do crescimento humano e hormônio do crescimento bovino; fator de liberação do hormônio de crescimento; hormônio da paratireoide; hormônio estimulador da tireoide; lipoproteínas; alfa-1-antitripsina; cadeia A e cadeia B de insulina; gonadotrofinas,

por exemplo, hormônio do folículo estimulante (FSH), hormônio luteinizante (LH), tirotrófina e gonadotrofina coriônica humana (hCG); calcitonina; glucagon; fatores de coagulação, tais como fator VIIIc, fator IX, fator VII, fator tecidual e fator de Von Willebrands; fatores anticoagulantes tal como proteína C; fator natriurético atrial; tensoativo pulmonar; ativadores do plasminogênio, tal como uroquinase, ativador do plasminogênio tipo tecidual e urina humana; bombesina; trombina; fator do crescimento hematopoiético; encefalinase; proteína inflamatória do macrófago humano; albumina do soro, tal como albumina do soro humana; substância inibidora de Müller; cadeia A e cadeia B da relaxina; prorrelaxina; peptídeo associado à gonadotrofina de camundongo; fator de crescimento endotelial vascular; receptores para hormônios ou fatores de crescimento; integrina; proteína A e D; fatores da reumatoide; fatores neurotróficos tais como fator neurotrófico derivado ósseo, neurotrófina 3, 4, 5, 6 e beta-fator de crescimento de nervos; fator de crescimento derivado de plaquetas; fatores de crescimento do fibroblasto; fator de crescimento epidérmico; fator transformador de crescimento, tal como TGF-alfa e TGF-beta; fator de crescimento tipo insulina I e II; proteínas de ligação ao fator de crescimento tipo insulina; proteínas CD, tais como CD-3, CD-4, CD-8 e CD-19; eritropoietina (EPO); fatores osteoindutores; imunotoxinas; uma proteína morfogenética óssea; um interferon, tal como interferon alfa, beta e gama; fatores estimuladores de colônia (CSFs); por exemplo, M-CSF, GM-CSF e G-CSF; interleucinas (ILs), por exemplo, IL-1 até IL-12; superóxido desmutase; receptores de células T; proteínas da membrana de superfície; fator acelerador de decaimento; anticorpos e imunoadesinas; glicoforina A; MUC1.

Em uma modalidade mais preferida da invenção, a referida composição da molécula proteica é originada de qualquer uma das moléculas de proteína do grupo glicoforina A, EPO, G-CSF, GM-CSF, FSH, hCG, LH, interferons, interleucinas, anticorpos e/ou fragmentos seus.

É também fornecida uma proteína glicólica ou composição proteica obténível pelos métodos de produção de acordo com a presente invenção. A referida proteína preferivelmente tem as características de glicosilação conforme definidas na reivindicação 27.

Preferivelmente, a referida composição de proteína é uma composição da molécula de anticorpo. A invenção ainda fornece uma composição da molécula de anticorpo isolada por qualquer um dos métodos da invenção descritos aqui em outros locais, a qual tenha uma atividade melhorada e/ou rendimento melhorado e/ou homogeneidade melhorada no sentido da invenção e descrita aqui em outros locais.

Exemplos de tais anticorpos incluem anticorpos contra o gangliósido GD3, a cadeia alfa receptora da interleucina 5 humana, HER2, receptor de quimiocina CC 4, CD20, CD22, neuroblastoma, MUC1, receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR).

Em uma modalidade preferida da invenção, a referida composição da molécula de anticorpo é originada de qualquer uma das moléculas de anticorpo do grupo Muromomab, Daclizumab, Basiliximab, Abciximab, Rituximab, Herceptina, Gentuzumab, Alentuzumab, Ibritumomab, Cetuximab (Erbix), Bevacizumab, Tositumomab, Pavlizumab, Infliximab, Eculizumab, Epratuzumab, Omalizumab, Efalizumab, Adalimumab, Campath-1H, C2B8, Panorex, BrevaRex, Simulect, Antova, OKT3, Zenapax, ReoPro, Synagis, Ostavir, Protovir, OvaRex, Vitaxin.

Em uma modalidade mais preferida da invenção, a referida composição da molécula de anticorpo é originada de qualquer uma das moléculas de anticorpo do grupo Rituximab, Herceptina, anticorpo do receptor 4 de quimiocina anti-CC KM2160, Campath-1H, C2B8, Erbitux, anticorpo anti-neuroblastoma chCE7. Em uma modalidade mais preferida da invenção, a referida composição da molécula de anticorpo é originada da molécula de anticorpo do grupo WO2004/065423, mais preferivelmente PankoMab, mais preferivelmente sua forma quimérica e mais preferivelmente sua forma humanizada.

É também fornecida uma proteína ou composição proteica obtível pelo método de produção da presente invenção, em que a proteína é um anticorpo o qual se liga ao etitopo MUC1, compreendendo a sequência de aminoácidos DTR.

MUC-1 é um marcador tumoral estabelecido expresso em uma

variedade de tumores epiteliais e é um alvo tumoral potencial. MUC-1 é uma glicoproteína transmembranar altamente O-glicosilada. A porção extracelular consiste em uma quantidade variável de 20 a 120 repetições em tandem (TR), cada uma das quais consistindo em 20 aminoácidos com cinco potenciais lados de O-glicosilação. MUC 1 não é somente expresso em tecidos epiteliais, mas também em células hematopoiéticas. Vários anticorpos são conhecidos, os quais se ligam à porção DTR de MUC1, os quais também são proteínas/anticorpos adequados no contexto da presente invenção (para uma visão geral ver Karsten et al., 1998). Karsten também descreveu um novo etitopo conformacional induzido por carboidrato em MUC1 (TA MUC) de estrutura ...PDT*RP... onde T* é O-glicosilado. Os glicanos presentes neste sítio são eles próprios estruturas de carboidrato tumor-específicas.

Desta forma, é desejável usar um anticorpo MUC o qual possa discriminar entre o etitopo de tumor TA MUC e o etitopo não-glicosilado. Um anticorpo adequado capaz de reconhecer especificamente o etitopo TA MUC glicosilado é o anticorpo PankoMab. Sua produção é descrita em detalhes em Danielczyk et al 2006, aqui totalmente incorporado por referência (PankoMab: a potent new generation anti-tumor MUC-1 antibody). O anticorpo PankoMab ou uma variante sua, se ligando competitivamente ao mesmo etitopo TA-MUC 1 como o anticorpo Panko Mab de origem é preferivelmente usado. Tal variante de anticorpo tem pelo menos uma das seguintes características:

- ele se liga a um etitopo compreendendo pelo menos a sequência de aminoácidos PDTRP;
- ele se liga a um peptídeo MUC curto de 30 aminoácidos compreendendo 1,5 TRs quando ele é glicosilado com Gal-NAc α na sequência PDTRP, porém não se o mesmo peptídeo não for glicosilado;
- ele apresenta um efeito de comprimento aditivo maior do que 25, preferivelmente 28 (mais preferivelmente uma proporção de 29,5);
- ele demonstra uma baixa ou mesmo ausência de ligação às células do sistema hematopoiético (em relação ao método de detecção, ver Danielczyk et al 2006, aqui incorporado por referência);

- ele tem uma alta afinidade para as células variando de aproximadamente pelo menos $K_{ass} = 0,2 - 1 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$, conforme definido por análise do gráfico Scatchard.

Exemplos adequados das respectivas variantes são dados nos exemplos. O anticorpo pode ser de murino, origem, quimérico ou humanizado.

O anticorpo que se liga ao etitopo TA-MUC1, preferivelmente o anticorpo PankoMab ou os anticorpos Panko 1 e Panko 2, conforme aqui descritos, tem pelo menos uma das seguintes características de glicosilação:

- 10 (i) ele tem um grau de sialilação aumentado com uma quantidade pelo menos 15% maior de ácido N-acetilneuramínico nas estruturas de carboidrato totais ou nas estruturas do carboidrato em um sítio de glicosilação particular da molécula de anticorpo das moléculas de anticorpo na referida composição da molécula de anticorpo do que a mesma quantidade das moléculas de anticorpo de pelo menos uma composição da molécula de anticorpo da mesma molécula de anticorpo isolada de CHOdhfr- [ATCC No. CRL-9096] quando ali expressa;
- 15 (ii) ele tem um grau de galactosilação maior com pelo menos uma quantidade 5% maior de estruturas G2 nas estruturas de carboidrato totais ou nas estruturas do carboidrato em um sítio de glicosilação particular da molécula de anticorpo das moléculas de anticorpo na referida composição da molécula de anticorpo do que a mesma quantidade das moléculas de anticorpo de pelo menos uma composição da molécula de anticorpo da mesma molécula de anticorpo isolada de CHOdhfr- [ATCC No. CRL-9096] quando ali expressa;
- 20 (iii) ela compreende uma quantidade detectável de bisecGlc-Nac;
- 25 (iv) ela não tem ou é menos de 2% híbrida ou grandes estru-
- 30

ras de manose.

Um respectivo padrão de glicosilação resulta no seguinte padrão de atividade benéfico e surpreendente:

- 5 (i) uma atividade CDC a qual é maior de 15% superior do que a atividade do mesmo anticorpo expresso em células CHO;
- (ii) uma meia-vida no soro a qual é prolongada por um fator de 2 (mais de 1,5) em comparação com um anticorpo o qual não possui grau de sialilação detectável;
- 10 (iii) ele tem uma citotoxicidade celular mediada por Fc aumentada a qual é pelo menos 2 vezes maior do que a citotoxicidade celular mediada por Fc de pelo menos uma composição de molécula de anticorpo a partir da mesma molécula de anticorpo quando expressa na linhagem celular CHOdhfr- [ATCC No. CRL-9096].

15 Um respectivo anticorpo pode ser obtido pela sua produção nas linhagens celulares de acordo com a presente invenção, o qual proporciona um alto grau de sialilação e galactosilação, porém preferivelmente uma fuco-silação reduzida. Exemplos similares são NM-H9D8 e NM-H9D8-E6.

As tabelas e figuras a seguir ilustram a presente invenção.

20 As tabelas 1 a 8 a seguir e as figuras 1 a 17 ilustram a presente invenção.

Tabela 1: Rendimento do PankoMab quimérico expresso em CHOdhfr- e NM-F9 cultivados em meio suplementado com FCS.

25 Tabela 2: Rendimento do PankoMab quimérico expresso em NM-H9D8 [DSM ACC2806] cultivados em meio sem-soro.

Tabela 3: Quantificação do teor de ácido siálico em PankoMab e CetuxiMab: os anticorpos foram produzidos pela linhagem celular idêntica e quantificados pela integração da área do pico obtido por cromatografia em fase reversa das variantes do ácido siálico marcado com DMB. NeuGc e 30 NeuAc foram diferenciados pelo uso de um padrão de ácido siálico.

Tabela 4: Quantificação das estruturas diferentemente carregadas em Panko1 e PankoMab: O N-glicano marcado com 2-AB foram subme-

tido à cromatografia de troca aniônica (coluna Asahi-PAK) e os picos correspondentes às estruturas diferentemente carregadas foram quantificados por integração.

5 Tabela 5: O grau de galactosilação dos anticorpos Panko1 e PankoMab foi determinado por HPLC de aminofase (coluna Luna-NH2) dos glicanos marcados com 2-AB. Os picos foram quantificados por integração e a estrutura do glicano subjacente foi analisada por espectrometria de massa.

10 Tabela 6: Quantificação das estruturas triantenadas e biantenadas/bifurcadas em Panko1 e PankoMab. Os GlcNAc potencialmente bifurcados contendo frações da HPLC-aminofase foram coletados e submetidos a uma cromatografia de fase reversa (coluna RP18). Através disso, estruturas biantenadas + bifurcadas podem ser distintas. O grau de fucosilação dos anticorpos foi determinado por HPLC em aminofase (coluna Luna-NH2) dos glicanos 2-AB marcados. Os picos foram quantificados por integração e a
15 estrutura do glicano subjacente foi analisada por espectrometria de massa. As estruturas fucosiladas e não-fucosiladas foram determinadas e as áreas dos picos integrados foram quantificadas.

Tabela 7: Rendimento de hFSH expresso em CHOdhfr- e GT-2x cultivados em meio suplementado com FCS (CHOdhfr-) ou meio sem-soro.

20 Tabela 8: Rendimento de hFSH expresso em NM-H9D8 [DSM ACC2806] cultivado em meio sem-soro.

Tabela 9: Glicosilação adequada e combinações de atividade obteníveis com o método de acordo com a presente invenção.

25 Tabela 10: Valores obtidos de bisecGlcNAc e fucose em diferentes linhagens celulares.

Figura 1: expressão de RNAm fut8 das células NM-F9, NM-D4 e NM-H9D8 [DSM ACC2806]. Como controle foram usadas células HepG2.

Figura 2: Ensaio de liberação de európio com Cetuximab isolado das células NM-H9D8-E6, células CHOdhfr- ou células SP2/0 contra as células LS174T como células-alvo. Os ensaios foram incubados por 4 h em uma
30 proporção de efector para célula-alvo de 50:1 com concentrações de anticorpo de 0 a 100 ng/mL.

Figura 3: Atividade ADCC de PankoMAb quimérico isolado de NM-F9 é ~ 5 vezes maior do que o PankoMab quimérico isolado das células CHOdhfr-.

Figura 4: Ensaio de liberação de európio com Panko1 quimérico isolado das células NM-H9D8-E6, células CHOdhfr- e células NM-H9D8 contra as células ZR-75-1 como células-alvo. O ensaio foi incubado por 4 h em uma proporção de efetor para célula-alvo de 80:1 com concentrações de anticorpo de 0 a 1 µg/mL.

Figura 5: Atividade ADCC de Panko2 quimérico em um ensaio de liberação de európio contra as células ZR-75-1 depois de incubação com uma proporção de efetor para célula-alvo de 50:1 e 5000 células-alvo por cavidade. As amostras foram incubadas em triplicatas.

Figura 6: Atividade ADCC de Panko2 quimérico em um ensaio de liberação de európio contra as células ZR-75-1 depois de incubação com uma proporção de efetor para célula-alvo de 50:1 e 10000 células-alvo por cavidade. As amostras foram incubadas em triplicatas.

Figura 7: Ensaio CDC com PankoMAb quimérico contra ZR-75-1.

Figura 8: Atividade de ligação do PankoMAb quimérico isolado de NM-F9 para o peptídeo 30-mer MUC1 glicosilado sintético é cerca de 50% maior do que a atividade de ligação do PankoMab quimérico isolado das células CHOdhfr-.

Figura 9: Atividade de ligação do Panko2 quimérico isolado de GT-2x e NM-H9D8 para o peptídeo 30-mer MUC1 glicosilado sintético é cerca de 50% maior do que a atividade de ligação do Panko2 isolado das células CHOdhfr-.

Figura 10: Análise de Western blot foi efetuada para identificar a cadeia pesada diferentemente sialilada das composições da molécula de anticorpo expressa em CHOdhfr-, NM-F9 ou NM-H9D8 [DSM ACC2806]. As proteínas foram transferidas para nitrocelulose e visualizadas ou por anticorpos IgG anti-humanos secundários (figura 10A) ou SNA (figura 10B), os quais detectam a 2-6 sialilação.

Figura 11: Análise de Western blot foi efetuada para identificar a cadeia pesada diferentemente sialilada das composições da molécula de anticorpo expressas em CHOdhfr- ou NM-H9D8. As proteínas foram transferidas para nitrocelulose e visualizadas por SNA, o qual detecta a sialilação 2-

5 6.

Figura 12: Análise de ELISA foi efetuada para identificar as composições da molécula de anticorpo diferentemente sililadas expressas em CHOdhfr-, GT-2x, NM-H9D8 ou NM-H9D8-E6.

Figura 13: Análise de ELISA foi efetuada para identificar as composições da molécula de anticorpo diferentemente sililadas de Cetuximab expressas em CHOdhfr-, NM-F9 ou NM-H9D8. A sialilação foi analisada (A) por SNA, o qual detecta alfa-2-6-sialilação com ou sem-tratamento com neuraminidase e (B) por MAL I, o qual detecta sialilação alfa2-3.

Figura 14: *Dot blots* marcados por SNA dos anticorpos quiméricos Panko 1 e Panko 2 isolados das células CHOdhfr-, NM-F9, NM-H9D8, ou NM-H9D8-E6.

Figura 15: O PankoMab quimérico isolado das células NM-H9D8 é disponível por mais tempo no soro de camundongos nus do que aquele isolado de NM-F9.

Figura 16: Análise de SDS-Page de hFSH produzido em NM-H9D8 (raia 1) e GT-2x (raia 2). 5 µg de hFSH purificado foram separados por SDS-PAGE sob condições redutoras por raia e marcados por azul brilhante Coomassie. O marcador indica uma faixa de 21 a 108 KD.

Figura 17: análise de Western blot foi efetuada para identificar as composições da molécula de hFSH diferencialmente sialiladas. 1 µg da composição da molécula hFSH de CHO (raia 1), NM-H9D8 (raia 2) e GT-2x (raia 3) foi separado por SDS-Page em gel de acrilamida 10% sob condições redutoras. As proteínas foram transferidas para nitrocelulose e SNA visualizadas, o que detecta a sialilação 2-6.

Figura 18: mostra um anticorpo IgG, em que N-glicanos são covalentemente ligados a um resíduo de Asn 297 conservado no domínio C_H2 de Fc. Conforme indicado, podem haver oligossacarídeos N-ligados adicio-

nais no domínio Fab, o qual pode ainda influenciar a atividade de ligação do anticorpo. As estruturas de glicano somente na metade do anticorpo são exibidas. O carboidrato Fc é uma estrutura de cadeia ramificada a qual se baseia principalmente nos dois domínios C_H2, com um braço/antena de cada oligossacarídeo interagindo com as áreas hidrofóbicas dos domínios C_H2. A análise estrutural das IgGs de mieloma humano e policlonais demonstraram que Fc contém várias quantidades de uma estrutura central de base biante-

5 nada conforme é demonstrado na figura 18. O significado dos símbolos é demonstrado na tabela correspondente. A referida estrutura central pode não conter (G0), conter um (G1) ou dois (G2) resíduos de galactose termi-

10 nais e/ou um resíduo de GlcNAc e/ou fucose bifurcado no GlcNAc proximal. Outras moléculas de fucose também podem estar presentes nos outros resíduos de GlcNAc ou nos resíduos de galactose. A diversidade é ainda mais aumentada conforme o ácido siálico terminal pode ou não estar presente

15 dependendo das propriedades do anticorpo, uma vez que o ácido siálico foi reportado como apresentando um impacto negativo em ADCC.

Exemplo 1

Análise de expressão de fut8 em células

RNA foi extraído de NM-F9 [DSM ACC2606], NM-D4 [DSM

20 ACC2605], NM-H9, K562, NM-H9D8 [DSM ACC2806], GT-2x [DSM ACC _____] e as células HepG2 (controle) de acordo com procedimentos padrões (RNeasy-Mini-Kit, Qiagen). O RNAm foi isolado usando a tecnologia de contas magnéticas de acordo com a instrução dos fabricantes (HDynabeads® Oligo(dT)25H, Invitrogen). Para a síntese da primeira fita de DNAC^P, 50

25 µL de suspensão de contas de cada amostra e a transcriptase reversa Omniscript (Qiagen) foram usadas de acordo com as instruções do fabricante. Para a reação de ^PRT-PCR subsequente, 5 µL do produto P de DNAC^P e iniciadores fut8 específicos foram usados, resultando em um fragmento de 212 pb. Como controle, iniciadores específicos de actina foram usados, resultando em um fragmento de 240 pb. O(s) produto(s) de PCR P^P resultante(s) foi (foram) analisado(s) em um gel de 1,5%.

30

NM-F9, NM-D4, NM-H9, K562, NM-H9D8 e GT-2x expressam o

RNA_m para fut8.

Figura 1 mostra como um exemplo a expressão de RNA_m fut8 de NM-F9, NM-D4 e NM-H9D8.

Exemplo 2

5 Glicoengenharia das células K562

A glicoengenharia das células K562 e a geração das linhagens celulares NM-D4 e NM-F9 estão descritas em EP1654353.

As células NM-H9, e uma célula ou linhagem celular derivada delas com alto potencial de sialilação foram geradas como se segue. Muta-
 10 gênese aleatorizada foi efetuada pelo tratamento das células K562 com o agente alquilante metanossulfonato de etila. Por amostra, as células K562 foram lavadas em PBS e semeadas em meio de cultura de células a 10^6 células por mL suplementado com EMS (0,1 mg/mL, metanossulfonato de etila, Sigma-Aldrich) de um dia para o outro a 37°C e COB_{2B} a 5%. As célu-
 15 las foram lavadas e supridas com meio fresco. A cada segundo dia a vitalidade foi determinada por mancha com azul de trypan, e as células foram analisadas por manchamento imunocitoquímico.

Subsequentemente, as células expondo o novo fenótipo de alta expressão de TF foram selecionadas através de um anticorpo TF-específico.
 20 As células K562 foram lavadas em B-PBS (BSA 0,5% em PBS), incubadas com 50 µL de sobrenadante de culturas de hibridoma do anticorpo monoclonal A78-G/A7 ou PankoMab e 950 µL de B-PBS a 4°C por 30 min. Depois da lavagem, o procedimento foi repetido com 50 µL de anticorpo IgM anticamundongo de rato ou anticorpo IgG anticamundongo de rato conjugado com
 25 MicroBEads (Miltenyi Biotec, Köln, Alemanha). Depois da lavagem, as células K562 TF-positivas magneticamente marcadas foram separadas por duas colunas sucessivas fornecidas por Miltenyi Biotec (Köln, Alemanha) conforme descrito no manual do fabricante. Após nove dias de cultivo, o procedimento de isolamento foi repetido em um total de três vezes. A análise FACS
 30 (citometria de fluxo) iniciou-se com a mancha do anticorpo: cerca de 3×10^5 células foram incubadas a 4°C por 1,5 h com anticorpo monoclonal primário (sobrenadantes da cultura do hibridoma de A78-G/A7 (IgM), PankoMab

(IgG1), todos diluídos 1:2 em meio de cultura de células) seguido pelo anticorpo IgM ou IgG anticamundongo de cabra conjugado com Cy3 secundário 1:200 diluído em PBS, a 4°C por 30 min e foram novamente lavadas. As células ressuspensas (200 µL de PBS) foram investigadas por citometria de fluxo (citometria de fluxo: Coulter Epics, Beckman Coulter, Krefeld, Ger). As análises quantitativas foram efetuadas usando o software Expo32 (Becton Coulter) com os seguintes parâmetros para as células marcadas com anticorpo: espalhamento dianteiro (FS): 26 V, ganho de 1, espalhamento para os lados (SS): 807 V, ganho de 5, FL2: 740 V, ganho de 1, e os seguintes parâmetros para as células marcadas com lectina: FS: 26 V, ganho de 1, SS: 807 V, ganho de 5, FL1: 740 V, ganho de 1).

Depois de três ciclos de isolamento, uma população de células K562 de 93% de células TF-positivas foi recebida. Entretanto, a porcentagem de células K562 TF-positivas foi reduzida no decorrer do tempo, alcançando um nível basal de cerca de 20% de células TF-positivas durante um período de 14 dias após o procedimento de isolamento. Para a estável expressão do fenótipo TF-positivo, as células K562 foram isoladas por uma quarta vez e, finalmente, as células K562 TF positivas foram clonadas depois disso por diluição limitada em placas de 96 cavidades (1 célula/100 µL). Dentre os trinta clones de células K562 que foram obtidos, dezessete clones celulares expressaram baixas quantidades do antígeno TF ou não tinham antígeno TF. Esses clones celulares foram analisados por ligação de SNA em citometria de fluxo e para as taxas de proliferação (análise de tempo de duplicação, ver abaixo). Os clones celulares apresentando alta ligação de SNA e uma alta taxa de proliferação foram selecionados. O clone NM-H9 estável foi selecionado para o desenvolvimento clonal adicional por clonagem de célula individual e para otimizar o crescimento sob condições sem-soro. Como o clone celular mais preferido, NM-H9D8 [DSM ACC2806] foi selecionado e depositado em DSM ACC2806 em "DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH" em Braunschweig (Alemanha), por Glycotope GmbH, Robert-Rössle-Str. 10, 13125 Berlim (Alemanha) em 15 de setembro de 2006.

Exemplo 3

Cultivo das linhagens celulares K562, NM-F9, NM-D4, NM-H9, NM-E-2F9, NM-C-2F5, NM-H9D8, NM-H9D8-E6, NM-H9D8-E6Q12, e GT-2x e células CHOdhfr- e geração de linhagens de células sem-soro

5 K562, NM-F9, NM-D4, NM-H9, NM-E-2F9, NM-C-2F5, NM-H9D8 [DSM ACC2806], NM-H9D8-E6 [DSM ACC2807], NM-H9D8-E6Q12 [DSM ACC2856 em "DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH" em Braunschweig (Alemanha), por Glycotope GmbH, Robert-Rössle-Str. 10, 13125 Berlim (Alemanha) em 8 de agosto de 2007, ou
10 GT-2x [DSM ACC ____] foram cultivados em RPMI suplementado com FCS 10% e glutamina 2 mM ou sem-soro em meio X-Vivo 20 e crescidas a 37°C em uma atmosfera umidificada de 8%.

As células CHOdhfr- (ATCC No. CRL-9096) foram cultivadas em DMEM suplementado com FCS 10%, glutamina 2 mM e HT 2% suplementado ou sem-soro em meio CHO-S-SFM II e crescidas a 37°C em uma atmosfera umidificada de 8%.

K562, NM-F9, NM-D4, NM-H9, NM-E-2F9, NM-C-2F5, NM-H9D8 [DSM ACC2806], NM-H9D8-E6 [DSM ACC2807], NM-H9D8-E6Q12 [DSM ACC2856] ou GT-2x [DSM ACC ____] e a célula ou linhagem celular derivada das respectivas células hospedeiras são facilmente adaptadas às condições sem-soro através de uma alteração completa do meio de cultura celular. As células e linhagens celulares de acordo com a presente invenção são inoculadas em um meio sem-soro como X-Vivo 20 em uma densidade de 1×10^5 até 5×10^5 células/mL, preferivelmente de 2×10^5 células/mL, e
20 cultivadas por um método de cultivo comum para células animais. Depois de 4 a 7 dias de cultivo, as células cuja densidade alcançou 5×10^5 a 10×10^5 células/mL são selecionadas como as células adaptadas em um meio sem-soro. A adaptação ao meio sem-soro também pode ser efetuada pela diluição sucessiva do meio suplementado com FCS por uma composição de
25 meio sem-soro (adaptação contínua). A produtividade dos clones de produção FCS convertidos da composição de anticorpo produzindo as células hospedeiras da presente invenção para as condições sem-soro é na sua

maior parte conservada.

A adaptação de CHOdhfr- (ATCC No. CRL-9096) às condições sem-soro tem que ser efetuada passo a passo e leva várias semanas, por meio da qual uma perda de produtividade de pelo menos a metade é comum.

Exemplo 4

Clonagem de vetores para expressar os anticorpos quiméricos PankoMab, Panko1, Panko2 ou Cetuximab em células eucarióticas

Sequências variáveis de PankoMab foram amplificadas por PCR com iniciadores específicos a partir das células do hibridoma de murino produzindo PankoMab [HCancer Immunol Immunother. H Novembro de 2006; 55 (11): 1337-47. Epub Fevereiro de 2006. PankoMab: a potent new generation anti-tumour MUC1 antibody. Danielczyk et al].

Sequências variáveis VH e VL de Panko1 e Panko2 estão descritas em WO2004/065423, aqui incorporadas por referência.

Cadeia pesada variável de Panko1:

EVKLVESGGGLVQPGGSMKLSCAASGFTFSDAWMDWVRQSPEKGLEWVAEIRSKANNHA
TYAESVKGRFTISRVDKSSVYLQMNRLAEDTGIYYCTRGGYGFDYWGQGTTLTVS

Cadeia leve variável de Panko1:

DIVLTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSIVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFG
VPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGSHVPLTFGDGTKLELKR

Cadeia pesada variável de Panko2:

EVKLVESGGGLVQPGGSMKLSVASGFTFSNYWMNWVRQSPEKGLEWVAEIRLKSNNYT
THYAESVKGRFTISRDDSKSSVSLQMNRLRVEDTGIYYCTRHYYFDYWGQGTTLTVS

Cadeia leve variável de Panko2:

DIVMTQAAFSNPVTLGTSAISCRSSKSLHSNGITYFFWYLQKPLSPQLLIYQMSNLASG
VPDRFSSSGSGTDFTLRISRVEAEDVGVYYCAQNLELPPTFGGGTKLEIKR

As sequências de aminoácidos variáveis de VH e VL de Cetuximab foram obtidas a partir de <http://redpoll.pharmacv.ualberta.ca/drugbank/cgi-bin/getCard.cgi?CARD=BTD00071.txt> e traduzidas em modo reverso nas sequências codificadoras de DNAc usando VectorNTI.

Cadeia pesada variável de Cetuximab:

QVQLKQSGPGLVQPSSQLSITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLEWLGVIWSSGGNTDY
N
TPFTSRLSINKDNSKSQVFFKMNSLQSNDAIYYCARALTYDYEFAYWGQGTTLTVS

Cadeia leve variável de Cetuximab:

DILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQRTNGSPRLLIKYASESISGIPS
RFSGSGSGTDFTLSINSVESEDIADYYCQQNNNWPTTFGAGTKLELKR

A sequência de DNA foi prolongada por NcoI/NheI no caso para LV e NcoI/SaII no caso de VH e o DNAc foi gerado. Os fragmentos da cadeia pesada variável do corte NcoI/XhoI VH foram clonados no vetor-líder BS do corte NcoI/SaII conforme descrito em WO2004/065423. O vetor BS-líder inclui um cassete de clonagem para introduzir a sequência de peptídeo de sinal receptor de célula T na extremidade 5' e uma sequência doadora de união na extremidade 3' dos domínios variáveis. A cadeia leve variável VL do anticorpo correspondente foi amplificada com um iniciador específico na extremidade 3' codificando adicionalmente o sítio doador de união e foi clonada através de NcoI/NheI no vetor-líder BS digerido da mesma forma. Depois disso, cada fragmento HindIII/BamHI do vetor-líder BS foi clonado no vetor de expressão eucariótico correspondente. Esses vetores (pEFpuroC-gama1VB_{HB}, pEFdhfrCkappaVB_{LB}, pEFdhfrB_{mutB}CkappaVB_{LB}) compreendem o promotor EF-1-alfa e o intensificador HCMV, a origem SV40, o sinal de poliadenilação, o gene de resistência à puromicina no vetor para a cadeia pesada e o gene de di-hidrofolase de murino (dhfr) para a expressão da célula CHO ou da SEQ ID 1 (Sequência 1Nº) para K562, NM-F9 [DSM ACC2606], NM-D4 [DSM ACC2605], NM-H9, NM-E-2F9, NM-C-2F5, NM-H9D8 [DSM ACC2806], NM-H9D8-E6 [DSM ACC2807], NM-H9D8-E6Q12 [DSM ACC2856], ou a expressão de GT-2x [DSM ACC _____] para a seleção e amplificação de gene no vetor para a cadeia leve, assim como as sequências genômicas da região gama1 constante humana para a cadeia pesada ou a região kappa constante humana para a cadeia leve (iniciadores para a amplificação do DNA humano genômico e mapa de vetores ver WO2004/065423).

Exemplo 5

Transfecção de células eucarióticas para expressar os anticorpos quiméricos PankoMab, Panko1, Panko2 ou Cetuximab e o procedimento de amplificação de gene para gerar clones celulares de alta produtividade na presença de soro

Para expressar os anticorpos quiméricos em NM-F9 [DSM ACC2606] ou CHOdhfr- [ATCC No. CRL- 9096], as células foram cotransfectadas com uma mistura dos vetores descritos acima para as cadeias pesada e leve (1:1 até 1:3) por lipofecção usando DMRIE-C ou eletroporação para as células em suspensão como NM-F9 e lipofectamina ou eletroporação para a linhagem celular aderente CHOdhfr-. Dois dias após a transfecção, o meio de crescimento foi alterado para o meio de seleção (NM-F9 em RPMI 1640 + FCS a 10% + 2 mM de L-glutamina + 0,75 µg/mL de puromicina + 50 nM de metotrexato; CHOdhfr- em DMEM + FCS a 10% dialisado + L-glutamina 2 mM + 5 µg/mL de puromicina + 50 mM de metotrexato) por 1 semana. A primeira amplificação foi efetuada aumentando a concentração de metotrexato até 100 nM por mais 2 semanas. Parte da população de células amplificadas foi clonada de uma única célula sem a adição de puromicina e metotrexato, o resto das células foi submetido a um novo ciclo de amplificação de gene pelo aumento da concentração de metotrexato. Dessa forma, de quatro a seis ciclos de amplificação de genes (100, 200, 500, 1000, 2000, 3000 nM de metotrexato) foram efetuados. Adicionalmente, os melhores clones produtores identificados por varredura e análise de clones foram adicionalmente amplificados semelhantemente.

Após a clonagem de uma única célula em placas de 96 cavidades usando diluição limitada (0,5 célula por cavidade), as placas foram cultivadas por 2 a 3 semanas, microscopicamente analisadas para os clones de células em crescimento e eficiência de clonagem em % (quantidade de cavidades com clones de células em crescimento x 100/quantidade teórica de células semeadas) foi determinada. Os clones em crescimento foram varridos quanto à produtividade usando diferentes procedimentos para células CHOdhfr- aderentes ou para células em suspensão NM-F9.

CHOdhfr-: as células dos clones em crescimento foram lavadas com PBS e colhidas por tratamento com Accutase. A metade das células ressuspensas foi semeada em uma placa de teste de 96 cavidades, a outra metade foi semeada em uma placa de 24 cavidades para o cultivo adicional. A placa de teste foi cultivada por 20 a 24 h. O sobrenadante de cada cavi-

de foi analisado quanto ao título de anticorpos, conforme descrito em Determinação da taxa de produtividade específica (SPR) e tempo de duplicação (g) (ver abaixo). A densidade de células relativa foi medida usando o ensaio MTT. Em detalhes, as células foram incubadas com solução MTT por 2 h, a
5 solução foi descartada e as células lisadas por uma solução de HCl a 0,04 M em 2-propanol. Depois de 2 horas, a placa foi moderadamente misturada e medida usando um fotômetro de placa de microtitulação com um filtro de 570 nm em modo dual contra um filtro de referência de 630 nm.

NM-F9: As placas de 96 cavidades foram centrifugadas e o sobrenadante foi descartado. As células foram ressuspensas em 200 μ L de
10 meio fresco. A metade das células ressuspensas foi semeada em uma placa de teste de 96 cavidades e diluída com 100 μ L de meio, a outra metade permaneceu nas placas de clonagem para cultivo adicional. Depois de 2 dias de cultivo, a placa de teste foi centrifugada e 20 μ L do sobrenadante foram
15 analisados para o título de anticorpo, conforme descrito em Determinação da taxa de produtividade específica (SPR) e tempo de duplicação (g) (ver abaixo). A densidade de células relativa foi medida usando o ensaio WST-1 pela adição de 10 μ L de solução WST-1 (Roche) em cada cavidade. Depois de 1 a 3 horas de incubação, as medições foram efetuadas usando um fotômetro
20 de placa de microtitulação com um filtro de 450 nm em modo dual contra um filtro de referência de 630 nm.

Os clones celulares com uma alta proporção de título e anticorpo em relação à densidade celular foram selecionados e cultivados e posteriormente analisados.

25 As condições para K562, NM-D4 e NM-H9 foram as mesmas.

Determinação da taxa de produtividade específica (SPR) e tempo de duplicação (g)

Para cada clone, 2×10^4 células foram semeadas por cavidade de uma placa de cultivo tecidual de 24 cavidades em 500 μ L de meio de
30 crescimento. As células foram deixadas crescer por 3 dias, o meio condicionado foi coletado para análise, e as células foram removidas, caso necessário, por Accutase e contadas. Os títulos de anticorpo específicos foram quan-

- titativamente determinados a partir das amostras de meio por ELISA. As placas de ensaio foram revestidas com um anticorpo específico da cadeia kappa humana (BD). O anticorpo recombinante ligado foi detectado com o conjugado da peroxidase de rábano silvestre (HRP) IgG anti-humana (H+L) (Jackson ImmunoResearch Laboratories). Para a quantificação, o anticorpo quimérico recombinante purificado foi usado como padrão.

A SPR foi medida em picogramas de proteína específica por célula por dia (pcd) é uma função tanto da taxa de crescimento quanto da produtividade, e foi calculada pelas seguintes equações:

$$SPR = \frac{\text{Massa de proteína total}}{\text{Área celular integral (ICA)}}$$

$$ICA = \frac{(\text{quantidade de células final} - \text{número de células inicial} \times \text{dias de cultivo})}{\text{Log } B_{eB} (\text{número de células final/quantidade de células inicial})}$$

- O tempo de duplicação foi calculado pela seguinte equação:
- $$G = \log 2 \times (\text{horas em cultura}) / \log (\text{quantidade de células final} / \text{quantidade de células inicial})$$

Determinação do rendimento médio e do rendimento máximo das linhagens celulares

- Após a clonagem de célula única em placas de 96 cavidades usando diluição limitada (0,5 célula por cavidade) conforme descrito acima, a partir de 200 clones únicos teoricamente plaqueados, a SPR é determinada para os clones celulares em crescimento e a média e o desvio são determinados, assim como o rendimento máximo para as diferentes linhagens celulares e diferentes condições. Tabela 1 compara os dados dos clones celulares produtores de PankoMab quimérico de CHOdhfr- e NM-F9 desenvolvidos sob condições contendo soro.

Exemplo 6

- Geração de clones celulares com rendimento elevado livre de soro produzindo uma composição de moléculas de anticorpo**

A transfecção de NM-H9D8, NM-H9D8-E6, NM-H9D8-E6Q12 ou GT-2x adaptadas ao meio sem-soro X-Vivo 20 foi efetuada sob condições

sem-soro usando DMEM-c ou eletroporação (Nucleofector, Amaxa). Dois dias após a transfecção, o meio de crescimento foi alterado para o meio de seleção (X-Vivo 20 + 0,75 µg/mL de puromicina + 50 nM de metotrexato) por 1 semana. A primeira amplificação foi efetuada aumentando-se a concentração de metotrexato até 100 nM por mais duas semanas. Parte da população celular amplificada foi ~~clonada~~ de célula única em X-Vivo sem a adição de puromicina e metotrexato, o resto das células foi submetido a um novo ciclo de amplificação de genes através do aumento da concentração de metotrexato. Deste modo, de quatro a seis ciclos de amplificação de gene (100, 200, 500, 1000, 2000, 3000 nM de metotrexato) foram efetuados. Adicionalmente, os melhores clones produtores identificados por varredura e análise de clones foram adicionalmente amplificados semelhantemente. Após a clonagem de uma única célula em placas de 96 cavidades usando diluição limitada (0,5 célula por cavidade), as placas foram cultivadas por 2 a 3 semanas, microscopicamente analisadas para os clones de células em crescimento e eficiência de clonagem em % (quantidade de cavidades com clones de células em crescimento x 100/quantidade teórica de células semeadas) foi determinada. Os clones em crescimento foram varridos quanto à produtividade usando o mesmo procedimento para as células em suspensão NM-F9 na presença de soro (ver acima).

Determinação do rendimento médio e do rendimento máximo para os clones celulares

Após a clonagem de célula única em placas de 96 cavidades usando diluição limitada (0,5 célula por cavidade) conforme descrito acima, a partir de 200 clones únicos teoricamente plaqueados, a SPR é determinada para os clones celulares em crescimento e a média e desvio são determinados, assim como o rendimento máximo para as diferentes condições. Tabela 2 mostra os dados dos clones celulares produtores de PankoMab quimérico de NM-H9D8 [DSM ACC2806] desenvolvidos sob completamente sob condições sem-soro.

As taxas de produção específicas (SPR) após a amplificação em linhagens celulares de acordo com a invenção são maiores do que em

CHOdhr-, e maiores em células NM-H9D8 [DSM ACC2806] produtoras de PankoMab quiméricas desenvolvidas sob condições sem-soro.

5 A taxa de produção da maioria dos clones é altamente estável durante pelo menos 6 semanas sem pressão de seleção. O melhor clone foi estável com uma SPR de 30 pcd em 6 semanas com uma taxa de duplicação de 24 h.

A data reflete a produtividade dos clones em escala pequena laboratorial com potencial adicional no aumento de produtividade por desenvolvimento de processo, otimização de meio e fermentação.

10 Uma produtividade mais alta e o rendimento dos clones de produção desenvolvidos sob condições sem-soro são vantajosos e as condições são as mesmas para todos os outros anticorpos e para todas as linhagens celulares, como K562, NM-F9, NM-D4, NM-H9, NM-E-2F9, NM-C-2F5, NM-H9D8-E6 [DSM ACC2807], NM-H9D8-E6Q12 [DSM ACC2856], ou GT-2x [DSM ACC _____] adaptado para as condições sem-soro.

Exemplo 7

Isolamento de uma composição de molécula de anticorpo

Para a produção e isolamento de uma composição de molécula de anticorpo de acordo com a invenção, as células estavelmente transfectadas secretando os anticorpos quiméricos PankoMab, Panko1, Panko2 ou Cetuximab foram cultivadas em meio sem-soro até uma densidade celular de cerca de 1 a 2 x 10⁶ células/mL ser alcançada. Após a remoção das células do sobrenadante de cultura celular por centrifugação (400 x g, 15 min), o anticorpo quimérico foi purificado usando uma coluna de proteína A (HiTrap r-protein A FF, Amersham Pharmacia Biotech). A fração de anticorpo purificado que eluiu por alteração de pH repentina foi retamponada em PBS e concentrada usando tubos de centrífuga Centriprep (corte de 50 KDa, Millipore).

Exemplo 8

30 **Determinação da citotoxicidade celular mediada por Fc das composições da molécula de anticorpo de acordo com a invenção**

Isolamento de PBMC dos doadores sanguíneos como célu-

las efetoras

PBMC foi isolada a partir do sangue de doadores saudáveis por centrifugação por densidade com Ficoll-Hypaque (Biochrom). As células foram lavadas 3 vezes com RPMI 1640 suplementado com 5% de FCS e crioconservadas em bateladas separadas de 5×10^7 células. PBMC foram descongelados e usados diretamente ou mantidos de um dia para o outro em RPMI 1640 suplementado com FCS 10% (RPMI/FCS) antes do uso em citometria de fluxo ou como células efetoras nos ensaios citotóxicos.

Detecção da citotoxicidade celular dependente de anticorpo em um modelo *in vitro*

A citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC) dos anticorpos recombinantes de acordo com a invenção foi investigada em um ensaio de liberação de európio. As células-alvo (ZR-75-1, 5×10^6) foram incubadas por 6 minutos em gelo em 800 μ L de tampão európio (HEPES 50 mM, pH 7,4, NaCl a 93 mM, KCl a 5 mM, $MgCl_2$ a 2 mM, ácido dietilenotriaminopentacético 10 mM, acetato de európio (III) 2 mM, eletroporadas (710 V, 1 pulso, 30 μ s) em um Multiporador (eppendorf) e subsequentemente incubadas em gelo por mais 6 min. A seguir, as células foram lavadas 5 vezes em RPMI 1640/FCS 5% e semeadas em uma placa de fundo redondo de 96 cavidades (Nunc; 1×10^4 células em 100 μ L por cavidade). Após a adição de 20 μ L dos anticorpos recombinantes em concentrações variadas (0,5 a 25 μ g/mL de concentração final em um volume de incubação de 200 μ L) ou os controles correspondentes (meio, IgG humana de controle de isotipo), células sanguíneas periféricas humanas (80 μ L por cavidade) foram adicionadas como células efetoras, usando uma proporção de efetor/célula-alvo de 50:1. 80 μ L de RPMI/FCS sem células efetoras foram adicionados para determinar a liberação espontânea. A liberação máxima foi determinada após a completa lise das células-alvo com etanol. Após incubação em um incubador a 37°C por 4 horas, a placa foi centrifugada a 500 x g por 5 minutos, e 25 μ L de cada amostra foram pipetados em 200 μ L por cavidade de solução de intensificação (Perkin-Elmer Wallac). Após a incubação por 15 min em temperatura ambiente, a fluorescência foi determinada (fluorímetro VictorP^{2P}, Perkin-

Elmer Wallac). A citotoxicidade específica é obtida a partir da equação (lise experimental – lise espontânea)/(lise máxima – lise espontânea)*100.

Alternativamente, as células-alvo (LS174T ou ZR-75-1, 3×10^6 células) foram incubadas por 6 minutos em gelo em 100 μ L de tampão európio (HEPES 50 mM, pH 7,4, NaCl 93 mM, KCl 5 mM, $MgCl_2$ 2 mM, ácido dietilenotriaminopentacético 10 mM, acetato de európio (III) 2 mM, eletroporadas em um Nucleofector II (Amaxa) com programa A-011 e subsequentemente incubadas em gelo por mais 6 min. A seguir, as células foram lavadas 4 vezes em RPMI 1640/FCS 5% e semeadas em uma placa de fundo redondo de 96 cavidades (Nunc; 5 a 10×10^3 células em 100 μ L por cavidade). Após a adição de 20 μ L dos anticorpos recombinantes em concentrações variadas (0,001 a 100 ng/mL de concentração final em um volume de incubação de 200 μ L para Cetuximab; 0,16 - 5 μ g/mL para PankoMab quimérico, Panko1 ou Panko2) ou os controles correspondentes (meio, IgG humana de controle de isotipo), células sanguíneas periféricas humanas (80 μ L por cavidade) foram adicionadas como células efetoras, usando uma proporção de efetor/célula-alvo de 100:1 até 50:1. 80 μ L de RPMI/FCS sem células efetoras foram adicionados para determinar a liberação espontânea. A liberação máxima foi determinada após a completa lise das células-alvo com Triton X-100. Após incubação em um incubador a 37°C por 4 horas de um dia para o outro, a placa foi centrifugada a 500 x g por 5 minutos, e 25 μ L de cada amostra foram pipetados em 200 μ L por cavidade de solução de intensificação (Perkin-Elmer Wallac). Após a incubação por 10 min em temperatura ambiente, a fluorescência foi determinada (fluorímetro Victor², Perkin-Elmer Wallac). A citotoxicidade específica é obtida a partir da equação (lise experimental – lise espontânea)/(lise máxima – lise espontânea)*100.

A atividade ADCC do Cetuximab isolado da linhagem celular NM-H9D8-E6 FUT8⁻ é significativamente maior do que a atividade ADCC do Cetuximab isolado a partir das células CHOdhfr⁻ ou das células SP2/0. Conforme mostrado na figura 2, o Cetuximab isolado de NM-H9D8-E6 induz a mesma lise específica das células LS174T em cerca de concentrações de anticorpo 30 vezes menores como Cetuximab isolado de CHOdhfr⁻ ou de

células SP2/0 (Erbix, obtido da Merck). Isso indica uma atividade ADCC 30 vezes maior em comparação com o produto comercialmente disponível. Esse resultado é obtido usando o método de produção da presente invenção, resultando em um padrão de glicosilação otimizado.

5 Também a atividade do PankoMab quimérico isolado de NM-F9 [DSM ACC2606], K562, NM-H9, NM-D4 [DSM ACC2605], NM-H9D8-E6 [DSM ACC2807], NM-H9D8-E6Q12 [DSM ACC2856], GT-X2 [DSM ACC _____], ou NM-H9D8 [DSM ACC2806] é cerca de 5 vezes maior do que a atividade ADCC do PankoMab quimérico isolado das células CHOdhfr-. Cerca de um quinto da concentração de PankoMab quimérico leva à mesma atividade ADCC que o PankoMab quimérico expresso nas células CHOdhfr-. Figura 3 mostra os respectivos resultados na linhagem celular NM-F9 para propósitos de comparação.

15 A atividade ADCC do Panko 1 quimérico isolado de NM-H9D8-E6 ou NM-H9D8-E6Q12 é cerca de 8 vezes maior do que a atividade ADCC do Panko1 quimérico isolado das células CHOdhfr-. Cerca de um oitavo da concentração de Panko 1 quimérico leva à mesma atividade ADCC que o Panko 1 quimérico expresso nas células CHOdhfr-. Os respectivos resultados estão mostrados na figura 4.

20 A atividade ADCC do Panko 2 quimérico isolado de NM-H9D8 ou GT-2x é cerca de 6 vezes maior do que a atividade ADCC do Panko2 quimérico isolado das células CHOdhfr-. Cerca de um sexto da concentração de Panko 2 quimérico leva à mesma atividade ADCC que o Panko2 quimérico expresso nas células CHOdhfr-. Os respectivos resultados estão mostrados na figura 5.

A atividade ADCC do Panko 2 quimérico isolado de NM-H9D8-E6 é menor do que a atividade ADCC do Panko2 quimérico isolado das células NM-H9D8. Os respectivos resultados estão mostrados na Figura 6.

Detecção da citotoxicidade celular dependente de complemento em um modelo *in vitro*.

A citotoxicidade celular dependente de complemento (CDC) dos anticorpos foi investigada em um ensaio de liberação de európio. Células-

alvo carregadas com Eu^{3+} (ZR-75-1, 3×10^6) foram preparadas conforme descrito acima.

Depois disso, as células foram semeadas em uma placa de fundo redondo de 96 cavidades (Nunc; 5×10^3 células em 100 μL por cavidade).
 5 Após a adição de 20 μL dos anticorpos em concentrações variadas (0,5 a 50 $\mu\text{g/mL}$ de concentração final em um volume de incubação de 200 μL) as células foram incubadas em meia hora em temperatura ambiente. Após isso, 10 μL por cavidade de complemento de filhote de coelho (Cedarline, diluído de 1:5 a 1:10) foram adicionados. 10 μL de RPMI/FCS sem complemento
 10 foram adicionados para determinar a liberação espontânea. A liberação máxima foi determinada após a completa lise das células-alvo com etanol ou TritonX-100 1%. Após incubação em um incubador a 37°C por 3 a 3,5 horas, a placa foi centrifugada a $500 \times g$ por 5 minutos, e 25 μL de cada amostra foram pipetados em 200 μL por cavidade de solução de intensificação (Perkin-Elmer Wallac).
 15 Após a incubação por 10 min em temperatura ambiente, a fluorescência foi determinada (fluorímetro VictorP^{2P}, Perkin-Elmer Wallac). A citotoxicidade específica é obtida a partir da equação (lise experimental – lise espontânea)/(lise máxima – lise espontânea)*100.

A atividade CDC do PankoMab quimérico isolado das células
 20 NM-F9 é 8 vezes maior do que a atividade CDC do PankoMab quimérico isolado das células CHOdhfr-. A mesma lise específica é induzida em uma concentração 8 vezes mais baixa de PankoMab quimérico isolado de NM-F9 em comparação com o PankoMab quimérico isolado das células CHOdhfr-. Os respectivos resultados estão mostrados na figura 7.

25 **Ensaio de formação de conjugado (CFA) para analisar a atividade de fagocitose das composições da molécula de anticorpo**

Mancha de células tumorais com PKH26:

De 1×10^7 a 2×10^7 células tumorais foram lavadas duas vezes em PBS, ressuspensas em 1 mL de diluente C, 1 mL de PKH26 foi
 30 adicionado na concentração de 12×10^{-6} M para ZR-74-1, ZR-74-1TF, MCF-7 e MT-3.

Depois de 3 min de incubação em temperatura ambiente, a

mancha foi interrompida pela adição de 2 mL de FCS por 1 min em temperatura ambiente. Meio (4 mL, RPMI suplementado com L-glutamina 1%, FCS 10%) foi adicionado, as células foram decantadas por rotação e lavadas 4 vezes com meio. As células tumorais foram inoculadas a 37°C, COB_{2B} 5% para permitir a liberação do excesso de PKH-26.

A otimização do manchamento com PKH-26 foi efetuada com metade da quantidade e volumes de células.

CFA:

Células tumorais marcadas com PKH-26 foram coletadas com tripsina/EDTA, lavadas uma vez com PBS e ressuspensas em $0,8 \times 10^6$ células/mL em meio de células MAK (Invitrogen) na presença ou ausência das composições das moléculas de anticorpo recombinantes. As células tumorais (250 μ L, $0,2 \times 10^6$ células) foram semeadas em tubos de polipropileno não-aderentes.

As células MAK foram preparadas de acordo com Boyer et al., Exp. Hematol. 27, 751-761 (1999), lavadas e ressuspensas a $1,6 \times 10^6$ células/mL. 250 μ L de células MAK ($0,2 \times 10^6$ células) foram adicionadas às células tumorais marcadas com PKH-26 (proporção E:T de 2:1). As amostras individuais foram incubadas em duplicatas a 4°C e 37°C/5% de COB_{2B} por 3 h ou o. n. (18 – 20 h).

Depois da incubação a 3 h ou o. n. as células foram lavadas com PBS e marcadas com CD11c-FITC (1:18,5) + 7-AAD (1:500) em PBS/FCS 10%. As células foram coletadas com PBS, ressuspensas em 400 μ L de PBS. A aquisição foi feita em 10.000 células em Epics XL (Beckman Coulter). A porcentagem de células MAK colocalizadas foi determinada como a porcentagem de células PKH-26 positivas na população celular total para todas as células CD11c-FITC positivas viáveis.

Exemplo 9

Análise da atividade de ligação da composição da molécula de anticorpo em ELISA

Para analisar a ligação de antígeno das composições da molécula de anticorpo expressas em diferentes linhagens celulares, as composi-

ções das moléculas de anticorpo purificadas de PankoMab2 quimérico e Panko 2 foram medidas em um ELISA em peptídeo 30 mer MUC1 glicosilado sintético com a sequência APPAHGVTSAPDT [GalNAcalfa] RPAPGS-TAPPAHGVTSa. O peptídeo MUC1 não-glicosilado serviu como controle.

5 Usando soluções estoque (1 mg em 1 mL de HB_{2B}O bidestilada) armazenadas em porções a -20°C, uma diluição de 1 µg/mL em PBS foi produzida. 50 µL/cavidade foram pipetados em uma imunoplaça NUNC F96 MaxiSorp, e a placa de teste foi incubada a 4°C de um dia para o outro. No dia seguinte, a placa de teste foi lavada 3 vezes com PBS/Tween-20 0,2%.
 10 Subsequentemente, sítios de ligação não-específicos foram bloqueados com BSA 2% em PBS, incubados por pelo menos 1 h em temperatura ambiente, e 50 µL do PankoMab recombinante foram aplicados (1 – 400 ng/mL de PBS/BSA 1%). Depois de três passos de lavagem com PBS/Tween-20 0,2%, o anticorpo Fcγ1 anti-humano secundário acoplado à peroxidase foi empregado para detectar o anticorpo especificamente ligado. Para detectar o anti-
 15 corpo secundário ligado, uma reação colorida com TMB (3,3',5,5'-tetrametilbenzidina) foi efetuada. Depois de 15 min, a reação foi interrompida pela adição de NB_{2B}SOB_{4B} 2,5 N. A medição foi efetuada usando um fotômetro de placa de microtitulação com filtro de 450 nm em modo dual contra um filtro de referência de 630 nm.
 20

A atividade de ligação do PankoMab quimérico isolado de NM-F9 é cerca de 50% maior do que a atividade de ligação do PankoMab quimérico isolado das células CHOdhfr (figura 8).

A atividade de ligação do Panko2 quimérico e isolado do clone de elevada sialilação NM-H9D8 em ELISA é comparável àquela de GT-2x e maior ainda em comparação com aquele das células CHOdhfr (figura 9).
 25

Exemplo 10

Análise de glicana das composições da molécula de anticorpo expressas em células NM-F9, NM e CHOdhfr

30 Glicanos de pelo menos 100 µg de anticorpo purificado foram clivados por hidrólise ácida. Ácidos siálicos foram marcados especificamente por conjugação com o corante de fluorescência DMB. A análise foi efetuada

por HPLC, por exemplo, em uma coluna Asahipak-NH2 para separar os sacarídeos. A identificação e o cálculo dos ácidos siálicos foi efetuado por substâncias padrões dos ácidos siálicos apropriados.

5 A análise da composição da molécula de anticorpo PankoMab quimérica expressa em células CHOdhfr ou NM-F9 revelou em < de 10% de monossialilação do produto CHOdhfr e quase nenhuma sialilação do produto NM-F9 ou GT-2x. O último continha somente glicanos não-carregados.

10 Em maiores detalhes, glicanos de pelo menos 100 µg de anticorpo purificado foram clivados por hidrólise ácida. Os ácidos siálicos foram marcados especificamente por conjugação com os corantes fluorescentes, tipo DMB. A análise foi efetuada por HPLC, por exemplo, por cromatografia em fase reversa em uma coluna RP-18. A identificação e o cálculo dos ácidos siálicos foram efetuados por substâncias padrões dos ácidos siálicos apropriados.

15 Para a determinação das estruturas de glicanos carregadas e o estado de galactosilação, 100 µg de anticorpos foram digeridos por tripsina e os N-glicanos foram obtidos por tratamento com PNGaseF. Os glicanos purificados foram marcados com 2-aminobenzamida (2-AB) e submetidos à HPLC de cromatografia de troca aniônica (coluna Asahi-PAK) para a determinação de estruturas de Nglicano carregadas. Para a determinação do estado de galactosilação, os N-glicanos foram tratados por neuraminidase para o esgotamento do teor de ácido siálico e separados por HPLC Aminophase (coluna Lna-NH2) e os picos foram analisados por espectrometria de massa.

20 Os GlcNAc potencialmente bifurcados carregando glicano contendo picos foram separados em um segundo passo por cromatografia em fase reversa (coluna RP18). Através disso, estruturas triantenadas e biantenadas+ bifurcadas podem ser distintas. O grau de fucosilação dos anticorpos foi determinado por HPLC em amino fase (coluna Luna-NH2) dos glicanos 2-AB marcados. Os picos foram quantificados por integração e a estrutura glicano subjacente foi analisada por espectrometria de massa. As estruturas fucosiladas e não-fucosiladas foram determinadas e as áreas dos picos integrados foram quantificadas.

Diferentes composições da molécula de anticorpo de Cetuximab, PankoMab e Panko1 expressas em células NM-F9, GT-2x, NM-H9D8, NM-H9D8-E6, ou CHOdhfr foram analisadas e os resultados estão resumidos nas tabelas 3 a 4.

5 Lecitinas as quais se ligam preferivelmente aos ácidos siálicos alfa 2-6 (SNA) ou alfa 2-3 (MAL-1) ligados foram usados para caracterizar a sialilação do anticorpo por ELISA ou análise de Western blot.

A análise de Western blot foi efetuada para identificar as cadeias pesadas diferentemente sialiladas das composições da molécula de anticorpo expressas em CHOdhfr, NM-F9, ou NM-H9D8 [DSM ACC2806]. 5 µg de cada composição da molécula de anticorpo foram separados por SDS-Page em um gel de acrilamida 10% sob condições redutoras. As proteínas foram transferidas para nitrocelulose e visualizadas por lecitinas e/ou por anticorpos IgG anti-humanos secundários. A figura 10 mostra as cadeias pesadas diferentemente sialiladas das composições da molécula de anticorpo de PankoMab quimérico expressas em CHOdhfr, NM-F9, ou NM-H9D8 [DSM ACC2806] ou por anticorpos IgG anti-humanos secundários (figura 10A) ou SNA (figura 10B) os quais detectam a sialilação 2-6. A figura 11 mostra as cadeias pesadas diferentemente sialiladas das composições da molécula de anticorpo de Cetuximab expressas em CHOdhfr ou NM-H9D8 visualizadas por ligação de SNA.

Experimentos de ELISA foram usados para analisar a sialilação dos anticorpos isolados dos sobrenadantes das células NM-F9, NM-H9D8 ou NM-H9D8-E6. Os anticorpos purificados de 2 µg/mL em PBS e 50 µL por cavidade foram coletados em placas de microtitulação de 96 cavidades (Maxisorp) a 4°C de um dia para o outro, bloqueados (PBS/BSA), lavados e incubados por 1 hora com SNA biotinilado (2 µg/mL, PBS/ BAS 1%) e novamente lavados. As cavidades foram, a seguir, incubadas com POD-estreptavidina, lavadas e desenvolvida com TMB. A reação foi interrompida pela adição de H₂SO₄ 2,5 N e a densidade ótica foi medida a 450 nm contra 630 nm como referência. A figura 12 mostra que a ligação do SNA ocorre aos anticorpos expressos nas células NM-H9D8 ou NM-H9D8-E6, porém

não nos anticorpos expressos nas células CHOdhfr ou GT-2x. AS intensidades de ligação são diferentes para os anticorpos individuais, o que indica um diferente grau de sialilação causado pela fina estrutura dos anticorpos individuais ou a disponibilidade dos sacarídeos sob as condições usadas.

5 Experimentos de ELISA foram efetuados através do revestimento dos anticorpos purificados expressos nas diferentes linhagens celulares nas cavidades das placas de microtitulação (2 µg/mL, 50 µL por cavidade) e a detecção por lectinas biotiniladas apropriadas SNA e MAL I. A dependência da ligação da lectina por sialilação foi verificada por tratamento com neu-

10 raminidase (0,1 U/mL e incubação em temperatura ambiente por 1 hora). Os resultados para o Cetuximab estão ilustrados na figura 13A e na figura 13B.

Análises *dot blot* foram efetuadas para identificar as diferenças na sialilação dos anticorpos expressos nas células CHOdhfr, NM-F9, NM-H9D8 e NM-H9D8-E6. 3 µg dos anticorpos purificados foram marcados cada

15 um com nitrocelulose, bloqueados com PBS/BSA, lavados e visualizados por SNA, que detecta sialilação 2-6. A figura 14 mostra marcas dos anticorpos quiméricos Panko1 e Panko2 isolados das células CHOdhfr, NM-F9, NM-H9D8, ou NM-H9D8-E6. A sialilação 2-6 somente é detectável nos anticorpos isolados das células NM-H9D8 ou NM-H9D8-E6.

20 Exemplo 11

Detecção da biodisponibilidade das composições de molécula de anticorpo expressas nas células NM-F9, NM-H9D8 e CHOdhfr

Uma biodisponibilidade mais longa foi medida nos camundongos nus para o anticorpo sialilado PankoMab expressa em NM-H9D8 em compa-

25 ração com o anticorpo PankoMab não-sialilado expresso nas células NM-F9. 5 µg de anticorpo purificado por camundongo foram injetados i.v. para pelo menos 3 camundongos por grupo.

Amostras de sangue foram coletadas em diferentes pontos de tempo após a injeção (5 minutos, 2, 5, 8, 24, 48, 72 e 144 horas após a inje-

30 ção), o soro foi isolado e as amostras foram armazenadas a -80°C até a análise. O título do anticorpo foi determinado nessas amostras por ELISA. A figura 15 mostra que o PankoMab quimérico isolado das células NM-H9D8 é

disponível por mais tempo do que aquele isolado das células NM-F9, o que é provavelmente causado pela diferente sialilação dos anticorpos.

Exemplo 12

5 Clonagem dos vetores para expressar hFSH em células eucarióticas

As sequências codificadoras da cadeia FSH alfa e FSH beta foram amplificadas por PCR com iniciadores específicos usando os clones BAC RZPDB737B12203D (FSH alfa genômico), IRAUp969E0752D (FSH alfa DNAC) e RZPDB737B10619D6 (FSH beta genômico) obtidos de RZPD, Alemanha.

Iniciadores para a cadeia FSH alfa:

FSHa-wt-f-KpnI : AAAGGTACCATGGATTACTACAGAAAATATG /
FSHa-b-BamHI: AAAGGATCCTTAAGATTTGTGATAATAAC;

Iniciadores para a cadeia FSH beta:

FSHb-wt-f-HindIII: TTTAAGCTTATGAAGACACTCCAGTTTTTC /
FSHb-b-BamHI: TTTGGATCCTTATTCTTTCATTTCACC

15 Depois da amplificação, os produtos foram clonados através de HindIII/BamHI (FSH genômico beta) e KpnI/BamHI (FSH genômico alfa ou FSH DNAC alfa) no vetor de expressão eucariótico correspondente. Uma sequência de DNAC foi produzida por Genesynthesis codificando a cadeia beta de FSH fundida a uma sequência-líder TCR e clonada no vetor de expressão eucariótico (FSHcDNAbeta).

Sequência FSHDNACbeta (sequência-líder TCR sublinhada):

atggcctgccccggcttcctgtgggcctggtgatcagcacctgcctggaattctccatggctaacagctgcgagctgacc
aacatcaccatcgccatcgagaaagaggaatgccggttctgcatcagcatcaacaccacctggtgcgccggctactgc
tacaccgggacctggtgtacaaggaccccgccaggcccaagatccagaaaacctgcaccttcaagaactggtgta
cgagaccgtgcgggtgcccggctgcgccaccacgcccagacagcctgtacacctacccgtggccaccacgtgccact
gcggcaagtgcgacagcgacagcaccgactgcaccgtgaggggcctgggccccagctactgcagcttcggcgagat
gaaagagtga

25 Os vetores de expressão (pEF puro e pEFdhfrB_{mutB}) compreendem o promotor EF-1-alfa e o intensificador HCMV, origem SV40, o sinal de poliadenilação, o gene de resistência à puromicina no vetor para a cadeia alfa e o gene de di-hidrofolase de murino (dhfr) para a expressão da célula CHO ou da SEQ ID 1 (Sequência Nº 1) para a expressão de NM-F9 GT-2x,

K562, NM-H9, NM-D4 ou NM-H9D8 para seleção e amplificação de gene no vetor para a cadeia beta.

Exemplo 13

- Transfecção de células eucarióticas para expressar hFSH humana e procedimento de amplificação de gene para gerar clones de células de alta produtividade sob condições sem-soro (GT-2x e NM-H9D8) ou condições contendo soro (CHOdhfr)**

Para expressar hFSH em GT-2x [DSM ACC _____], NM-H9D8 (DSM ACC2806), e CHOdhfr (ATCC No. CRL-9096) células foram cotransfectadas com uma mistura dos vetores descritos acima para as cadeias alfa e beta (1:1 a 1:3) por lipofecção usando DMRIE-C ou eletroporação (Nucleofector; Amaxa) para as células em suspensão como GT-2x (FSH DNAC alfa / FSH GENÔMICO BETA) E nm-h9d8 (FSH DNAC alfa / FSH DNAC beta) e lipofectamina ou eletroporação para a linhagem de célula aderente CHOdhfr (FSH genômico alfa / FSH genômico beta). Essas são combinações exemplares usadas nessa configuração. Cada outra combinação de um plasmídeo de expressão de cadeia hFSH alfa e hFSH beta leva a resultados comparáveis.

Dois dias após a transfecção, o meio de crescimento foi alterado para o meio de seleção (GT-2x e NM-H9D8 em meio X-Vivo20 + 0,75 µg/mL de puromicina + 50 nM de metotrexato; CHOdhfr em DMEM + FCS 10% dialisado + 2 mM de L-glutamina + 5 µg/mL e puromicina + 50 mM de metotrexato) por 1 semana. A primeira amplificação foi efetuada aumentando-se a concentração de metotrexato até 100 nM por mais duas semanas e 200 nM de metotrexato por outras 2 semanas. Parte da população celular amplificada foi clonada de célula única em meio sem a adição de puromicina e metotrexato. O resto das células foi submetido a um novo ciclo de amplificação de genes através do aumento da concentração de metotrexato. Deste modo, de dois a três ciclos de amplificação de gene (100, 200, 500 nM de metotrexato) foram efetuados. Adicionalmente, os melhores clones produtores identificados por varredura e análise de clones foram adicionalmente amplificados semelhantemente.

CHOdhfr-: as células dos clones em crescimento foram lavadas com PBS e colhidas por tratamento com Accutase. A metade das células ressuspensas foi semeada em uma placa de teste de 96 cavidades, a outra metade foi semeada em uma placa de 24 cavidades para o cultivo adicional.

- 5 A placa de teste foi cultivada por 20 a 24 h. O sobrenadante de cada cavidade foi analisado quanto ao título de anticorpos, conforme descrito em Determinação da taxa de produtividade específica (SPR) e tempo de duplicação (g) (ver abaixo). A densidade de células relativa foi medida usando o ensaio MTT. Em detalhes, as células foram incubadas com solução MTT por 2 h, a
- 10 solução foi descartada e as células lisadas por uma solução de HCl a 0,04 M em 2-propanol. Depois de 2 horas, a placa foi moderadamente misturada e medida usando um fotômetro de placa de microtitulação com um filtro de 570 nm em modo dual contra um filtro de referência de 630 nm.

- aGT-2x e NM-H9D8:** Placas de 96 cavidades foram centrifugadas e o
- 15 sobrenadante foi descartado. As células foram ressuspensas em 200 μ L de meio fresco. Metade das células ressuspensas foi semeada em uma placa de teste de 96 cavidades e diluída com 100 μ L de meio, a outra metade permaneceu nas placas de clonagem para cultivo adicional. Depois de 2 dias de cultivo, a placa de teste foi centrifugada e 20 μ L do sobrenadante foram
- 20 analisados quanto ao título do anticorpo, conforme descrito em Determinação da taxa de produtividade específica (SPR) e tempo de duplicação (g) (ver abaixo). A densidade de células relativa foi medida usando o ensaio WST-1 pela adição de 10 μ L de solução WSR-1 (Roche) em cada cavidade. Depois de 1 a 3 horas de incubação, a medição foi efetuada usando um fo-
- 25 tômetro de placa de microtitulação com filtro de 450 nm em modo dual contra o filtro de referência de 630 nm.

Determinação da taxa de produtividade específica (SPR) e tempo de duplicação (g)

- Para cada clone, 2×10^4 células foram semeadas por cavida-
- 30 de de uma placa de cultivo tecidual de 24 cavidades em 500 μ L de meio de crescimento. As células foram deixadas crescer por 3 dias, o meio condicionado foi coletado para análise, e as células foram removidas, caso necessá-

rio, por Accutase e contadas. Os títulos de anticorpo específicos foram quantitativamente determinados a partir das amostras de meio por ELISA. As placas de ensaio foram revestidas com mAB específico da hFSHbeta (ab22473). O hFSH recombinante ligado foi incubado com anticorpo policlonal de cabra específico para hCG alfa (ab20712) e detectado com uma IgG anticabra de macaco H+L-POD (JacksonImmuno No. Cat. 305-035-003). Para a quantificação, hFSH recombinante foi usado como padrão.

A SPR foi medida em picogramas de proteína específica por célula por dia (pcd) é uma função tanto da taxa de crescimento quanto da produtividade, e foi calculada pelas seguintes equações:

$$SPR = \frac{\text{Massa de proteína total}}{\text{Área celular integral (ICA)}}$$

$$ICA = \frac{(\text{número de células final} - \text{número de células inicial}) \times \text{dias de cultivo}}{\log_{10}(\text{número de células final} / \text{número de células inicial})}$$

O tempo de duplicação foi calculado pela seguinte equação:

$$G = \log 2 \times (\text{horas em cultura}) / \log (\text{número de células final} / \text{número de células inicial})$$

15 Determinação do rendimento médio e do rendimento máximo das linhagens celulares

Após a clonagem de célula única em placas de 96 cavidades usando diluição limitada (0,5 células por cavidade) conforme descrito acima, a partir de 200 clones únicos teoricamente plaqueados, a SPR é determinada para os clones celulares em crescimento e a média e desvio são determinados, assim como o rendimento máximo para as diferentes linhagens celulares e diferentes condições. A tabela 7 e a tabela 8 comparam os dados dos clones celulares produtores de hFSH de CHOdhfr-, GT-2x e NM-H9D8 desenvolvidos sob condições contendo soro (CHOdhfr-) e condições sem-soro (GT-2x e NM-H9D8).

25 **Exemplo 14**

Isolamento da composição de molécula hFSH

Para a produção e isolamento de uma composição de molécula

hFSH de acordo com a invenção, as células estavelmente transfectadas secretando hFSH foram cultivadas em meio sem-soro até uma densidade celular de cerca de $1 \text{ a } 2 \times 10^6$ células/mL ser alcançada. Após a remoção das células do sobrenadante de cultura celular por centrifugação ($400 \times g$, 15 min), o anticorpo quimérico foi purificado compreendendo cromatografia de afinidade usando um anticorpo policlonal a hCGalfa acoplado a uma coluna NHS ativada (HiTrap NHS – HP ativada; GE Healthcare). A fração de FSH purificado que eluiu por alteração de pH repentina foi retamponada em PBS e concentrada usando tubos de centrifuga Centriprep (corte de 10 KDa, Millipore) e analisada por SDS-PAGE (ver figura 16).

Exemplo 15

Determinação da atividade das composições de moléculas FSH de acordo com a invenção.

A atividade das moléculas FSH carregando um diferente padrão de glicosilação pode ser determinada de acordo com os métodos subsequentemente descritos. Para selecionar uma linhagem celular adequada com o método de varredura de acordo com a presente invenção, o qual proporciona uma glicosilação otimizada, a molécula FSH é expressa em diferentes linhagens celulares, obtendo desta forma composições de FSH a partir das linhagens celulares individuais apresentando um padrão de glicosilação diferente em relação a, por exemplo, o grau de sialilação, ao grau de galactosilação e/ou de fucosilação. A molécula/composição de FSH com a atividade mais favorável e, deste modo, o padrão de glicosilação pode ser determinada por pelo menos um dos seguintes métodos:

25 Ensaio de célula granulosa de rato:

Células granulosas foram obtidas a partir dos ratos hipofissectomizados tratados com DES. O método para a preparação das células está descrito em detalhes por Jia e Hsueh 1985.

As células obtidas foram cultivadas em uma escala de 24 cavidades com ~ 160000 células/cavidade em meio McCoy's 5A contendo DES a 100 nM, 1-metil-3-isobutilxantina a 0,125 M, glutamina a 2 mM, androstenediona a 1 μ M, penicilina a 100 U/mL e estreptomicina a 100 μ g/mL, insuli-

na bovina a 1 µg/mL e concentrações crescentes de preparações rFSH derivadas de células GT-2x e NM-H9D8 (0 - 1 µg/mL) por até 72 horas. Os meios foram coletados 72 h após a incubação e armazenados a -20°C até a quantificação de estradiol por ELISA (Calbiotech N° ES071S).

5 **Ensaio de 293HEK:**

Células HEK293 estavelmente transfectadas com o receptor hFSH (2 x 10⁵ células/placas de cultura de 35 mm) foram expostas a doses crescentes de cada composição de molécula de proteína de FSH obtida a partir das células GT-2x e NM-H9D8 na faixa de 0 – 1 µg/mL de FSH na presença de 1-metil-3-isobutilxantina 0,125 mM por 24 h a 37°C por até 72 horas. Depois da incubação, as concentrações de AMPc (intra- e extracelulares) foram determinadas por cAMP Direct Biotrak® EIA (GE Healthcare, No. Cat: RPN225) de acordo com as instruções do fabricante.

Ensaio de células GFSHR-17:

15 As células foram cultivadas com meio Eagle modificado da Dulbecco Ham F12 (1:1 v/v; Biochrom KG, Berlim, Alemanha) contendo 5% de soro de bezerro fetal (Biochrom KG, Berlim, Alemanha). As células foram plaqueadas com placa de 2 x 10⁵ células 24 cavidades e incubadas com as composições de molécula proteica FSH obtidas das células GT-2x e NM-H9D8 por 24 h em uma faixa de 0 – 1 µg/mL por 1 – 24 horas. Os meios foram coletados após a incubação e armazenados a -20°C até a quantificação da progesterona através do uso de um ensaio ELISA de progesterona (Biochem Immunosystems, Freiburg, Alemanha) de acordo com as instruções do fabricante.

25 **Ensaio de célula granulosa humana**

As células de luteína granulosas de aspiratos foliculares, obtidas de mulheres participando de um programa de fertilização *in vitro* na Universidade de Münster, foram enriquecidas conforme descrito por Khan et al., 1990 e semeadas em placas de 6 cavidades (1 – 1,5 x 10⁵ células viáveis por cavidade). As células foram incubadas a 37°C em HAM's F12/meio essencial modificado da Dulbecco (DMEM) (1:1; ICN Biomedicals, Mecklenheim, Alemanha) suplementado com 10% de soro de bezerro fetal inativado

por calor (FCS; Gibco, ~~Eggenstein~~, Alemanha), penicilina (50 unidades/mL), estreptomicina (50 ~~pg/mL~~), gentamicina (100 ~~pc/mL~~) e anfotericina (0,6 ~~pg/mL~~) em uma atmosfera de 5% de CO₂. As células foram expostas a doses crescentes de cada composição de molécula proteica de FSH obtida de células GT-2x e NM-H9D8 na faixa de 0 – 1 µg/mL de FSH na presença de 1-metil-3-isobutilxantina a 0,125 mM por 24 h a 37°C por até 72 horas. Depois da incubação, as concentrações de AMPc (intra- e extracelulares) foram determinadas por cAMP Direct Biotrak® EIA (GE Healthcare, No. Cat: RPN225) de acordo com as instruções do fabricante.

10 Exemplo 16

Análise de glicano das composições FSH expressas nas células GT-2x e CHOdhfr.

Análise de Western blot foi efetuada para identificar as composições de moléculas FSH diferentemente sialiladas expressas em CHOdhfr, GT-2x [DSM ACC ____] ou NM-H9D8 [DSM ACC2806]. 5 µg de cada composição da molécula de anticorpo foram separados por SDS-Page em gel de acrilamida a 10% sob condições redutoras. As proteínas foram transferidas para nitrocelulose e visualizadas por SNA (figura 17), a qual detecta a sialilação 2-6.

20 Uma análise de glicano detalhada pode ser efetuada de acordo com o exemplo 10 para a determinação do teor de ácido siálico, distribuição de carga, teor de fucose, estado de galactosilação e teor de GlcNAc bifurcado.

25 Os resultados mostram que o FSH pode ser produzido com rendimentos muito elevados em GT-2x (ver figura 17). Nesse sentido, o produto também não apresentou qualquer NeuNAc 2-6 ligado detectável (ver raia 1 da figura 17). De modo contrário, FSH produzido em NM-H9D8 mostrou uma quantidade ainda maior de NeuNAc 2-6 ligado detectável. A atividade pode ser detectada pelos métodos descritos no exemplo 15.

30 **Definições de acordo com as recomendações IUPAC-IUBMB (1996):**

Neu5Gc: ácido 5-N-glicolil- α -neuramínico

Neu5Ac e NeuNAc: ácido 5-N-acetil- α -neuramínico

Gala1,3Gal e Galalpha 1,3Gal: sacarídeo adjacente ao α -D-galactopiranosil-(1 $\rightarrow$ 3)-galactopiranosila

Ácido neuramínico 2,3 ligado: sacarídeo adjacente ao 5-N-acetil- α -neuraminil-(2 $\rightarrow$ 3)

Ácido neuramínico 2,6 ligado: sacarídeo adjacente ao 5-N-acetil- α -neuraminil-(2 $\rightarrow$ 6)

É para ser compreendido que essa invenção não está limitada à metodologia, a protocolos e/ou a reagentes particulares conforme aqui descrito, e estes podem variar. Também é para ser entendido que a terminologia aqui utilizada é com o propósito somente de descrever modalidades particulares, e não é tencionada a limitar o escopo da presente invenção, o qual somente será limitado pelas reivindicações em anexo.

15 Sequência N° 1

SEQ ID 1

MVRPLNCIVAVSQDMGIGKNGDLPWPPLRNEWKYFQRMTTSSVEGKQNLVIMG
RKTWFSIPEKNRPLKDRINIVLSRELKEPPRGHAHFLAKSLDDALRLIEQPELASKVDMWWIVG
GSSVYQEAMNQPGHLRLFVTRIMQEFESDTFFPEIDLKGYKLLPEYPGVLSEVQEEKGIKYK
FEVYEKND

Sequência N° 2

SEQ ID 2

20 MVGSLNCIVAVSQNMGIGKNGDLPWPPLRNESRYFQRMTTSSVEGKQNLVIMG
KKTWFSIPEKNRPLKGRINLVLSRELKEPPQGAHFLSRSLDDALKLTEQPELANKVDMWWIV
GGSSVYKEAMNHPGHLKLFVTRIMQDFESDTFFPEIDLEKYKLLPEYPGVLSDVQEEKGIKY
KFEVYEKND

Sequência N° 3

SEQ ID 3

MVGSLNCIVAVSQNMGIGKNGDLPWPPLRNEARYFQRMTTSSVEGKQNLVIMG
KKTWFSIPEKNRPLKGRINLVLSRELKEPPQGAHFLSRSLDDALKLTEQPELANKVDMWWIV
GGSSVYKEAMNHPGHLKLFVTRIMQDFESDTFFPEIDLEKYKLLPEYPGVLSDVQEEKGIKY
KFEVYEKND

Sequência N° 4

25 SEQ ID 4

MVGSLNCIVAVSQNMGIGKNGDLPWPPLRNEGRYFQRM TTTSSVEGKQNLVIMG
 KKTWFSIPEKNRPLKGRINLVLSRELKEPPQGAHFLSRSLDDALKLTEQPELANKVDMWWIV
 GGSSVYKEAMNHPGHLKLFVTRIMQDFESDTFFPEIDLEKYKLLPEYPGVLSDVQEEKGIKY
 KFEVYEKND

Sequência Nº 5

SEQ ID 4

MVGSLNCIVAVSQNMGIGKNGDYPWPPLRNEFRYFQRM TTTSSVEGKQNLVIMG
 KKTWFSIPEKNRPLKGRINLVLSRELKEPPQGAHFLSRSLDDALKLTEQPELANKVDMWWIV
 GGSSVYKEAMNHPGHLKLFVTRIMQDFESDTFFPEIDLEKYKLLPEYPGVLSDVQEEKGIKY
 KFEVYEKND

5 Sequência Nº 6

SEQ ID 6

MVGSLNCIVAVSQNMGIGKNGDRPWPPLRNEFRYFQRM TTTSSVEGKQNLVIMG
 KKTWFSIPEKNRPLKGRINLVLSRELKEPPQGAHFLSRSLDDALKLTEQPELANKVDMWWIV
 GGSSVYKEAMNHPGHLKLFVTRIMQDFESDTFFPEIDLEKYKLLPEYPGVLSDVQEEKGIKY
 KFEVYEKND

Sequência Nº 7

10 SEQ ID 7

MVGSLNCIVAVSQNMGIGKNGDFPWPPLRNEFRYFQRM TTTSSVEGKQNLVIMG
 KKTWFSIPEKNRPLKGRINLVLSRELKEPPQGAHFLSRSLDDALKLTEQPELANKVDMWWIV
 GGSSVYKEAMNHPGHLKLFVTRIMQDFESDTFFPEIDLEKYKLLPEYPGVLSDVQEEKGIKY
 KFEVYEKND

Sequência Nº 8

SEQ ID 8

MVRPLNCIVAVSQNMGIGKNGDRPWPPLRNEFKYFQRM TTTSSVEGKQNLVIMG
 RKTWFSIPEKNRPLKDRINIVLSRELKEPPRGHAFLAKSLDDALRLIEQPELASKVDMWWIVG
 GSSVYQEAMNQPGHLRLFVTRIMQEFESDTFFPEIDLGKYKLLPEYPGVLSEVQEEKGIKYK
 FEVYEKKD

15 Sequência Nº 9

SEQ ID 9

MVRPLNCIVAVSQNMGIGKNGDYPWPPLRNEFKYFQRM TTTSSVEGKQNLVIMG
 RKTWFSIPEKNRPLKDRINIVLSRELKEPPRGHAFLAKSLDDALRLIEQPELASKVDMWWIVG
 GSSVYQEAMNQPGHLRLFVTRIMQEFESDTFFPEIDLGKYKLLPEYPGVLSEVQEEKGIKYK
 FEVYEKKD

Sequência Nº 10

SEQ ID 10

20 MWLGSLLLLGTVACSISA

Tabela 1

	CHOdhr	NM-F9
Taxa de produção (clgG1) Pcd determinado depois do 1º ao 4º ciclo de amplificação de gene (metotrexato) e clonagem de célula única a partir de 200 clones semeados (diluição limitada)	1º ciclo (MTX a 100 nM) <u>Média:</u> 2 +/- 1 pcd; <u>Max:</u> 3 pcd 2º ciclo (MTX a 200 nM) <u>Média:</u> 5 +/- 1 pcd; <u>Max:</u> 7 pcd 3º ciclo (MTX a 500 nM) <u>Média:</u> 9 +/- 5 pcd; <u>Max:</u> 17 pcd 4º ciclo: (MTX a 1000 nM) <u>Média:</u> 13 +/- 5 pcd; <u>Max:</u> 22 pcd	1º ciclo (MTX a 100 nM) <u>Média:</u> 5 +/- 1,5 pcd; <u>Max:</u> 13 pcd 2º ciclo (MTX a 200 nM) <u>Média:</u> 7,5 +/- 4,5 pcd; <u>Max:</u> 19 pcd 3º ciclo (MTX a 500 nM) <u>Média:</u> 12,5 +/- 4,5 pcd; <u>Max:</u> 19 pcd 4º ciclo: (MTX a 1000 nM) <u>Média:</u> 16,5 +/- 6 pcd; <u>Max:</u> 27 pcd

Tabela 2

	NM-H9D8
Taxa de produção (clgG1) Pcd determinado depois do 1º ao 5º ciclo de amplificação de gene (metotrexato) e clonagem de célula única a partir de 200 clones semeados (diluição limitada)	1º ciclo (MTX a 100 nM) <u>Média:</u> 7 +/- 4 pcd; <u>Max:</u> 14 pcd 2º ciclo (MTX a 200 nM) <u>Média:</u> 14 +/- 4 pcd; <u>Max:</u> 23 pcd 3º ciclo (MTX a 500 nM) <u>Média:</u> 13 +/- 6 pcd; <u>Max:</u> 31 pcd 4º ciclo: (MTX a 1000 nM) <u>Média:</u> 23 +/- 8 pcd; <u>Max:</u> 34 pcd 5º ciclo (MTX a 2000 nM) <u>Média:</u> 23 +/- 9 pcd; <u>Max:</u> 38 pcd

Tabela 3

	Pmol Neu5Gc	Pmol Neu5Ac	Pmol Neu5Gc/µg de proteína	Pmol Neu5Ac/µg de proteína
Erbitux (Merck; SP2/0)	0,149	0,000	1,784	0,000
Cetuximab GT-2x	0,000	0,278	0,000	3,335
Cetuximab NM-H9D8	0,000	1,156	0,000	12,003
cPankoMab CHOdhr	0,000	0,477	0,000	4,921
cPankoMab GT-2x	0,000	0,248	0,000	2,990
cPankoMab NM-H9D8	0,000	0,776	0,000	13,856

Tabela 4

	A0	A1	A2	A3	A4
Panko 1 CHOdhfr	75	9	11	4	1
Panko 1 NM-H9D8	43	14	32	10	1
Panko 1 NM-H9D8-E6	40	16	33	10	1
c-PankoMab CHOdhfr	93	7	0	0	0
cPankoMab NM-F9	99	1	0	0	0
cPankoMab NM-H9D8	62	26	11	1	0

Tabela 5

	G0 [%]	G1 [%]	G2 [%]	G3 [%]
Panko1 CHOdhfr	22	45	33	0
Panko1 NM-H9D8	7	8	66	14
Panko1 NM-H9D8-E6	5	18	58	19
cPankoMab CHOdhfr	28	36	35	1
cPankoMab NM-F9	7	26	65	2
cPankoMab NM-H9D8	7	32	59	0

Tabela 6

	Fucosilado	Não-fucosilado	GlcNAc Biantenado+ bifurcado
Panko1 CHOdhfr	100	0	0
Panko1 NM-H9D8	45	55	5
Panko1 NM-H9D8-E6	21	79	2

	Biantenado	GlcNAc biantenado + bifurcado	Não-fucosilado
cPankoMab-CHO	99	0	0
cPankoMab-NM-F9	68	29	6
cPankoMab-NM-H9D8	59	39	1

Tabela 7

	CHOdhfr	GT-2X
Taxa de produção (FSH) Pcd determinado depois do 3º ciclo de amplificação de genes (metotrexato) e clonagem de célula única a partir de 200 clones teoricamente semeados (diluição limitada)	3º ciclo (MTX a 500 nM) <u>Média</u> : < 1 pcd; <u>Max</u> : 0,05 pcd	2º ciclo (MTX a 200 nM) <u>Média</u> : 2,5 +/- 2,0 pcd; <u>Max</u> : 6 pcd

Tabela 8

	NM-H9D8
Taxa de produção (FSH) Pcd determinado depois do 2º ciclo de amplificação de genes (metotrexato) e clonagem de célula única a partir de 200 clones teoricamente semeados (diluição limitada)	2º ciclo (MTX a 200 nM) <u>Média</u> : 2,2 +/- 1,2 pcd; <u>Max</u> : 4 pcd

Tabela 9

- Sem NeuGC - Sem galalpha 1-3 Gal terminal detectável - Galactose elevada, conforme definido na reivindicação 2 e nas reivindicações dependentes - Fucose baixa, conforme definido na reivindicação 2 e nas reivindicações dependentes - bisecGlcNAc - atividade elevada, particularmente atividade Fc - afinidade maior - rendimento elevado - 2-6 NeuNAc - 2-3 NeuNAc - mais ácido siálico conforme definido na reivindicação 2 e nas reivindicações dependentes	- Sem NeuGC - Sem galalpha 1-3 Gal terminal detectável - Galactose elevada, conforme definido na reivindicação 2 e nas reivindicações dependentes - Fucose baixa, conforme definido na reivindicação 2 e nas reivindicações dependentes - bisecGlcNAc - atividade elevada, particularmente atividade Fc - afinidade maior - rendimento elevado - ácido siálico baixo conforme definido na reivindicação 2 e nas reivindicações dependentes	- Sem NeuGC - Sem galalpha 1-3 Gal terminal detectável - Galactose elevada, conforme definido na reivindicação 2 e nas reivindicações dependentes - Fucose baixa, conforme definido na reivindicação 2 e nas reivindicações dependentes - bisecGlcNAc - atividade elevada, particularmente atividade Fc - afinidade maior - rendimento elevado - 2-6 NeuNAc
- Sem NeuGC - Sem galalpha 1-3 Gal terminal detectável - Galactose elevada, conforme definido na reivindicação 2 e nas reivindicações dependentes - Fucose baixa, conforme definido na reivindicação 2 e nas reivindicações dependentes - bisecGlcNAc - atividade elevada, particularmente atividade Fc - rendimento elevado - 2-6 NeuNAc - 2-3 NeuNAc - mais ácido siálico conforme definido na reivindicação 2 e nas reivindicações dependentes	- Sem NeuGC - Sem galalpha 1-3 Gal terminal detectável - Galactose elevada, conforme definido na reivindicação 2 e nas reivindicações dependentes - Fucose baixa, conforme definido na reivindicação 2 e nas reivindicações dependentes - bisecGlcNAc - atividade elevada, particularmente atividade Fc - rendimento elevado - ácido siálico baixo conforme definido na reivindicação 2 e nas reivindicações dependentes	- Sem NeuGC - Sem galalpha 1-3 Gal terminal detectável - Galactose elevada, conforme definido na reivindicação 2 e nas reivindicações dependentes - Fucose baixa, conforme definido na reivindicação 2 e nas reivindicações dependentes - bisecGlcNAc - atividade elevada, particularmente atividade Fc - rendimento elevado - 2-6 NeuNAc
- Sem NeuGC - Sem galalpha 1-3 Gal terminal detectável - Galactose elevada, conforme definido na reivindicação 2 e nas reivindicações dependentes - Fucose baixa, conforme definido na reivindicação 2 e nas reivindicações dependentes - bisecGlcNAc - rendimento elevado - 2-6 NeuNAc	- Sem NeuGC - Sem galalpha 1-3 Gal terminal detectável - Galactose elevada, conforme definido na reivindicação 2 e nas reivindicações dependentes - Fucose baixa, conforme definido na reivindicação 2 e nas reivindicações dependentes - bisecGlcNAc - rendimento elevado - ácido siálico baixo conforme	- Sem NeuGC - Sem galalpha 1-3 Gal terminal detectável - Galactose elevada, conforme definido na reivindicação 2 e nas reivindicações dependentes - Fucose baixa, conforme definido na reivindicação 2 e nas reivindicações dependentes - bisecGlcNAc - rendimento elevado - 2-6 NeuNAc

- 2-3 NeuNAc - mais ácido siálico conforme definido na reivindicação 2 e nas reivindicações dependentes	me definido na reivindicação 2 e nas reivindicações dependentes	
- Sem NeuGC - Sem galalpha 1-3 Gal terminal detectável - Galactose elevada, conforme definido na reivindicação 2 e nas reivindicações dependentes - Fucose baixa, conforme definido na reivindicação 2 e nas reivindicações dependentes - bisecGlcNAc - atividade elevada, particularmente atividade Fc - 2-6 NeuNAc - 2-3 NeuNAc - mais ácido siálico conforme definido na reivindicação 2 e nas reivindicações dependentes	- Sem NeuGC - Sem galalpha 1-3 Gal terminal detectável - Galactose elevada, conforme definido na reivindicação 2 e nas reivindicações dependentes - Fucose baixa, conforme definido na reivindicação 2 e nas reivindicações dependentes - bisecGlcNAc - atividade elevada, particularmente atividade Fc - ácido siálico baixo conforme definido na reivindicação 2 e nas reivindicações dependentes	- Sem NeuGC - Sem galalpha 1-3 Gal terminal detectável - Galactose elevada, conforme definido na reivindicação 2 e nas reivindicações dependentes - Fucose baixa, conforme definido na reivindicação 2 e nas reivindicações dependentes - bisecGlcNAc - atividade elevada, particularmente atividade Fc - 2-6 NeuNAc
- Sem NeuGC - Sem galalpha 1-3 Gal terminal detectável - Galactose elevada, conforme definido na reivindicação 2 e nas reivindicações dependentes - bisecGlcNAc - atividade elevada, particularmente atividade Fc - rendimento elevado - 2-6 NeuNAc - 2-3 NeuNAc - mais ácido siálico conforme definido na reivindicação 2 e nas reivindicações dependentes	- Sem NeuGC - Sem galalpha 1-3 Gal terminal detectável - Galactose elevada, conforme definido na reivindicação 2 e nas reivindicações dependentes - bisecGlcNAc - atividade elevada, particularmente atividade Fc - rendimento elevado - ácido siálico baixo conforme definido na reivindicação 2 e nas reivindicações dependentes	- Sem NeuGC - Sem galalpha 1-3 Gal terminal detectável - Galactose elevada, conforme definido na reivindicação 2 e nas reivindicações dependentes - bisecGlcNAc - atividade elevada, particularmente atividade Fc - rendimento elevado - 2-6 NeuNAc
- Sem NeuGC - Sem galalpha 1-3 Gal terminal detectável - Galactose elevada, conforme definido na reivindicação 2 e nas reivindicações dependentes - bisecGlcNAc - atividade elevada, particularmente atividade Fc - 2-6 NeuNAc - 2-3 NeuNAc - mais ácido siálico conforme definido na reivindicação 2 e nas reivindicações dependentes	- Sem NeuGC - Sem galalpha 1-3 Gal terminal detectável - Galactose elevada, conforme definido na reivindicação 2 e nas reivindicações dependentes - bisecGlcNAc - atividade elevada, particularmente atividade Fc - ácido siálico baixo conforme definido na reivindicação 2 e nas reivindicações dependentes	- Sem NeuGC - Sem galalpha 1-3 Gal terminal detectável - Galactose elevada, conforme definido na reivindicação 2 e nas reivindicações dependentes - bisecGlcNAc - atividade elevada, particularmente atividade Fc - 2-6 NeuNAc

- Sem NeuGC - Sem galalpha 1-3 Gal terminal detectável - Galactose elevada, conforme definido na reivindicação 2 e nas reivindicações dependentes - bisecGlcNAc - rendimento elevado - 2-6 NeuNAc - 2-3 NeuNAc - mais ácido siálico conforme definido na reivindicação 2 e nas reivindicações dependentes	- Sem NeuGC - Sem galalpha 1-3 Gal terminal detectável - Galactose elevada, conforme definido na reivindicação 2 e nas reivindicações dependentes - bisecGlcNAc - rendimento elevado - ácido siálico baixo conforme definido na reivindicação 2 e nas reivindicações dependentes	- Sem NeuGC - Sem galalpha 1-3 Gal terminal detectável - Galactose elevada, conforme definido na reivindicação 2 e nas reivindicações dependentes - bisecGlcNAc - rendimento elevado - 6 NeuNAc
- Sem NeuGC - Sem galalpha 1-3 Gal terminal detectável - Galactose elevada, conforme definido na reivindicação 2 e nas reivindicações dependentes - atividade elevada, particularmente atividade Fc - 2-6 NeuNAc - 2-3 NeuNAc - mais ácido siálico conforme definido na reivindicação 2 e nas reivindicações dependentes	- Sem NeuGC - Sem galalpha 1-3 Gal terminal detectável - Galactose elevada, conforme definido na reivindicação 2 e nas reivindicações dependentes - atividade elevada, particularmente atividade Fc - ácido siálico baixo conforme definido na reivindicação 2 e nas reivindicações dependentes	- Sem NeuGC - Sem galalpha 1-3 Gal terminal detectável - Galactose elevada, conforme definido na reivindicação 2 e nas reivindicações dependentes - atividade elevada, particularmente atividade Fc - 2-6 NeuNAc
- Sem NeuGC - Sem galalpha 1-3 Gal terminal detectável - Galactose elevada, conforme definido na reivindicação 2 e nas reivindicações dependentes - rendimento elevado - 2-6 NeuNAc - 2-3 NeuNAc - mais ácido siálico conforme definido na reivindicação 2 e nas reivindicações dependentes	- Sem NeuGC - Sem galalpha 1-3 Gal terminal detectável - Galactose elevada, conforme definido na reivindicação 2 e nas reivindicações dependentes - rendimento elevado - ácido siálico baixo conforme definido na reivindicação 2 e nas reivindicações dependentes	- Sem NeuGC - Sem galalpha 1-3 Gal terminal detectável - Galactose elevada, conforme definido na reivindicação 2 e nas reivindicações dependentes - rendimento elevado - 2-6 NeuNAc
- Sem NeuGC - Sem galalpha 1-3 Gal terminal detectável - Fucose baixa, conforme definido na reivindicação 2 e nas reivindicações dependentes - bisecGlcNAc - atividade elevada, particularmente atividade Fc - afinidade maior - rendimento elevado - 2-6 NeuNAc - 2-3 NeuNAc	- Sem NeuGC - Sem galalpha 1-3 Gal terminal detectável - Fucose baixa, conforme definido na reivindicação 2 e nas reivindicações dependentes - bisecGlcNAc - atividade elevada, particularmente atividade Fc - afinidade maior - rendimento elevado - ácido siálico baixo conforme definido na reivindicação	- Sem NeuGC - Sem galalpha 1-3 Gal terminal detectável - Fucose baixa, conforme definido na reivindicação 2 e nas reivindicações dependentes - bisecGlcNAc - atividade elevada, particularmente atividade Fc - afinidade maior - rendimento elevado - 2-6 NeuNAc

- mais ácido siálico conforme definido na reivindicação 2 e nas reivindicações dependentes	2 e nas reivindicações dependentes	
- Sem NeuGC - Sem galalpha 1-3 Gal terminal detectável - Fucose baixa, conforme definido na reivindicação 2 e nas reivindicações dependentes - bisecGlcNAc - atividade elevada, particularmente atividade Fc - rendimento elevado - 2-6 NeuNAc - 2-3 NeuNAc - mais ácido siálico conforme definido na reivindicação 2 e nas reivindicações dependentes	- Sem NeuGC - Sem galalpha 1-3 Gal terminal detectável - Fucose baixa, conforme definido na reivindicação 2 e nas reivindicações dependentes - bisecGlcNAc - atividade elevada, particularmente atividade Fc - rendimento elevado - ácido siálico baixo conforme definido na reivindicação 2 e nas reivindicações dependentes	- Sem NeuGC - Sem galalpha 1-3 Gal terminal detectável - Fucose baixa, conforme definido na reivindicação 2 e nas reivindicações dependentes - bisecGlcNAc - atividade elevada, particularmente atividade Fc - rendimento elevado - 2-6 NeuNAc
- Sem NeuGC - Sem galalpha 1-3 Gal terminal detectável - Fucose baixa, conforme definido na reivindicação 2 e nas reivindicações dependentes - bisecGlcNAc - rendimento elevado - 2-6 NeuNAc - 2-3 NeuNAc - mais ácido siálico conforme definido na reivindicação 2 e nas reivindicações dependentes	- Sem NeuGC - Sem galalpha 1-3 Gal terminal detectável - Fucose baixa, conforme definido na reivindicação 2 e nas reivindicações dependentes - bisecGlcNAc - rendimento elevado - ácido siálico baixo conforme definido na reivindicação 2 e nas reivindicações dependentes	- Sem NeuGC - Sem galalpha 1-3 Gal terminal detectável - Fucose baixa, conforme definido na reivindicação 2 e nas reivindicações dependentes - bisecGlcNAc - rendimento elevado - 2-6 NeuNAc
- Sem NeuGC - Sem galalpha 1-3 Gal terminal detectável - Fucose baixa, conforme definido na reivindicação 2 e nas reivindicações dependentes - bisecGlcNAc - atividade elevada, particularmente atividade Fc - 2-6 NeuNAc - 2-3 NeuNAc - mais ácido siálico conforme definido na reivindicação 2 e nas reivindicações dependentes	- Sem NeuGC - Sem galalpha 1-3 Gal terminal detectável - Fucose baixa, conforme definido na reivindicação 2 e nas reivindicações dependentes - bisecGlcNAc - atividade elevada, particularmente atividade Fc - ácido siálico baixo conforme definido na reivindicação 2 e nas reivindicações dependentes	- Sem NeuGC - Sem galalpha 1-3 Gal terminal detectável - Fucose baixa, conforme definido na reivindicação 2 e nas reivindicações dependentes - bisecGlcNAc - atividade elevada, particularmente atividade Fc - 2-6 NeuNAc
- Sem NeuGC - Sem galalpha 1-3 Gal terminal detectável - bisecGlcNAc - atividade elevada, particularmente atividade Fc	- Sem NeuGC - Sem galalpha 1-3 Gal terminal detectável - bisecGlcNAc - atividade elevada, particularmente atividade Fc	- Sem NeuGC - Sem galalpha 1-3 Gal terminal detectável - bisecGlcNAc - atividade elevada, particularmente atividade Fc

- rendimento elevado - 2-6 NeuNAc - 2-3 NeuNAc - mais ácido siálico conforme definido na reivindicação 2 e nas reivindicações dependentes	- rendimento elevado - ácido siálico baixo conforme definido na reivindicação 2 e nas reivindicações dependentes	- rendimento elevado - 2-6 NeuNAc
- Sem NeuGC - Sem galalpha 1-3 Gal terminal detectável - bisecGlcNAc - atividade elevada, particularmente atividade Fc - 2-6 NeuNAc - 2-3 NeuNAc - mais ácido siálico conforme definido na reivindicação 2 e nas reivindicações dependentes	- Sem NeuGC - Sem galalpha 1-3 Gal terminal detectável - bisecGlcNAc - atividade elevada, particularmente atividade Fc - ácido siálico baixo conforme definido na reivindicação 2 e nas reivindicações dependentes	- Sem NeuGC - Sem galalpha 1-3 Gal terminal detectável - bisecGlcNAc - atividade elevada, particularmente atividade Fc - 2-6 NeuNAc
- Sem NeuGC - Sem galalpha 1-3 Gal terminal detectável - bisecGlcNAc - rendimento elevado - 2-6 NeuNAc - 2-3 NeuNAc - mais ácido siálico conforme definido na reivindicação 2 e nas reivindicações dependentes	- Sem NeuGC - Sem galalpha 1-3 Gal terminal detectável - bisecGlcNAc - rendimento elevado - ácido siálico baixo conforme definido na reivindicação 2 e nas reivindicações dependentes	- Sem NeuGC - Sem galalpha 1-3 Gal terminal detectável - bisecGlcNAc - rendimento elevado - 2-6 NeuNAc
- Sem NeuGC - Sem galalpha 1-3 Gal terminal detectável - atividade elevada, particularmente atividade Fc - 2-6 NeuNAc - 2-3 NeuNAc - mais ácido siálico conforme definido na reivindicação 2 e nas reivindicações dependentes	- Sem NeuGC - Sem galalpha 1-3 Gal terminal detectável - atividade elevada, particularmente atividade Fc - ácido siálico baixo conforme definido na reivindicação 2 e nas reivindicações dependentes	- Sem NeuGC - Sem galalpha 1-3 Gal terminal detectável - atividade elevada, particularmente atividade Fc - 2-6 NeuNAc
- Sem NeuGC - Sem galalpha 1-3 Gal terminal detectável - rendimento elevado - 2-6 NeuNAc - 2-3 NeuNAc - mais ácido siálico conforme definido na reivindicação 2 e nas reivindicações dependentes	- Sem NeuGC - Sem galalpha 1-3 Gal terminal detectável - rendimento elevado - ácido siálico baixo conforme definido na reivindicação 2 e nas reivindicações dependentes	- Sem NeuGC - Sem galalpha 1-3 Gal terminal detectável - rendimento elevado - 2-6 NeuNAc

Tabela 10**Panko 1**

Fuc neg + BisGlcNac neg H9D8 = 54%

Fuc pos + BisGlcNac pos H9D8 = 5%

Fuc neg + BisGlcNac pos H9D8 = 0%

H9D8-E6 = 79%

H9D8-E6 = 2%

H9D8-E6 = 0%

Panko 2

Fuc neg + BisGlcNac neg H9D8 = ~ 0%

Fuc pos + BisGlcNac pos H9D8 = 36%

Fuc neg + BisGlcNac pos H9D8 = 0%

F9 e GT-2X = ~ 5-6%

F9 e GT-2X = 29%

F9 e GT-2X = 0%

Número de referência de arquivo da requerente ou agente: 48 377 K	International application No.
--	-------------------------------

INDICAÇÕES REFERENTES A UM MICROORGANISMO DEPOSITADO

(PCT Rule 13*bis*)

A. As indicações feitas abaixo referem-se ao microorganismo mencionado no relatório descritivo na página <u>23</u> , linha <u>1</u> .	
B. IDENTIFICAÇÃO DE DEPÓSITO Outros depósitos estão identificados em uma folha adicional ☒	
Nome da instituição depositária Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ)	
Endereço da instituição depositária: (incluindo código postal e País) Mascheroder Weg 1b 38124 Braunschweig DE	
Data de depósito 14 de agosto de 2003	Número de acesso DSM ACC2606
C. Indicações Adicionais (deixar em branco se não for aplicável) Esta informação continua em uma folha adicional ☒	
D. Estados designados para os quais as indicações são feitas:	
E. FORNECIMENTO SEPARADO DE INDICAÇÕES (deixar em branco se não for aplicável)	
As indicações listados adiante serão submetidos ao Escritório Internacional mais tarde (especifique a natureza geral das indicações, por exemplo, número de acesso do depósito)	

Para uso apenas da repartição receptora	
☒	Essa folha foi recebido com o pedido internacional
Responsável autorizado: Poels, Richard	

Para uso apenas do Escritório Internacional	
☐	Essa folha foi recebida pelo escritório internacional
Responsável autorizado:	

Nossa ref: 48 377 K

Indicações adicionais de acordo com modelo PCT/RO/134 para o Número de Acesso DSM ACC2606:

- 5 O requerente com isto requer para os países os quais têm uma cláusula respectiva que as guarnições de uma amostra de material biológico depositado referidas no pedido somente podem ser feitas a um especialista nomeado e independente (requerimento de "solução especialista", onde aplicável, particularmente em Austrália, Canadá, Croácia, Dinamarca, Finlândia, Alemanha, Islândia, Noruega, Cingapura, Espanha, Suécia, Reino Unido, Europa).
- 10 Para a Europa, o requerente em conformidade requer que uma amostra do material biológico depositado seja disponibilizada conforme estabelecido na Regra 28 (3) EPC até a publicação de menção da concessão de patente ou para 20 anos, a partir da data de depósito se o pedido for recusado ou retirado ou considerado a ser retirado, somente pela questão de
- 15 uma amostra a um especialista nomeado pela pessoa requerendo a amostra (Regra 28 (4) EPC).

RECIBO NO CASO DE DEPÓSITO ORIGINAL
emitido por força da regra 7.1 pela
AUTORIDADE INTERNACIONAL DE DEPÓSITO
identificada abaixo

Nossa ref: 48 377 K

Número de referência de arquivo da requerente ou agente: 48 377 K	International application No.
---	-------------------------------

INDICAÇÕES REFERENTES A UM MICROORGANISMO DEPOSITADO

(PCT Rule 13bis)

A. As indicações feitas abaixo referem-se ao microorganismo mencionado no relatório descritivo na página <u>23</u> , linha <u>1</u> .	
B. IDENTIFICAÇÃO DE DEPÓSITO Outros depósitos estão identificados em uma folha adicional ☒	
Nome da instituição depositária Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ)	
Endereço da instituição depositária: (incluindo código postal e País) Mascheroder Weg 1b 38124 Braunschweig DE	
Data de depósito 14 de agosto de 2003	Número de acesso DSM ACC2605
C. Indicações Adicionais (deixar em branco se não for aplicável) Esta informação continua em uma folha adicional ☒	
D. Estados designados para os quais as indicações são feitas:	
E. FORNECIMENTO SEPARADO DE INDICAÇÕES (deixar em branco se não for aplicável)	
As indicações listados adiante serão submetidos ao Escritório Internacional mais tarde (especifique a natureza geral das indicações, por exemplo, número de acesso do depósito)	

Para uso apenas da repartição receptora
☒ Essa folha foi recebido com o pedido internacional
Responsável autorizado: Poels, Richard

Para uso apenas do Escritório Internacional
☐ Essa folha foi recebida pelo escritório internacional
Responsável autorizado:

Nossa ref: 48 377 k

Indicações adicionais de acordo com modelo PCT/RO/134 para o Número de Acesso DSM ACC2605:

- 5 O requerente com isto requer para os países os quais têm uma cláusula respectiva que as guarnições de uma amostra de material biológico depositado referidas no pedido somente podem ser feitas a um especialista nomeado e independente (requerimento de "solução especialista", onde aplicável, particularmente em Austrália, Canadá, Croácia, Dinamarca, Finlândia, Alemanha, Islândia, Noruega, Cingapura, Espanha, Suécia, Reino Unido, Europa).
- 10 Para a Europa, o requerente em conformidade requer que uma amostra do material biológico depositado seja disponibilizada conforme estabelecido na Regra 28 (3) EPC até a publicação de menção da concessão de patente ou para 20 anos, a partir da data de depósito se o pedido for recusado ou retirado ou considerado a ser retirado, somente pela questão de
- 15 uma amostra a um especialista nomeado pela pessoa requerendo a amostra (Regra 28 (4) EPC).

TRATADO DE BUDAPESTE
SOBRE O RECONHECIMENTO INTERNACIONAL DO DEPÓSITO DE MI-
CROORGANISMOS PARA FINS DE PROCESSAMENTO DE MATÉRIA DE
PATENTES

FORMATO INTERNACIONAL

Nemod Biotherapeutics GmbH & Co. KG
 Robert-Rössle-Str. 10
 13125 Berlin

RECIBO NO CASO DE DEPÓSITO ORIGINAL
 emitido por força da regra 7.1 pela
 AUTORIDADE INTERNACIONAL DE DEPÓSITO
 identificada abaixo

I. IDENTIFICAÇÃO DO MICROORGANISMO	
Referência de identificação fornecida pelo depositante NM-D4	Número de acesso fornecido pela AUTORIDADE INTERNACIONAL DE DEPÓSITO DSM ACC2605
II. DESCRIÇÃO CIENTÍFICA E/OU DESIGNAÇÃO TAXONÔMICA PROPOSTA	
O microorganismo identificado acima (I) foi acompanhado por:	
☒ (X) descrição científica ☐ () designação taxonômica proposta (Marcar com um X quando aplicável).	
III. RECIBO E ACEITAÇÃO	
A presente Autoridade Internacional de Depósito aceita o microorganismo identificado acima (I), o qual foi recebido em 14-08-2003 (data do depósito original) ¹ .	
IV. AUTORIDADE INTERNACIONAL DE DEPÓSITO	
Nome: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH Endereço: Mascheroder Weg 1b, D-38124 Braunschweig	Assinatura(s) da(s) pessoa(s) tendo o poder de representação da Autoridade Internacional de Depósito ou de oficial(is) responsável(is) Data: 16-10-2003

¹ Quando aplicável a Regra 6.4 (d), a referida data é a data a qual o status na Autoridade Internacional de depósito foi obtido.

Número de referência de arquivo da requerente ou agente: 48 377 K	International application No.
--	-------------------------------

INDICAÇÕES REFERENTES A UM MICROORGANISMO DEPOSITADO

(PCT Rule 13bis)

A. As indicações feitas abaixo referem-se ao microorganismo mencionado no relatório descritivo na página <u>61</u> , linha <u>21</u> .	
B. IDENTIFICAÇÃO DE DEPÓSITO	Outros depósitos estão identificados em uma folha adicional ☒
Nome da instituição depositária Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ)	
Endereço da instituição depositária: (incluindo código postal e País) Mascheroder Weg 1b 38124 Braunschweig DE	
Data de depósito 15 de setembro de 2006	Número de acesso DSM ACC2806
C. Indicações Adicionais (deixar em branco se não for aplicável) Esta informação continua em uma folha adicional ☒	
D. Estados designados para os quais as indicações são feitas:	
E. FORNECIMENTO SEPARADO DE INDICAÇÕES (deixar em branco se não for aplicável)	
As indicações listados adiante serão submetidos ao Escritório Internacional mais tarde (especifique a natureza geral das indicações, por exemplo, número de acesso do depósito)	

Para uso apenas da repartição receptora	
☒	Essa folha foi recebido com o pedido internacional
Responsável autorizado: Poels, Richard	

Para uso apenas do Escritório Internacional	
☐	Essa folha foi recebida pelo escritório internacional
Responsável autorizado:	

Nossa ref: 48 377 k

Indicações adicionais de acordo com modelo PCT/RO/134 para o Número de Acesso DSM ACC2806:

- 5 O requerente com isto requer para os países os quais têm uma cláusula respectiva que as guarnições de uma amostra de material biológico depositado referidas no pedido somente podem ser feitas a um especialista nomeado e independente (requerimento de "solução especialista", onde aplicável, particularmente em Austrália, Canadá, Croácia, Dinamarca, Finlândia, Alemanha, Islândia, Noruega, Cingapura, Espanha, Suécia, Reino Unido, Europa).
- 10 Para a Europa, o requerente em conformidade requer que uma amostra do material biológico depositado seja disponibilizada conforme estabelecido na Regra 28 (3) EPC até a publicação de menção da concessão de patente ou para 20 anos, a partir da data de depósito se o pedido for recusado ou retirado ou considerado a ser retirado, somente pela questão de
- 15 uma amostra a um especialista nomeado pela pessoa requerendo a amostra (Regra 28 (4) EPC).

**TRATADO DE BUDAPESTE SOBRE O RECONHECIMENTO INTERNACIONAL
DO DEPÓSITO DE MICROORGANISMOS PARA FINS DE PROCESSO
EM MATÉRIA DE PEDIDOS DE PATENTES**

MODELO INTERNACIONAL

Glycotope GmbH
Robert-Rössle-Str. 10
13125 Berlin

RECIBO EM CASO DE DEPÓSITO INICIAL liberado em
virtude da regra 7.1 pela AUTORIDADE DE DEPÓSITO
INTERNACIONAL identificada na parte inferior desta página

I. IDENTIFICAÇÃO DO MICROORGANISMO	
Referência de identificação fornecida pelo depositante NM-H9D8	Número de acesso fornecido pela AUTORIDADE INTERNACIONAL DE DEPÓSITO DSM ACC2806
I. DESCRIÇÃO CIENTÍFICA E/OU DESIGNAÇÃO TAXONÔMICA PROPOSTA	
O microorganismo identificado no item I foi acompanhado: ☐ descrição científica ☐ designação taxonômica proposta (Marcar o que for conveniente)	
III. RECEBIMENTO E ACEITAÇÃO	
A presente autoridade de depósito internacional aceita o microorganismo identificado no item I, que foi recebido em 14.08.2003 (data do depósito inicial) ¹	
IV. RECEPÇÃO DE UM REQUERIMENTO DE CONVERSÃO	
A presente autoridade de depósito internacional recebeu o microorganismo identificado no item I em _____ (data do depósito inicial) e recebeu um requerimento de conversão do depósito inicial em depósito conforme o Tratado de Budapeste em _____ (data de recebimento do requerimento de conversão)	
V. AUTORIDADE DE DEPÓSITO INTERNACIONAL	
Nome: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH Endereço: Inhoffenstr. 7 B D38124 Braunschweig	Assinatura(s) da(s) pessoa(s) competente(s) para representar a autoridade de depósito internacio- nal ou do(s) empregado(s) autorizado(s): Data: 09 de outubro 2006

¹ Em caso de aplicação da regra 6.4.d), esta data é a data em que o estatuto de autoridade de depósito internacional foi adquirido.

Número de referência de arquivo da requerente ou agente: 48 377 K	International application No.
--	-------------------------------

INDICAÇÕES REFERENTES A UM MICROORGANISMO DEPOSITADO

(PCT Rule 13*bis*)

A. As indicações feitas abaixo referem-se ao microorganismo mencionado no relatório descritivo na página <u>22</u> ,linha <u>16</u> .	
B. IDENTIFICAÇÃO DE DEPÓSITO	Outros depósitos estão identificados em uma folha adicional ☒
Nome da instituição depositária Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ)	
Endereço da instituição depositária: (incluindo código postal e País) Mascheroder Weg 1b 38124 Braunschweig DE	
Data de depósito 05 de outubro de 2006	Número de acesso DSM ACC2807
C. Indicações Adicionais (deixar em branco se não for aplicável) Esta informação continua em uma folha adicional ☒	
D. Estados designados para os quais as indicações são feitas:	
E. FORNECIMENTO SEPARADO DE INDICAÇÕES (deixar em branco se não for aplicável)	
As indicações listados adiante serão submetidos ao Escritório Internacional mais tarde (especifique a natureza geral das indicações, por exemplo, número de acesso do depósito)	

Para uso apenas da repartição receptora	
☒	Essa folha foi recebido com o pedido internacional
Responsável autorizado: Poels, Richard	

Para uso apenas do Escritório Internacional	
☐	Essa folha foi recebida pelo escritório internacional
Responsável autorizado:	

Nossa ref: 48 377 k

Indicações adicionais de acordo com modelo PCT/RO/134 para o Número de Acesso DSM ACC2807:

- 5 O requerente com isto requer para os países os quais têm uma cláusula respectiva que as guarnições de uma amostra de material biológico depositado referidas no pedido somente podem ser feitas a um especialista nomeado e independente (requerimento de "solução especialista", onde aplicável, particularmente em Austrália, Canadá, Croácia, Dinamarca, Finlândia, Alemanha, Islândia, Noruega, Cingapura, Espanha, Suécia, Reino Unido, Europa).
- 10 Para a Europa, o requerente em conformidade requer que uma amostra do material biológico depositado seja disponibilizada conforme estabelecido na Regra 28 (3) EPC até a publicação de menção da concessão de patente ou para 20 anos, a partir da data de depósito se o pedido for recusado ou retirado ou considerado a ser retirado, somente pela questão de
- 15 uma amostra a um especialista nomeado pela pessoa requerendo a amostra (Regra 28 (4) EPC).

TRATADO DE BUDAPESTE SOBRE O RECONHECIMENTO INTERNACIONAL
DO DEPÓSITO DE MICROORGANISMOS PARA FINS DE PROCESSO
EM MATÉRIA DE PEDIDOS DE PATENTES

MODELO INTERNACIONAL

Glycotope GmbH
Robert-Rössle-Str. 10
13125 Berlin

RECIBO EM CASO DE DEPÓSITO INICIAL liberado em
virtude da regra 7.1 pela AUTORIDADE DE DEPÓSITO
INTERNACIONAL identificada na parte inferior desta página

I. IDENTIFICAÇÃO DO MICROORGANISMO	
Referência de identificação fornecida pelo depositante NM-H9D8-E6	Número de acesso fornecido pela AUTORIDADE INTERNACIONAL DE DEPÓSITO DSM ACC2807
I. DESCRIÇÃO CIENTÍFICA E/OU DESIGNAÇÃO TAXONÔMICA PROPOSTA	
O microorganismo identificado no item I foi acompanhado: ☐ descrição científica ☐ designação taxonômica proposta (Marcar o que for conveniente)	
III. RECEBIMENTO E ACEITAÇÃO	
A presente autoridade de depósito internacional aceita o microorganismo identificado no item I, que foi recebido em 14.08.2003 (data do depósito inicial) ¹	
IV. RECEPÇÃO DE UM REQUERIMENTO DE CONVERSÃO	
A presente autoridade de depósito internacional recebeu o microorganismo identificado no item I em _____ (data do depósito inicial) e recebeu um requerimento de conversão do depósito inicial em depósito conforme o Tratado de Budapeste em _____ (data de recebimento do requerimento de conversão)	
V. AUTORIDADE DE DEPÓSITO INTERNACIONAL	
Nome: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON Mikroorganismen und zellkulturen GmbH Endereço: Inhoffenstr. 7 B D38124 Braunschweig	Assinatura(s) da(s) pessoa(s) competente(s) para representar a autoridade de depósito internacional ou do(s) empregado(s) autorizado(s): Data: 18 de outubro 2006

¹ Em caso de aplicação da regra 6.4.d), esta data é a data em que o estatuto de autoridade de depósito internacional foi adquirido.

Número de referência de arquivo da requerente ou agente: 48 377 K	International application No.
--	-------------------------------

INDICAÇÕES REFERENTES A UM MICROORGANISMO DEPOSITADO

(PCT Rule 13bis)

A. As indicações feitas abaixo referem-se ao microorganismo mencionado no relatório descritivo na página <u>61</u> , linha <u>28</u> .	
B. IDENTIFICAÇÃO DE DEPÓSITO Outros depósitos estão identificados em uma folha adicional ☒	
Nome da instituição depositária Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ)	
Endereço da instituição depositária: (incluindo código postal e País) Mascheroder Weg 1b 38124 Braunschweig DE	
Data de depósito 08 de agosto de 2007	Número de acesso DSM ACC2856
C. Indicações Adicionais (deixar em branco se não for aplicável) Esta informação continua em uma folha adicional ☒	
D. Estados designados para os quais as indicações são feitas:	
E. FORNECIMENTO SEPARADO DE INDICAÇÕES (deixar em branco se não for aplicável)	
As indicações listados adiante serão submetidos ao Escritório Internacional mais tarde (especifique a natureza geral das indicações, por exemplo, número de acesso do depósito)	

Para uso apenas da repartição receptora	
☒	Essa folha foi recebido com o pedido internacional
Responsável autorizado: Poels, Richard	

Para uso apenas do Escritório Internacional	
☐	Essa folha foi recebida pelo escritório internacional
Responsável autorizado:	

Nossa ref: 48 377 k

Indicações adicionais de acordo com modelo PCT/RO/134 para o Número de Acesso DSM ACC2856:

- 5 O requerente com isto requer para os países os quais têm uma cláusula respectiva que as guarnições de uma amostra de material biológico depositado referidas no pedido somente podem ser feitas a um especialista nomeado e independente (requerimento de "solução especialista", onde aplicável, particularmente em Austrália, Canadá, Croácia, Dinamarca, Finlândia, Alemanha, Islândia, Noruega, Cingapura, Espanha, Suécia, Reino Unido, Europa).
- 10 Para a Europa, o requerente em conformidade requer que uma amostra do material biológico depositado seja disponibilizada conforme estabelecido na Regra 28 (3) EPC até a publicação de menção da concessão de patente ou para 20 anos, a partir da data de depósito se o pedido for recusado ou retirado ou considerado a ser retirado, somente pela questão de
- 15 uma amostra a um especialista nomeado pela pessoa requerendo a amostra (Regra 28 (4) EPC).

TRATADO DE BUDAPESTE SOBRE O RECONHECIMENTO INTERNACIONAL
DO DEPÓSITO DE MICROORGANISMOS PARA FINS DE PROCESSO
EM MATÉRIA DE PEDIDOS DE PATENTES

MODELO INTERNACIONAL

Glycotope GmbH
Robert-Rössle-Str. 10
13125 Berlin

RECIBO EM CASO DE DEPÓSITO INICIAL liberado em
virtude da regra 7.1 pela AUTORIDADE DE DEPÓSITO
INTERNACIONAL identificada na parte inferior desta página

I. IDENTIFICAÇÃO DO MICROORGANISMO	
Referência de identificação fornecida pelo depositante NM-H9D8-E6Q12	Número de acesso fornecido pela AUTORIDADE INTERNACIONAL DE DEPÓSITO DSM ACC2856
I. DESCRIÇÃO CIENTÍFICA E/OU DESIGNAÇÃO TAXONÔMICA PROPOSTA	
O microorganismo identificado no item I foi acompanhado: ☐ descrição científica ☐ designação taxonômica proposta (Marcar o que for conveniente)	
III. RECEBIMENTO E ACEITAÇÃO	
A presente autoridade de depósito internacional aceita o microorganismo identificado no item I, que foi recebido em 08.08.2007 (data do depósito inicial) ¹	
IV. RECEPÇÃO DE UM REQUERIMENTO DE CONVERSÃO	
A presente autoridade de depósito internacional recebeu o microorganismo identificado no item I em _____ (data do depósito inicial) e recebeu um requerimento de conversão do depósito inicial em depósito conforme o Tratado de Budapeste em _____ (data de recebimento do requerimento de conversão)	
V. AUTORIDADE DE DEPÓSITO INTERNACIONAL	
Nome: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON Mikroorganismen und zellkulturen GmbH Endereço: Inhoffenstr. 7 B D38124 Braunschweig	Assinatura(s) da(s) pessoa(s) competente(s) para representar a autoridade de depósito internacional ou do(s) empregado(s) autorizado(s): Data: 23 de agosto 2007

¹ Em caso de aplicação da regra 6.4.d), esta data é a data em que o estatuto de autoridade de depósito internacional foi adquirido.

Número de referência de arquivo da requerente ou agente: 48 377 K	International application No.
--	-------------------------------

INDICAÇÕES REFERENTES A UM MICROORGANISMO DEPOSITADO

(PCT Rule 13bis)

A. As indicações feitas abaixo referem-se ao microorganismo mencionado no relatório descritivo na página _____, linha _____.	
B. IDENTIFICAÇÃO DE DEPÓSITO	Outros depósitos estão identificados em uma folha adicional ☒
Nome da instituição depositária Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ)	
Endereço da instituição depositária: (incluindo código postal e País) Mascheroder Weg 1b 38124 Braunschweig DE	
Data de depósito 07 de setembro de 2007	Número de acesso Não disponível ainda
C. Indicações Adicionais (deixar em branco se não for aplicável) Esta informação continua em uma folha adicional ☒	
D. Estados designados para os quais as indicações são feitas:	
E. FORNECIMENTO SEPARADO DE INDICAÇÕES (deixar em branco se não for aplicável)	
As indicações listados adiante serão submetidos ao Escritório Internacional mais tarde (especifique a natureza geral das indicações, por exemplo, número de acesso do depósito)	
Número de Acesso de depósito pa 6T-2X seguirá	

Para uso apenas da repartição receptora	
☒	Essa folha foi recebido com o pedido internacional
Responsável autorizado: Poels, Richard	

Para uso apenas do Escritório Internacional	
☐	Essa folha foi recebida pelo escritório internacional
Responsável autorizado:	

Nossa ref: 48 377 k

Indicações adicionais de acordo com modelo PCT/RO/134 para GT-2X – Número de acesso ainda não disponível:

- 5 O requerente com isto requer para os países os quais têm uma cláusula respectiva que as guarnições de uma amostra de material biológico depositado referidas no pedido somente podem ser feitas a um especialista nomeado e independente (requerimento de "solução especialista", onde aplicável, particularmente em Austrália, Canadá, Croácia, Dinamarca, Finlândia, Alemanha, Islândia, Noruega, Cingapura, Espanha, Suécia, Reino Unido, Europa).
- 10 Para a Europa, o requerente em conformidade requer que uma amostra do material biológico depositado seja disponibilizada conforme estabelecido na Regra 28 (3) EPC até a publicação de menção da concessão de patente ou para 20 anos, a partir da data de depósito se o pedido for recusado ou retirado ou considerado a ser retirado, somente pela questão de
- 15 uma amostra a um especialista nomeado pela pessoa requerendo a amostra (Regra 28 (4) EPC).

Número de referência de arquivo da requerente ou agente: 48 377 K	International application No. PCT/EP2007/007877
--	--

INDICAÇÕES REFERENTES A UM MICROORGANISMO DEPOSITADO

(PCT Rule 13bis)

A. As indicações feitas abaixo referem-se ao microorganismo mencionado no relatório descritivo na página <u>94</u> ,linha <u>39</u> .	
B. IDENTIFICAÇÃO DE DEPÓSITO	Outros depósitos estão identificados em uma folha adicional ☒
Nome da instituição depositária Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ)	
Endereço da instituição depositária: (incluindo código postal e País) Mascheroder Weg 1b 38124 Braunschweig DE	
Data de depósito 07 de setembro de 2007	Número de acesso DSM ACC2858
C. Indicações Adicionais (deixar em branco se não for aplicável) Esta informação continua em uma folha adicional ☒	
D. Estados designados para os quais as indicações são feitas:	
E. FORNECIMENTO SEPARADO DE INDICAÇÕES (deixar em branco se não for aplicável)	
As indicações listados adiante serão submetidos ao Escritório Internacional mais tarde (especifique a natureza geral das indicações, por exemplo, número de acesso do depósito)	

Para uso apenas da repartição receptora
☐ Essa folha foi recebido com o pedido internacional
Responsável autorizado: Poels, Richard

Para uso apenas do Escritório Internacional
☒ Essa folha foi recebida pelo escritório internacional 19 NOVEMBRO DE 2007 (19.11.2007)
Responsável autorizado: Kari Huynh-Khuong

Indicações adicionais de acordo com modelo PCT/RO/134 para o número de acesso DSM ACC2858:

- 5 O requerente com isto requer para os países os quais têm uma cláusula respectiva que as guarnições de uma amostra de material biológico depositado referidas no pedido somente podem ser feitas a um especialista nomeado e independente (requerimento de "solução especialista", onde aplicável, particularmente em Austrália, Canadá, Croácia, Dinamarca, Finlândia, Alemanha, Islândia, Noruega, Cingapura, Espanha, Suécia, Reino Unido, Europa).
- 10 Para a Europa, o requerente em conformidade requer que uma amostra do material biológico depositado seja disponibilizada conforme estabelecido na Regra 28 (3) EPC até a publicação de menção da concessão de patente ou para 20 anos, a partir da data de depósito se o pedido for recusado ou retirado ou considerado a ser retirado, somente pela questão de
- 15 uma amostra a um especialista nomeado pela pessoa requerendo a amostra (Regra 28 (4) EPC).

**TRATADO DE BUDAPESTE SOBRE O RECONHECIMENTO INTERNACIONAL
DO DEPÓSITO DE MICROORGANISMOS PARA FINS DE PROCESSO
EM MATÉRIA DE PEDIDOS DE PATENTES**

MODELO INTERNACIONAL

Glycotope GmbH
Robert-Rössle-Str. 10
13125 Berlin

RECIBO EM CASO DE DEPÓSITO INICIAL liberado em
virtude da regra 7.1 pela AUTORIDADE DE DEPÓSITO
INTERNACIONAL identificada na parte inferior desta página

I. IDENTIFICAÇÃO DO MICROORGANISMO	
Referência de identificação fornecida pelo depositante GT-2x	Número de acesso fornecido pela AUTORIDADE INTERNACIONAL DE DEPÓSITO DSM ACC2858
I. DESCRIÇÃO CIENTÍFICA/OU DESIGNAÇÃO TAXONÔMICA PROPOSTA	
O microorganismo identificado no item I foi acompanhado:	
☒ (x) descrição científica ☐ () designação taxonômica proposta	
(Marcar o que for conveniente)	
III. RECEBIMENTO E ACEITAÇÃO	
A presente autoridade de depósito internacional aceita o microorganismo identificado no item I, que foi recebido em 14.08.2003 (data do depósito inicial) ¹	
IV. RECEPÇÃO DE UM REQUERIMENTO DE CONVERSÃO	
A presente autoridade de depósito internacional recebeu o microorganismo identificado no item I em _____ (data do depósito inicial) e recebeu um requerimento de conversão de depósito inicial em depósito conforme o Tratado de Budapeste em _____ (data de recebimento do requerimento de conversão)	
V. AUTORIDADE DE DEPÓSITO INTERNACIONAL	
Nome: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH Endereço: Inhoffenstr. 7B D38124 Braunschweig	Assinatura(s) da(s) pessoa(s) competente(s) para representar a autoridade de depósito internacio- nal ou do(s) empregado(s) autorizado(s): Data: 20 de setembro 2007

¹ Em caso de aplicação da regra 6.4(d), esta data é a data em que o estatuto de autoridade de depósito internacional foi adquirido.

Indicações adicionais de acordo com modelo PCT/RO/134 para o número de acesso DSM ACC2606:

- 5 O requerente com isto requer para os países os quais têm uma cláusula respectiva que as guarnições de uma amostra de material biológico depositado referidas no pedido somente podem ser feitas a um especialista nomeado e independente (requerimento de "solução especialista", onde aplicável, particularmente em Austrália, Canadá, Croácia, Dinamarca, Finlândia, Alemanha, Islândia, Noruega, Cingapura, Espanha, Suécia, Reino Unido, Europa).
- 10 Para a Europa, o requerente em conformidade requer que uma amostra do material biológico depositado seja disponibilizada conforme estabelecido na Regra 28 (3) EPC até a publicação de menção da concessão de patente ou para 20 anos, a partir da data de depósito se o pedido for recusado ou retirado ou considerado a ser retirado, somente pela questão de
- 15 uma amostra a um especialista nomeado pela pessoa requerendo a amostra (Regra 28 (4) EPC).

**TRATADO DE BUDAPESTE
SOBRE O RECONHECIMENTO INTERNACIONAL DO DEPÓSITO DE MI-
CROORGANISMOS PARA FINS DE PROCESSAMENTO DE MATÉRIA DE
PATENTES**

FORMATO INTERNACIONAL

Nemod Biotherapeutics GmbH & Co. KG
Robert-Rössle-Str. 10
13125 Berlin

RECIBO NO CASO DE DEPÓSITO ORIGINAL
emitido por força da regra 7.1 pela
AUTORIDADE INTERNACIONAL DE DEPÓSITO
identificada abaixo

I. IDENTIFICAÇÃO DO MICROORGANISMO	
Referência de identificação fornecida pelo depositante NM-F9	Número de acesso fornecido pela AUTORIDADE INTERNACIONAL DE DEPÓSITO DSM ACC2606
II. DESCRIÇÃO CIENTÍFICA E/OU DESIGNAÇÃO TAXONÔMICA PROPOSTA	
O microorganismo identificado acima (I) foi acompanhado por: ☒ descrição científica ☐ designação taxonômica proposta (Marcar com um X quando aplicável).	
III. RECIBO E ACEITAÇÃO	
A presente Autoridade Internacional de Depósito aceita o microorganismo identificado acima (I), o qual foi recebido em 14-08-2003 (data do depósito original) ¹ .	
IV. AUTORIDADE INTERNACIONAL DE DEPÓSITO	
Nome: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH Endereço: Mascheroder Weg 1b, D-38124 Braunschweig	Assinatura(s) da(s) pessoa(s) tendo o poder de representação da Autoridade Internacional de Depósito ou de oficial(is) responsável(is) Data: 16-10-2003

¹ Quando aplicável a Regra 6.4 (d), a referida data é a data a qual o status na Autoridade Internacional de depósito foi obtido.

Número de referência de arquivo da requerente ou agente: 48 377 K	International application No.
--	-------------------------------

INDICAÇÕES REFERENTES A UM MICROORGANISMO DEPOSITADO

(PCT Rule 13bis)

A. As indicações feitas abaixo referem-se ao microorganismo mencionado no relatório descritivo na página <u>23</u> ,linha <u>1</u> .	
B. IDENTIFICAÇÃO DE DEPÓSITO Outros depósitos estão identificados em uma folha adicional ☒	
Nome da instituição depositária Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ)	
Endereço da instituição depositária: (incluindo código postal e País) Mascheroder Weg 1b 38124 Braunschweig DE	
Data de depósito 14 de agosto de 2003	Número de acesso DSM ACC2605
C. Indicações Adicionais (deixar em branco se não for aplicável) Esta informação continua em uma folha adicional ☒	
D. Estados designados para os quais as indicações são feitas:	
E. FORNECIMENTO SEPARADO DE INDICAÇÕES (deixar em branco se não for aplicável)	
As indicações listados adiante serão submetidos ao Escritório Internacional mais tarde (especifique a natureza geral das indicações, por exemplo, número de acesso do depósito)	

Para uso apenas da repartição receptora
☒ Essa folha foi recebido com o pedido internacional
Responsável autorizado: Poels, Richard

Para uso apenas do Escritório Internacional
☐ Essa folha foi recebida pelo escritório internacional
Responsável autorizado:

Nossa ref: 48 377 k

Indicações adicionais de acordo com modelo PCT/RO/134 para o número de acesso DSM ACC2605:

5 O requerente com isto requer para os países os quais têm uma cláusula respectiva que as guarnições de uma amostra de material biológico depositado referidas no pedido somente podem ser feitas a um especialista nomeado e independente (requerimento de "solução especialista", onde aplicável, particularmente em Austrália, Canadá, Croácia, Dinamarca, Finlândia, Alemanha, Islândia, Noruega, Cingapura, Espanha, Suécia, Reino Unido, Europa).

10 Para a Europa, o requerente em conformidade requer que uma amostra do material biológico depositado seja disponibilizada conforme estabelecido na Regra 28 (3) EPC até a publicação de menção da concessão de patente ou para 20 anos, a partir da data de depósito se o pedido for recusado ou retirado ou considerado a ser retirado, somente pela questão de
15 uma amostra a um especialista nomeado pela pessoa requerendo a amostra (Regra 28 (4) EPC).

**TRATADO DE BUDAPESTE
SOBRE O RECONHECIMENTO INTERNACIONAL DO DEPÓSITO DE MI-
CROORGANISMOS PARA FINS DE PROCESSAMENTO DE MATÉRIA DE
PATENTES**

FORMATO INTERNACIONAL

Nemod Biotherapeutics GmbH & Co. KG
Robert-Rössle-Str. 10
13125 Berlin

RECIBO NO CASO DE DEPÓSITO ORIGINAL
emitido por força da regra 7.1 pela
AUTORIDADE INTERNACIONAL DE DEPÓSITO
identificada abaixo

I. IDENTIFICAÇÃO DO MICROORGANISMO	
Referência de identificação fornecida pelo depositante NM-D4	Número de acesso fornecido pela AUTORIDADE INTERNACIONAL DE DEPÓSITO DSM ACC2605
II. DESCRIÇÃO CIENTÍFICA E/OU DESIGNAÇÃO TAXONÔMICA PROPOSTA	
O microorganismo identificado acima (I) foi acompanhado por:	
☒ descrição científica ☐ designação taxonômica proposta (Marcar com um X quando aplicável).	
III. RECIBO E ACEITAÇÃO	
A presente Autoridade Internacional de Depósito aceita o microorganismo identificado acima (I), o qual foi recebido em 14-08-2003 (data do depósito original) ¹ .	
IV. AUTORIDADE INTERNACIONAL DE DEPÓSITO	
Nome: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH Endereço: Mascheroder Weg 1b, D-38124 Braunschweig	Assinatura(s) da(s) pessoa(s) tendo o poder de representação da Autoridade Internacional de Depósito ou de oficial(is) responsável(is) Data: 16-10-2003

¹ Quando aplicável a Regra 6.4 (d), a referida data é a data a qual o status na Autoridade Internacional de depósito foi obtido.

Número de referência de arquivada requerente ou agente: 48 377 K	International application No.
---	-------------------------------

INDICAÇÕES REFERENTES A UM MICROORGANISMO DEPOSITADO

(PCT Rule 13bis)

A. As indicações feitas abaixo referem-se ao microorganismo mencionado no relatório descritivo na página <u>61</u> , linha <u>21</u> .	
B. IDENTIFICAÇÃO DE DEPÓSITO ☐ Outros depósitos estão identificados em uma folha adicional ☒	
Nome da instituição depositária Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ)	
Endereço da instituição depositária: (incluindo código postal e País) Mascheroder Weg 1b 38124 Braunschweig DE	
Data de depósito 15 de setembro de 2006	Número de acesso DSM ACC2806
C. Indicações Adicionais (deixar em branco se não for aplicável) Esta informação continua em uma folha adicional ☒	
D. Estados designados para os quais as indicações são feitas:	
E. FORNECIMENTO SEPARADO DE INDICAÇÕES (deixar em branco se não for aplicável)	
As indicações listados adiante serão submetidos ao Escritório Internacional mais tarde (especifique a natureza geral das indicações, por exemplo, número de acesso do depósito)	

Para uso apenas da repartição receptora	
☒	Essa folha foi recebido com o pedido internacional
Responsável autorizado: Poels, Richard	

Para uso apenas do Escritório Internacional	
☐	Essa folha foi recebida pelo escritório internacional
Responsável autorizado:	

Nossa ref: 48 377 k

Indicações adicionais de acordo com modelo PCT/RO/134 para o número de acesso DSM ACC28906:

5 O requerente com isto requer para os países os quais têm uma cláusula respectiva que as guarnições de uma amostra de material biológico depositado referidas no pedido somente podem ser feitas a um especialista nomeado e independente (requerimento de "solução especialista", onde aplicável, particularmente em Austrália, Canadá, Croácia, Dinamarca, Finlândia, Alemanha, Islândia, Noruega, Cingapura, Espanha, Suécia, Reino Unido, Europa).

10 Para a Europa, o requerente em conformidade requer que uma amostra do material biológico depositado seja disponibilizada conforme estabelecido na Regra 28 (3) EPC até a publicação de menção da concessão de patente ou para 20 anos, a partir da data de depósito se o pedido for recusado ou retirado ou considerado a ser retirado, somente pela questão de
15 uma amostra a um especialista nomeado pela pessoa requerendo a amostra (Regra 28 (4) EPC).

TRATADO DE BUDAPESTE
**SOBRE O RECONHECIMENTO INTERNACIONAL DO DEPÓSITO DE MI-
 CROORGANISMOS PARA FINS DE PROCESSAMENTO DE MATÉRIA DE
 PATENTES**

FORMATO INTERNACIONAL

Nemod Biotherapeutics GmbH & Co. KG
Robert-Rössle-Str. 10
13125 Berlin

RECIBO NO CASO DE DEPÓSITO ORIGINAL
 emitido por força da regra 7.1 pela
AUTORIDADE INTERNACIONAL DE DEPÓSITO
 identificada abaixo

I. IDENTIFICAÇÃO DO MICROORGANISMO	
Referência de identificação fornecida pelo depositante NM-H9D8	Número de acesso fornecido pela AUTORIDADE INTERNACIONAL DE DEPÓSITO DSM ACC2806
II. DESCRIÇÃO CIENTÍFICA E/OU DESIGNAÇÃO TAXONÔMICA PROPOSTA	
O microorganismo identificado acima (I) foi acompanhado por:	
☐ descrição científica ☐ designação taxonômica proposta (Marcar com um X quando aplicável).	
III. RECIBO E ACEITAÇÃO	
A presente Autoridade Internacional de Depósito aceita o microorganismo identificado acima (I), o qual foi recebido em 15-09-2006 (data do depósito original) ¹ .	
IV. AUTORIDADE INTERNACIONAL DE DEPÓSITO	
Nome: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH Endereço: Mascheroder Weg 1b, D-38124 Braunschweig	Assinatura(s) da(s) pessoa(s) tendo o poder de representação da Autoridade Internacional de Depósito ou de oficial(is) responsável(is) Data: 10-09-2006

¹ Quando aplicável a Regra 6.4 (d), a referida data é a data a qual o status na Autoridade Internacional de depósito foi obtido.

Número de referência de arquivo da requerente ou agente: 48 377 K	International application No.
--	-------------------------------

INDICAÇÕES REFERENTES A UM MICROORGANISMO DEPOSITADO

(PCT Rule 13bis)

A. As indicações feitas abaixo referem-se ao microorganismo mencionado no relatório descritivo na página <u>22</u> ,linha <u>16</u> .	
B. IDENTIFICAÇÃO DE DEPÓSITO	Outros depósitos estão identificados em uma folha adicional ☒
Nome da instituição depositária Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ)	
Endereço da instituição depositária: (incluindo código postal e País) Mascheroder Weg 1b 38124 Braunschweig DE	
Data de depósito 05 de outubro de 2006	Número de acesso DSM ACC2807
C. Indicações Adicionais (deixar em branco se não for aplicável) Esta informação continua em uma folha adicional ☒	
D. Estados designados para os quais as indicações são feitas:	
E. FORNECIMENTO SEPARADO DE INDICAÇÕES (deixar em branco se não for aplicável)	
As indicações listados adiante serão submetidos ao Escritório Internacional mais tarde (especifique a natureza geral das indicações, por exemplo, número de acesso do depósito)	

Para uso apenas da repartição receptora	
☒	Essa folha foi recebido com o pedido internacional
Responsável autorizado: Poels, Richard	

Para uso apenas do Escritório Internacional	
☐	Essa folha foi recebida pelo escritório internacional
Responsável autorizado:	

Indicações adicionais de acordo com modelo PCT/RO/134 para o número de acesso DSM ACC2807:

- O requerente com isto requer para os países os quais têm uma cláusula respectiva que as guarnições de uma amostra de material biológico depositado referidas no pedido somente podem ser feitas a um especialista nomeado e independente (requerimento de "solução especialista", onde aplicável, particularmente em Austrália, Canadá, Croácia, Dinamarca, Finlândia, Alemanha, Islândia, Noruega, Cingapura, Espanha, Suécia, Reino Unido, Europa).
- 10 Para a Europa, o requerente em conformidade requer que uma amostra do material biológico depositado seja disponibilizada conforme estabelecido na Regra 28 (3) EPC até a publicação de menção da concessão de patente ou para 20 anos, a partir da data de depósito se o pedido for recusado ou retirado ou considerado a ser retirado, somente pela questão de
- 15 uma amostra a um especialista nomeado pela pessoa requerendo a amostra (Regra 28 (4) EPC).

Número de referência de arquivo da requerente ou agente: 48 377 K	International application No.
--	-------------------------------

INDICAÇÕES REFERENTES A UM MICROORGANISMO DEPOSITADO

(PCT Rule 13bis)

A. As indicações feitas abaixo referem-se ao microorganismo mencionado no relatório descritivo na página <u>22</u> ,linha <u>16</u> .	
B. IDENTIFICAÇÃO DE DEPÓSITO Outros depósitos estão identificados em uma folha adicional ☒	
Nome da instituição depositária Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ)	
Endereço da instituição depositária: (incluindo código postal e País) Mascheroder Weg 1b 38124 Braunschweig DE	
Data de depósito 05 de outubro de 2006	Número de acesso DSM ACC2807
C. Indicações Adicionais (deixar em branco se não for aplicável) Esta informação continua em uma folha adicional ☒	
D. Estados designados para os quais as indicações são feitas:	
E. FORNECIMENTO SEPARADO DE INDICAÇÕES (deixar em branco se não for aplicável)	
As indicações listados adiante serão submetidos ao Escritório Internacional mais tarde (especifique a natureza geral das indicações, por exemplo, número de acesso do depósito)	

Para uso apenas da repartição receptora	
☒	Essa folha foi recebido com o pedido internacional
Responsável autorizado: Poels, Richard	

Para uso apenas do Escritório Internacional	
☐	Essa folha foi recebida pelo escritório internacional
Responsável autorizado:	

Nossa ref: 48 377 k

Indicações adicionais de acordo com modelo PCT/RO/134 para o número de acesso DSM ACC2807:

- 5 O requerente com isto requer para os países os quais têm uma cláusula respectiva que as guarnições de uma amostra de material biológico depositado referidas no pedido somente podem ser feitas a um especialista nomeado e independente (requerimento de "solução especialista", onde aplicável, particularmente em Austrália, Canadá, Croácia, Dinamarca, Finlândia, Alemanha, Islândia, Noruega, Cingapura, Espanha, Suécia, Reino Unido, Europa).
- 10 Para a Europa, o requerente em conformidade requer que uma amostra do material biológico depositado seja disponibilizada conforme estabelecido na Regra 28 (3) EPC até a publicação de menção da concessão de patente ou para 20 anos, a partir da data de depósito se o pedido for recusado ou retirado ou considerado a ser retirado, somente pela questão de
- 15 uma amostra a um especialista nomeado pela pessoa requerendo a amostra (Regra 28 (4) EPC).

**TRATADO DE BUDAPESTE SOBRE O RECONHECIMENTO INTERNACIONAL
DO DEPÓSITO DE MICROORGANISMOS PARA FINS DE PROCESSO
EM MATÉRIA DE PEDIDOS DE PATENTES**

MODELO INTERNACIONAL

Glycotope GmbH
Robert-Rössle-Str. 10
13125 Berlin

RECIBO EM CASO DE DEPÓSITO INICIAL liberado em
virtude da regra 7.1 pela AUTORIDADE DE DEPÓSITO
INTERNACIONAL identificada na parte inferior desta página

I. IDENTIFICAÇÃO DO MICROORGANISMO	
Referência de identificação fornecida pelo depositante NM-H9D8-E6	Número de acesso fornecido pela AUTORIDADE INTERNACIONAL DE DEPÓSITO DSM ACC2807
I. DESCRIÇÃO CIENTÍFICA E/OU DESIGNAÇÃO TAXONÔMICA PROPOSTA	
O microorganismo identificado no item I foi acompanhado: ☐ descrição científica ☐ designação taxonômica proposta (Marcar o que for conveniente)	
III. RECEBIMENTO E ACEITAÇÃO	
A presente autoridade de depósito internacional aceita o microorganismo identificado no item I, que foi recebido em 05.10.2006 (data do depósito inicial) ¹	
IV. RECEPÇÃO DE UM REQUERIMENTO DE CONVERSÃO	
A presente autoridade de depósito internacional recebeu o microorganismo identificado no item I em _____ (data do depósito inicial) e recebeu um requerimento de conversão do depósito inicial em depósito conforme o Tratado de Budapeste em _____ (data de recebimento do requerimento de conversão)	
V. AUTORIDADE DE DEPÓSITO INTERNACIONAL	
Nome: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON Mikroorganismen und zellkulturen GmbH Endereço: Inhoffenstr. 7 B D38124 Braunschweig	Assinatura(s) da(s) pessoa(s) competente(s) para representar a autoridade de depósito internacio- nal ou do(s) empregado(s) autorizado(s): Data: 18 de outubro 2006

¹ Em caso de aplicação da regra 6.4.d), esta data é a data em que o estatuto de autoridade de depósito internacional foi adquirido.

Número de referência de arquivo da requerente ou agente: 48 377 K	International application No.
--	-------------------------------

INDICAÇÕES REFERENTES A UM MICROORGANISMO DEPOSITADO

(PCT Rule 13bis)

A. As indicações feitas abaixo referem-se ao microorganismo mencionado no relatório descritivo na página <u>61</u> ,linha <u>28</u> .	
B. IDENTIFICAÇÃO DE DEPÓSITO	Outros depósitos estão identificados em uma folha adicional ☒
Nome da instituição depositária Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ)	
Endereço da instituição depositária: (incluindo código postal e País) Mascheroder Weg 1b 38124 Braunschweig DE	
Data de depósito 08 de agosto de 2003	Número de acesso DSM ACC2856
C. Indicações Adicionais (deixar em branco se não for aplicável) Esta informação continua em uma folha adicional ☒	
D. Estados designados para os quais as indicações são feitas:	
E. FORNECIMENTO SEPARADO DE INDICAÇÕES (deixar em branco se não for aplicável)	
As indicações listados adiante serão submetidos ao Escritório Internacional mais tarde (especifique a natureza geral das indicações, por exemplo, número de acesso do depósito)	

Para uso apenas da repartição receptora
☒ Essa folha foi recebido com o pedido internacional
Responsável autorizado: Poels, Richard

Para uso apenas do Escritório Internacional
☐ Essa folha foi recebida pelo escritório internacional
Responsável autorizado:

Nossa ref: 48 377 k

Indicações adicionais de acordo com modelo PCT/RO/134 para o número de acesso DSM ACC2856:

- 5 O requerente com isto requer para os países os quais têm uma cláusula respectiva que as guarnições de uma amostra de material biológico depositado referidas no pedido somente podem ser feitas a um especialista nomeado e independente (requerimento de "solução especialista", onde aplicável, particularmente em Austrália, Canadá, Croácia, Dinamarca, Finlândia, Alemanha, Islândia, Noruega, Cingapura, Espanha, Suécia, Reino Unido, Europa).
- 10 Para a Europa, o requerente em conformidade requer que uma amostra do material biológico depositado seja disponibilizada conforme estabelecido na Regra 28 (3) EPC até a publicação de menção da concessão de patente ou para 20 anos, a partir da data de depósito se o pedido for recusado ou retirado ou considerado a ser retirado, somente pela questão de
- 15 uma amostra a um especialista nomeado pela pessoa requerendo a amostra (Regra 28 (4) EPC).

TRATADO DE BUDAPESTE SOBRE O RECONHECIMENTO INTERNACIONAL
DO DEPÓSITO DE MICROORGANISMOS PARA FINS DE PROCESSO
EM MATÉRIA DE PEDIDOS DE PATENTES

MODELO INTERNACIONAL

Glycotope GmbH
Robert-Rössle-Str. 10
13125 Berlin

RECIBO EM CASO DE DEPÓSITO INICIAL liberado em
virtude da regra 7.1 pela AUTORIDADE DE DEPÓSITO
INTERNACIONAL identificada na parte inferior desta página

I. IDENTIFICAÇÃO DO MICROORGANISMO	
Referência de identificação fornecida pelo depositante NM-H9D8-E6Q12	Número de acesso fornecido pela AUTORIDADE INTERNACIONAL DE DEPÓSITO DSM ACC2856
I. DESCRIÇÃO CIENTÍFICA E/OU DESIGNAÇÃO TAXONÔMICA PROPOSTA	
O microorganismo identificado no item I foi acompanhado: ☐ descrição científica ☐ designação taxonômica proposta (Marcar o que for conveniente)	
III. RECEBIMENTO E ACEITAÇÃO	
A presente autoridade de depósito internacional aceita o microorganismo identificado no item I, que foi recebido em 08.08.2008 (data do depósito inicial) ¹	
IV. RECEPÇÃO DE UM REQUERIMENTO DE CONVERSÃO	
A presente autoridade de depósito internacional recebeu o microorganismo identificado no item I em _____ (data do depósito inicial) e recebeu um requerimento de conversão do depósito inicial em depósito conforme o Tratado de Budapeste em _____ (data de recebimento do requerimento de conversão)	
V. AUTORIDADE DE DEPÓSITO INTERNACIONAL	
Nome: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON Mikroorganismen und zellkulturen GmbH Endereço: Inhoffenstr. 7 B D38124 Braunschweig	Assinatura(s) da(s) pessoa(s) competente(s) para representar a autoridade de depósito internacio- nal ou do(s) empregado(s) autorizado(s): Data: 23 de agosto 2007

¹ Em caso de aplicação da regra 6.4.d), esta data é a data em que o estatuto de autoridade de depósito internacional foi adquirido.

Número de referência de arquivo da requerente ou agente: 48 377 K	International application No.
--	-------------------------------

INDICAÇÕES REFERENTES A UM MICROORGANISMO DEPOSITADO

(PCT Rule 13bis)

A. As indicações feitas abaixo referem-se ao microorganismo mencionado no relatório descritivo na página <u>23</u> ,linha <u>1</u> .	
B. IDENTIFICAÇÃO DE DEPÓSITO	Outros depósitos estão identificados em uma folha adicional ☒
Nome da instituição depositária Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ)	
Endereço da instituição depositária: (incluindo código postal e País) Mascheroder Weg 1b 38124 Braunschweig DE	
Data de depósito 07 de julho de 2007	Número de acesso
C. Indicações Adicionais (deixar em branco se não for aplicável) Esta informação continua em uma folha adicional ☒	
D. Estados designados para os quais as indicações são feitas:	
E. FORNECIMENTO SEPARADO DE INDICAÇÕES (deixar em branco se não for aplicável)	
As indicações listados adiante serão submetidos ao Escritório Internacional mais tarde (especifique a natureza geral das indicações, por exemplo, número de acesso do depósito)	

Para uso apenas da repartição receptora
☒ Essa folha foi recebido com o pedido internacional
Responsável autorizado: Poels, Richard

Para uso apenas do Escritório Internacional
☐ Essa folha foi recebida pelo escritório internacional
Responsável autorizado:

Nossa ref: 48 377 k

Indicações adicionais de acordo com modelo PCT/RO/134 para o número de acesso DSM ACC2858:

- 5 O requerente com isto requer para os países os quais têm uma cláusula respectiva que as guarnições de uma amostra de material biológico depositado referidas no pedido somente podem ser feitas a um especialista nomeado e independente (requerimento de "solução especialista", onde aplicável, particularmente em Austrália, Canadá, Croácia, Dinamarca, Finlândia, Alemanha, Islândia, Noruega, Cingapura, Espanha, Suécia, Reino Unido, Europa).
- 10 Para a Europa, o requerente em conformidade requer que uma amostra do material biológico depositado seja disponibilizada conforme estabelecido na Regra 28 (3) EPC até a publicação de menção da concessão de patente ou para 20 anos, a partir da data de depósito se o pedido for recusado ou retirado ou considerado a ser retirado, somente pela questão de
- 15 uma amostra a um especialista nomeado pela pessoa requerendo a amostra (Regra 28 (4) EPC).

LISTAGEM DE SEQUÊNCIA

<110> Glycotope GmbH
 <120> SISTEMA DE PRODUÇÃO TOTALMENTE HUMANO DE RENDIMENTO ELEVADO PARA
 PROTEÍNAS E ANTICORPOS MELHORADOS
 <130> 48 377
 <140> PCT/EP2007/007877
 <141> 2007-09-10
 <160> 21
 <170> PatentIn versão 3.3
 <210> 1
 <211> 187
 <212> PRT
 <213> Desconhecido
 <220>
 <223> Variante DHFR resistente a MTX
 <400> 1

Met Val Arg Pro Leu Asn Cys Ile Val Ala Val Ser Gln Asp Met Gly
 1 5 10 15

Ile Gly Lys Asn Gly Asp Leu Pro Trp Pro Pro Leu Arg Asn Glu Trp
 20 25 30

Lys Tyr Phe Gln Arg Met Thr Thr Thr Ser Ser Val Glu Gly Lys Gln
 35 40 45

Asn Leu Val Ile Met Gly Arg Lys Thr Trp Phe Ser Ile Pro Glu Lys
 50 55 60

Asn Arg Pro Leu Lys Asp Arg Ile Asn Ile Val Leu Ser Arg Glu Leu
 65 70 75 80

Lys Glu Pro Pro Arg Gly Ala His Phe Leu Ala Lys Ser Leu Asp Asp
 85 90 95

Ala Leu Arg Leu Ile Glu Gln Pro Glu Leu Ala Ser Lys Val Asp Met
 100 105 110

Val Trp Ile Val Gly Gly Ser Ser Val Tyr Gln Glu Ala Met Asn Gln
 115 120 125

Pro Gly His Leu Arg Leu Phe Val Thr Arg Ile Met Gln Glu Phe Glu
 130 135 140

Ser Asp Thr Phe Phe Pro Glu Ile Asp Leu Gly Lys Tyr Lys Leu Leu
 145 150 155 160

Pro Glu Tyr Pro Gly Val Leu Ser Glu Val Gln Glu Glu Lys Gly Ile
 165 170 175

Lys Tyr Lys Phe Glu Val Tyr Glu Lys Lys Asp
 180 185

<210> 2
 <211> 187
 <212> PRT
 <213> Desconhecido

<220>
 <223> Variante DHFR resistente a MTX

<400> 2

Met Val Gly Ser Leu Asn Cys Ile Val Ala Val Ser Gln Asn Met Gly
 1 5 10 15

Ile Gly Lys Asn Gly Asp Leu Pro Trp Pro Pro Leu Arg Asn Glu Ser
 20 25 30

Arg Tyr Phe Gln Arg Met Thr Thr Thr Ser Ser Val Glu Gly Lys Gln
 35 40 45

Asn Leu Val Ile Met Gly Lys Lys Thr Trp Phe Ser Ile Pro Glu Lys
 50 55 60

Asn Arg Pro Leu Lys Gly Arg Ile Asn Leu Val Leu Ser Arg Glu Leu
 65 70 75 80

Lys Glu Pro Pro Gln Gly Ala His Phe Leu Ser Arg Ser Leu Asp Asp
 85 90 95

Ala Leu Lys Leu Thr Glu Gln Pro Glu Leu Ala Asn Lys Val Asp Met
 100 105 110

Val Trp Ile Val Gly Gly Ser Ser Val Tyr Lys Glu Ala Met Asn His
 115 120 125

Pro Gly His Leu Lys Leu Phe Val Thr Arg Ile Met Gln Asp Phe Glu
 130 135 140

Ser Asp Thr Phe Phe Pro Glu Ile Asp Leu Glu Lys Tyr Lys Leu Leu
 145 150 155 160

Pro Glu Tyr Pro Gly Val Leu Ser Asp Val Gln Glu Glu Lys Gly Ile
 165 170 175

Lys Tyr Lys Phe Glu Val Tyr Glu Lys Asn Asp
 180 185

<210> 3
 <211> 187
 <212> PRT
 <213> Desconhecido

<220>
 <223> Variante DHFR resistente a MTX

<400> 3

Met Val Gly Ser Leu Asn Cys Ile Val Ala Val Ser Gln Asn Met Gly
 1 5 10 15

Ile Gly Lys Asn Gly Asp Leu Pro Trp Pro Pro Leu Arg Asn Glu Ala
 20 25 30

Arg Tyr Phe Gln Arg Met Thr Thr Thr Ser Ser Val Glu Gly Lys Gln
 35 40 45

Asn Leu Val Ile Met Gly Lys Lys Thr Trp Phe Ser Ile Pro Glu Lys
 50 55 60

Asn Arg Pro Leu Lys Gly Arg Ile Asn Leu Val Leu Ser Arg Glu Leu
 65 70 75 80

Lys Glu Pro Pro Gln Gly Ala His Phe Leu Ser Arg Ser Leu Asp Asp
 85 90 95

Ala Leu Lys Leu Thr Glu Gln Pro Glu Leu Ala Asn Lys Val Asp Met
 100 105 110

Val Trp Ile Val Gly Gly Ser Ser Val Tyr Lys Glu Ala Met Asn His
 115 120 125

Pro Gly His Leu Lys Leu Phe Val Thr Arg Ile Met Gln Asp Phe Glu
 130 135 140

Ser Asp Thr Phe Phe Pro Glu Ile Asp Leu Glu Lys Tyr Lys Leu Leu
 145 150 155 160

Pro Glu Tyr Pro Gly Val Leu Ser Asp Val Gln Glu Glu Lys Gly Ile
 165 170 175

Lys Tyr Lys Phe Glu Val Tyr Glu Lys Asn Asp
 180 185

<210> 4
 <211> 187
 <212> PRT
 <213> Desconhecido

<220>
 <223> Variante DHFR resistente a MTX

<400> 4

Met Val Gly Ser Leu Asn Cys Ile Val Ala Val Ser Gln Asn Met Gly
1 5 10 15

Ile Gly Lys Asn Gly Asp Leu Pro Trp Pro Pro Leu Arg Asn Glu Gly
20 25 30

Arg Tyr Phe Gln Arg Met Thr Thr Thr Ser Ser Val Glu Gly Lys Gln
35 40 45

Asn Leu Val Ile Met Gly Lys Lys Thr Trp Phe Ser Ile Pro Glu Lys
50 55 60

Asn Arg Pro Leu Lys Gly Arg Ile Asn Leu Val Leu Ser Arg Glu Leu
65 70 75 80

Lys Glu Pro Pro Gln Gly Ala His Phe Leu Ser Arg Ser Leu Asp Asp
85 90 95

Ala Leu Lys Leu Thr Glu Gln Pro Glu Leu Ala Asn Lys Val Asp Met
100 105 110

Val Trp Ile Val Gly Gly Ser Ser Val Tyr Lys Glu Ala Met Asn His
115 120 125

Pro Gly His Leu Lys Leu Phe Val Thr Arg Ile Met Gln Asp Phe Glu
130 135 140

Ser Asp Thr Phe Phe Pro Glu Ile Asp Leu Glu Lys Tyr Lys Leu Leu
145 150 155 160

Pro Glu Tyr Pro Gly Val Leu Ser Asp Val Gln Glu Glu Lys Gly Ile
165 170 175

Lys Tyr Lys Phe Glu Val Tyr Glu Lys Asn Asp
180 185

<210> 5

<211> 187

<212> PRT

<213> Desconhecido

<220>

<223> Variante DHFR resistente a MTX

<400> 5

Met Val Gly Ser Leu Asn Cys Ile Val Ala Val Ser Gln Asn Met Gly
1 5 10 15

Ile Gly Lys Asn Gly Asp Tyr Pro Trp Pro Pro Leu Arg Asn Glu Phe
20 25 30

Arg Tyr Phe Gln Arg Met Thr Thr Thr Ser Ser Val Glu Gly Lys Gln
35 40 45

Asn Leu Val Ile Met Gly Lys Lys Thr Trp Phe Ser Ile Pro Glu Lys
50 55 60

Asn Arg Pro Leu Lys Gly Arg Ile Asn Leu Val Leu Ser Arg Glu Leu
65 70 75 80

Lys Glu Pro Pro Gln Gly Ala His Phe Leu Ser Arg Ser Leu Asp Asp
85 90 95

Ala Leu Lys Leu Thr Glu Gln Pro Glu Leu Ala Asn Lys Val Asp Met
100 105 110

Val Trp Ile Val Gly Gly Ser Ser Val Tyr Lys Glu Ala Met Asn His
115 120 125

Pro Gly His Leu Lys Leu Phe Val Thr Arg Ile Met Gln Asp Phe Glu
130 135 140

Ser Asp Thr Phe Phe Pro Glu Ile Asp Leu Glu Lys Tyr Lys Leu Leu
145 150 155 160

Pro Glu Tyr Pro Gly Val Leu Ser Asp Val Gln Glu Glu Lys Gly Ile
165 170 175

Lys Tyr Lys Phe Glu Val Tyr Glu Lys Asn Asp
180 185

<210> 6
<211> 187
<212> PRT
<213> Desconhecido

<220>
<223> Variante DHFR resistente a MTX

<400> 6

Met Val Gly Ser Leu Asn Cys Ile Val Ala Val Ser Gln Asn Met Gly
1 5 10 15

Ile Gly Lys Asn Gly Asp Arg Pro Trp Pro Pro Leu Arg Asn Glu Phe
20 25 30

Arg Tyr Phe Gln Arg Met Thr Thr Thr Ser Ser Val Glu Gly Lys Gln
35 40 45

Asn Leu Val Ile Met Gly Lys Lys Thr Trp Phe Ser Ile Pro Glu Lys
50 55 60

Asn Arg Pro Leu Lys Gly Arg Ile Asn Leu Val Leu Ser Arg Glu Leu
65 70 75 80

Lys Glu Pro Pro Gln Gly Ala His Phe Leu Ser Arg Ser Leu Asp Asp
85 90 95

Ala Leu Lys Leu Thr Glu Gln Pro Glu Leu Ala Asn Lys Val Asp Met
100 105 110

Val Trp Ile Val Gly Gly Ser Ser Val Tyr Lys Glu Ala Met Asn His
115 120 125

Pro Gly His Leu Lys Leu Phe Val Thr Arg Ile Met Gln Asp Phe Glu
130 135 140

Ser Asp Thr Phe Phe Pro Glu Ile Asp Leu Glu Lys Tyr Lys Leu Leu
145 150 155 160

Pro Glu Tyr Pro Gly Val Leu Ser Asp Val Gln Glu Glu Lys Gly Ile
165 170 175

Lys Tyr Lys Phe Glu Val Tyr Glu Lys Asn Asp
180 185

<210> 7
<211> 187
<212> PRT
<213> Desconhecido

<220>
<223> Variante DHFR resistente a MTX

<400> 7

Met Val Gly Ser Leu Asn Cys Ile Val Ala Val Ser Gln Asn Met Gly
1 5 10 15

Ile Gly Lys Asn Gly Asp Phe Pro Trp Pro Pro Leu Arg Asn Glu Phe
20 25 30

Arg Tyr Phe Gln Arg Met Thr Thr Thr Ser Ser Val Glu Gly Lys Gln
35 40 45

Asn Leu Val Ile Met Gly Lys Lys Thr Trp Phe Ser Ile Pro Glu Lys
50 55 60

Asn Arg Pro Leu Lys Gly Arg Ile Asn Leu Val Leu Ser Arg Glu Leu
65 70 75 80

Lys Glu Pro Pro Gln Gly Ala His Phe Leu Ser Arg Ser Leu Asp Asp
85 90 95

Ala Leu Lys Leu Thr Glu Gln Pro Glu Leu Ala Asn Lys Val Asp Met
 100 105 110

Val Trp Ile Val Gly Gly Ser Ser Val Tyr Lys Glu Ala Met Asn His
 115 120 125

Pro Gly His Leu Lys Leu Phe Val Thr Arg Ile Met Gln Asp Phe Glu
 130 135 140

Ser Asp Thr Phe Phe Pro Glu Ile Asp Leu Glu Lys Tyr Lys Leu Leu
 145 150 155 160

Pro Glu Tyr Pro Gly Val Leu Ser Asp Val Gln Glu Glu Lys Gly Ile
 165 170 175

Lys Tyr Lys Phe Glu Val Tyr Glu Lys Asn Asp
 180 185

<210> 8
 <211> 187
 <212> PRT
 <213> Desconhecido

<220>
 <223> Variante DHFR resistente a MTX

<400> 8

Met Val Arg Pro Leu Asn Cys Ile Val Ala Val Ser Gln Asn Met Gly
 1 5 10 15

Ile Gly Lys Asn Gly Asp Arg Pro Trp Pro Pro Leu Arg Asn Glu Phe
 20 25 30

Lys Tyr Phe Gln Arg Met Thr Thr Thr Ser Ser Val Glu Gly Lys Gln
 35 40 45

Asn Leu Val Ile Met Gly Arg Lys Thr Trp Phe Ser Ile Pro Glu Lys
 50 55 60

Asn Arg Pro Leu Lys Asp Arg Ile Asn Ile Val Leu Ser Arg Glu Leu
 65 70 75 80

Lys Glu Pro Pro Arg Gly Ala His Phe Leu Ala Lys Ser Leu Asp Asp
 85 90 95

Ala Leu Arg Leu Ile Glu Gln Pro Glu Leu Ala Ser Lys Val Asp Met
 100 105 110

Val Trp Ile Val Gly Gly Ser Ser Val Tyr Gln Glu Ala Met Asn Gln
 115 120 125

Pro Gly His Leu Arg Leu Phe Val Thr Arg Ile Met Gln Glu Phe Glu
130 135 140

Ser Asp Thr Phe Phe Pro Glu Ile Asp Leu Gly Lys Tyr Lys Leu Leu
145 150 155 160

Pro Glu Tyr Pro Gly Val Leu Ser Glu Val Gln Glu Glu Lys Gly Ile
165 170 175

Lys Tyr Lys Phe Glu Val Tyr Glu Lys Lys Asp
180 185

<210> 9

<211> 187

<212> PRT

<213> Desconhecido

<220>

<223> MTX-resistant DHFR variant

<400> 9

Met Val Arg Pro Leu Asn Cys Ile Val Ala Val Ser Gln Asn Met Gly
1 5 10 15

Ile Gly Lys Asn Gly Asp Tyr Pro Trp Pro Pro Leu Arg Asn Glu Phe
20 25 30

Lys Tyr Phe Gln Arg Met Thr Thr Thr Ser Ser Val Glu Gly Lys Gln
35 40 45

Asn Leu Val Ile Met Gly Arg Lys Thr Trp Phe Ser Ile Pro Glu Lys
50 55 60

Asn Arg Pro Leu Lys Asp Arg Ile Asn Ile Val Leu Ser Arg Glu Leu
65 70 75 80

Lys Glu Pro Pro Arg Gly Ala His Phe Leu Ala Lys Ser Leu Asp Asp
85 90 95

Ala Leu Arg Leu Ile Glu Gln Pro Glu Leu Ala Ser Lys Val Asp Met
100 105 110

Val Trp Ile Val Gly Gly Ser Ser Val Tyr Gln Glu Ala Met Asn Gln
115 120 125

Pro Gly His Leu Arg Leu Phe Val Thr Arg Ile Met Gln Glu Phe Glu
130 135 140

Ser Asp Thr Phe Phe Pro Glu Ile Asp Leu Gly Lys Tyr Lys Leu Leu
145 150 155 160

Pro Glu Tyr Pro Gly Val Leu Ser Glu Val Gln Glu Glu Lys Gly Ile
 165 170 175

Lys Tyr Lys Phe Glu Val Tyr Glu Lys Lys Asp
 180 185

<210> 10
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Desconhecido

<220>
 <223> secretion peptide signal

<400> 10

Met Trp Leu Gly Ser Leu Leu Leu Leu Gly Thr Val Ala Cys Ser Ile
 1 5 10 15

Ser Ala

<210> 11
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> Desconhecido

<220>
 <223> cadeia pesada variável do antiopo Parko-1

<400> 11

Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Met Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ala
 20 25 30

Trp Met Asp Trp Val Arg Gln Ser Pro Glu Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ala Glu Ile Arg Ser Lys Ala Asn Asn His Ala Thr Tyr Tyr Ala Glu
 50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Val Ser Lys Ser Ser
 65 70 75 80

Val Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Arg Ala Glu Asp Thr Gly Ile Tyr
 85 90 95

Tyr Cys Thr Arg Gly Gly Tyr Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Thr Leu Thr Val Ser
 115

<210> 12
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Desconhecido

<220>
 <223> cadeia leve variável do antiopo Parko-1
 <400> 12

Asp Ile Val Leu Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser
 20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
 85 90 95

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

Arg

<210> 13
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> Desconhecido

<220>
 <223> cadeia pesada variável do antiopo Parko-2
 <400> 13

Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Met Lys Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
 20 25 30

Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ser Pro Glu Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ala Glu Ile Arg Leu Lys Ser Asn Asn Tyr Thr Thr His Tyr Ala Glu
 50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Ser
65 70 75 80

Val Ser Leu Gln Met Asn Asn Leu Arg Val Glu Asp Thr Gly Ile Tyr
85 90 95

Tyr Cys Thr Arg His Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr
100 105 110

Leu Thr Val Ser
115

<210> 14
<211> 113
<212> PRT
<213> Desconhecido

<220>
<223> cadeia leve variável do antiopo Parko-2

<400> 14

Asp Ile Val Met Thr Gln Ala Ala Phe Ser Asn Pro Val Thr Leu Gly
1 5 10 15

Thr Ser Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser
20 25 30

Asn Gly Ile Thr Tyr Phe Phe Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Leu Ser
35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gln Met Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Ser Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Arg Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ala Gln Asn
85 90 95

Leu Glu Leu Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

Arg

<210> 15
<211> 118
<212> PRT
<213> Desconhecido

<220>
<223> cadeia pesada variável do antiopo Cetuximab

<400> 15

Gln Val Gln Leu Lys Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Gln Pro Ser Gln
 1 5 10 15

Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asn Tyr
 20 25 30

Gly Val His Trp Val Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu
 35 40 45

Gly Val Ile Trp Ser Gly Gly Asn Thr Asp Tyr Asn Thr Pro Phe Thr
 50 55 60

Ser Arg Leu Ser Ile Asn Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Phe
 65 70 75 80

Lys Met Asn Ser Leu Gln Ser Asn Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95

Arg Ala Leu Thr Tyr Tyr Asp Tyr Glu Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser
 115

<210> 16

<211> 108

<212> PRT

<213> Desconhecido

<220>

<223> cadeia leve variável do antiopo Cetuximab

<400> 16

Asp Ile Leu Leu Thr Gln Ser Pro Val Ile Leu Ser Val Ser Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Arg Val Ser Phe Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn
 20 25 30

Ile His Trp Tyr Gln Gln Arg Thr Asn Gly Ser Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45

Lys Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile Asn Ser Val Glu Ser
 65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Asn Asn Trp Pro Thr
 85 90 95

Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg
 100 105

<210> 17
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Iniciador para cadeia alfa FSH

<400> 17
 aaaggtagcca tggattacta cagaaaatat g 31

<210> 18
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> artificial

<220>
 <223> iniciador para cadeia alfa FSH

<400> 18
 aaaggatcct taagatttgt gataataac 29

<210> 19
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Iniciador para cadeia beta FSH

<400> 19
 ttttaagctta tgaagacact ccagtttttc 30

<210> 20
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> iniciador para cadeia beta FSH

<400> 20
 tttggatcct tattcttttca tttcacc 27

<210> 21
 <211> 399
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> sequência cDNA

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(63)
 <223> Sequência-líder TCR

```

<400>      21
atggcctgcc ccggcttcct gtgggccctg gtgatcagca cctgcctgga attctccatg      60
gctaacagct gcgagctgac caacatcacc atcgccatcg agaaagagga atgccggttc      120
tgcacacagca tcaacaccac ctggtgcgcc ggctactgct acaccggga cctggtgtac      180
aaggaccccg ccaggcccaa gatccagaaa acctgcacct tcaaagaact ggtgtacgag      240
accgtgcggg tgcccggctg cgcccaccac gccgacagcc tgtacaccta ccccgaggcc      300
accagtgcc actgcggcaa gtgcgacagc gacagcaccg actgcaccgt gaggggcctg      360
ggccccagct actgcagctt cggcgagatg aaagagtga                               399

```

REIVINDICAÇÕES

1. Método para a produção de uma composição de molécula proteica, compreendendo:

- 5 (a) introduzir em uma célula hospedeira, a qual está numa célula sanguínea humana imortalizada, pelo menos um ácido nucleico codificando pelo menos uma parte da referida proteína; e
- 10 (b) cultivar a referida célula hospedeira sob condições as quais permitam a produção da referida composição de molécula proteica; e
- (c) isolar a referida composição da molécula proteica.

2. Método, de acordo com a reivindicação 1, para produzir uma composição de molécula proteica, preferivelmente uma composição de molécula de anticorpo, compreendendo as seguintes etapas:

- 15 (a) introduzir numa célula hospedeira, a qual está numa célula sanguínea humana imortalizada, pelo menos um ácido nucleico codificando pelo menos uma parte da mesma; em que a referida célula hospedeira é selecionada para produzir uma composição proteica com pelo menos uma das seguintes características de glicosilação:
- 20 (i) ela não compreende NeuGc detectável; e/ou
- (ii) ela tem um grau de glicosilação nas estruturas de carboidrato totais ou nas estruturas de carboidrato em um sítio de glicosilação particular da molécula proteica das moléculas de proteína na referida composição de molécula proteica que é aumentada em comparação com a mesma

- 25 quantidade de moléculas de proteína em pelo menos uma composição de molécula proteica da mesma molécula proteica isolada de CHOdhfr-[ATCC No. CRL-9096] quando ali expressa; e/ou

- 30 (iii) ela tem uma quantidade de estruturas G2 nas estruturas de carboidrato total ou na estrutura de carboidrato em um sítio de glicosilação particular da molécula proteica das referidas moléculas de proteína na referida composição de molécula proteica a qual é pelo menos 5% mais alta

em comparação com a mesma quantidade de moléculas de proteína em pelo menos uma composição de molécula proteica da mesma molécula proteica isolada a partir de CHOdhfr-[ATCC No. CRL-9096] quando ali expressa; e/ou

5 (iv) ela tem uma quantidade de estruturas G0 nas estruturas de carboidrato total ou nas estruturas de carboidrato em um sítio de glicosilação particular da molécula proteica das referidas moléculas de proteína na referida composição de molécula proteica a qual é pelo menos 5% mais baixa em comparação com a mesma quantidade de moléculas de proteína em pelo menos uma composição de molécula proteica da mesma molécula proteica isolada a partir de CHOdhfr-[ATCC No. CRL-9096] quando ali expressa; e/ou

 (v) ela não compreende Galalpha1-3Gal terminal detectável; e/ou

15 (vi) ela compreende uma quantidade de fucose nas estruturas de carboidrato total ou nas estruturas de carboidrato em um sítio de glicosilação particular da molécula proteica das referidas moléculas de proteína na referida composição de molécula proteica a qual é pelo menos 5% menor em comparação com a mesma quantidade de moléculas de proteína em pelo menos uma composição de molécula proteica da mesma molécula proteica isolada a partir de CHOdhfr-[ATCC No. CRL-9096] quando ali expressa; e/ou

 (vii) ela compreende pelo menos uma estrutura de carboidratos contendo GlcNAc bifurcado; e/ou

25 (viii) ela tem um padrão de sialilação o qual é alterado em comparação com o padrão de sialilação de pelo menos uma composição de molécula proteica da mesma molécula proteica isolada de CHOdhfr-[ATCC No. CRL-9096] quando ali expressa,

30 (b) cultivar a referida célula hospedeira sob condições as quais permitam a produção da referida composição de molécula proteica; e

 (c) isolar a referida composição da molécula proteica, em que

as moléculas proteicas têm pelo menos uma das características de glicosilação de (i) a (viii).

3. Método, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, em que o referido padrão de sialilação é caracterizado por pelo menos uma das seguintes

5 características:

- ela compreende alfa-2,6-NeuNAc ligado; e/ou

- ele tem um grau de sialilação aumentado com uma quantidade de NeuNAc na estrutura de carboidrato total ou nas estruturas de carboidrato de um sítio de glicosilação particular da molécula de proteína das moléculas de proteína na referida composição da molécula de proteína o qual é pelo menos 15% maior em comparação com a mesma quantidade de moléculas de proteína em pelo menos uma composição de molécula de proteína da mesma molécula de proteína isolada de CHOdhfr- [ATCC No. CRL-9096] quando ali expressa, e/ou

15 - ele tem um grau de sialilação reduzido com uma quantidade pelo menos 15% menor de NeuNAc na estrutura de carboidrato total ou nas estruturas de carboidrato em um sítio de glicosilação particular da molécula de proteína das moléculas de proteína na referida composição da molécula de proteína do que a mesma quantidade de moléculas de proteína de pelo menos uma composição de molécula de proteína da mesma molécula de proteína isolada de CHOdhfr- [ATCC No. CRL-9096] quando ali expressa, e/ou

25 - ela compreende pelo menos 20% a mais de cadeias de carboidratos N-glicosidicamente carregadas ligadas das unidades de carboidrato totais ou de pelo menos uma cadeia de carboidrato particular num sítio de glicosilação particular da molécula de proteína das moléculas de proteína na referida composição da molécula de proteína em comparação com a mesma quantidade de moléculas de proteína em pelo menos uma composição da molécula de proteína da mesma molécula de proteína isolada de CHOdhfr- [ATCC No. CRL-9096] quando ali expressa, e/ou

30 - ela compreende pelo menos 20% a menos de cadeias de carboidratos N-glicosidicamente carregadas ligadas das unidades de carboidra-

to totais ou de pelo menos uma cadeia de carboidrato particular num sítio de glicosilação particular da molécula de proteína das moléculas de proteína na referida composição da molécula de proteína em comparação com a mesma quantidade de moléculas de proteína em pelo menos uma composição da molécula de proteína da mesma molécula de proteína isolada de CHOdhfr-
 5 [ATCC No. CRL-9096] quando ali expressa.

4. Método, de acordo com pelo menos uma das reivindicações de 1 a 3, em que a referida célula hospedeira é selecionada para produzir uma glicoproteína, compreendendo pelo menos 10% de estruturas de carboi-
 10 boidrato das unidades de carboidrato totais ou de pelo menos uma cadeia de carboidrato particular num sítio de glicosilação particular da molécula de proteína das moléculas de proteína na referida composição da molécula proteica, sem fucose.

5. Método, de acordo com pelo menos uma das reivindicações de 1 a 4, em que a referida célula hospedeira é selecionada para produzir uma glicoproteína, compreendendo pelo menos 2% de estruturas de carboi-
 15 drato das unidades de carboidrato totais ou de pelo menos uma cadeia de carboidrato particular num sítio de glicosilação particular da molécula de proteína das moléculas de proteína na referida composição da molécula proteica, a qual contém GlcNAc bifurcado.
 20

6. Método, de acordo com pelo menos uma das reivindicações de 1 a 5, em que a referida célula hospedeira é selecionada para produzir uma glicoproteína, compreendendo

- mais de 35% de estruturas G2 nas estruturas de carboidrato total ou nas estruturas de carboidrato em um sítio de glicosilação particular da molécula de proteína na referida composição da molécula de proteína;
 25 e/ou

- ela compreende menos de 22% de estruturas G0 nas estruturas de carboidratos totais ou nas estruturas de carboidrato em um sítio de glicosilação particular da molécula de proteína na referida composição da molécula de proteína.
 30

7. Método, de acordo com pelo menos uma das reivindicações

de 1 a 6, em que a referida composição de molécula proteica produzida tem pelo menos uma das seguintes características:

5 - ela tem uma atividade aumentada e/ou rendimento aumentado, particularmente em comparação com pelo menos uma composição da molécula de proteína da mesma molécula de proteína quando expressa na linhagem celular CHOdhfr- [ATCC No. CRL-9096];

10 - ela tem uma homogeneidade melhorada, particularmente em comparação com pelo menos uma composição de molécula proteica da mesma molécula de proteína quando expressa na linhagem celular CHOdhfr- [ATCC No. CRL-9096];

 - ela tem uma média de rendimento máximo aumentado a qual é pelo menos 10% maior do que o rendimento de pelo menos uma composição de molécula proteica da mesma molécula de proteína quando expressa na linhagem celular CHOdhfr- [ATCC No. CRL-9096];

15 - ela tem uma homogeneidade melhorada, a qual é uma homogeneidade de glicosilação melhorada em comparação com pelo menos uma composição de molécula proteica da mesma molécula de proteína quando expressa na linhagem celular CHOdhfr- [ATCC No. CRL-9096];

20 - ela tem uma atividade aumentada em comparação com pelo menos uma composição de molécula proteica da mesma molécula de proteína quando expressa na linhagem celular CHOdhfr- [ATCC No. CRL-9096];

25 - no caso da referida molécula proteica ser uma molécula de anticorpo, ela tem uma citotoxicidade celular mediada por Fc a qual é pelo menos 2 vezes maior do que a citotoxicidade celular mediada por Fc de pelo menos uma composição da molécula de anticorpo a partir da mesma molécula de anticorpo quando expressa na linhagem celular CHOdhfr- [ATCC No. CRL-9096];

30 - no caso da referida molécula proteica ser uma molécula de anticorpo, ela tem uma ligação mediada por antígeno ou mediada por Fc a qual é pelo menos 15%, preferivelmente 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45% e preferivelmente 50% maior do que a ligação de pelo menos uma composição da molécula de anticorpo a partir da mesma molécula de anticorpo quando ex-

pressa na linhagem celular CHOdhfr- [ATCC No. CRL-9096].

8. Método, de acordo com pelo menos uma das reivindicações 1 a 7, em que a célula hospedeira cresce e produz a composição da molécula proteica sob condições sem-soro.

5 9. Método, de acordo com pelo menos uma das reivindicações 1 a 8, em que a célula hospedeira é selecionada para produzir uma composição de proteína compreendendo moléculas de proteína com as seguintes combinações de glicosilação características:

(a)

- 10 - ela não compreende NeuGc detectável;
 - ela não compreende Galalpha1-3Gal detectável;
 - ela compreende um padrão de galactosilação conforme definido na reivindicação 2;
 - ela tem um teor de fucose conforme definido na reivindicação

15 2;

- ela compreende bisecGlcNAc;
 - ela compreende uma quantidade aumentada de ácido siálico em comparação com uma composição proteica da mesma molécula proteica quando expressa na linhagem celular CHOdhfr-[ATCC No. CRL-9096] ou em
 20 comparação com uma linhagem celular deficiente de sialilação, tal como NM-F9 e NM-D4;

(b)

- ela não compreende NeuGc detectável;
 - ela não compreende Galalpha1-3Gal detectável;
 25 - ela compreende um padrão de galactosilação conforme definido na reivindicação 2;
 - ela tem um teor de fucose conforme definido na reivindicação
 2;

- ela compreende bisecGlcNAc;
 30 - ela compreende uma quantidade reduzida de ácido siálico em comparação com uma composição proteica da mesma molécula proteica quando expressa na linhagem celular CHOdhfr-[ATCC No. CRL-9096];

(c)

- ela não compreende NeuGc detectável;
- ela não compreende Galalpha1-3Gal detectável;
- ela compreende um padrão de galactosilação conforme defini-

5 do na reivindicação 2;

- ela tem um teor de fucose conforme definido na reivindicação

2;

- ela compreende bisecGlcNAc;

- ela compreende 2-6 NeuNAc;

10

10. Método, de acordo com pelo menos uma das reivindicações 1 a 9, em que uma célula hospedeira é usada, a qual é selecionada dos seguintes grupos de 1 a 4:

- (a) grupo 1, compreendendo células hospedeiras com uma atividade elevada de sialilação tal como K562 ou linhagens celulares dela derivadas;

15

- (b) grupo 2, compreendendo células hospedeiras com devido a uma deficiência genética ou a um sistema de supressão expressão uma baixa ou ausente atividade de sialilação, em comparação com e incluindo NM-F9 [DSM ACC2606], NM-D4 [DSM ACC2605] e GT-2X ou linhagem celulares derivadas delas;

20

- (c) grupo 3, compreendendo células hospedeiras com um grau de sialilação mais alto do que a K562, tal como NM-H9 e NM-H9D8, ou linhagens celulares derivadas delas;

25

- (d) grupo 4, compreendendo células hospedeiras com uma baixa ou ausente atividade de fucosilação, tal como NM-H9D8-E6 e NM-H9D8-E6Q12 ou linhagens celulares derivadas delas.

11. Método, de acordo com pelo menos uma das reivindicações

30 1 a 10, em que a célula hospedeira é de origem leucêmica mieloide humana e é preferivelmente selecionada do grupo consistindo em K562, NM-F9 [DSM ACC2606], NM-D4 [DSM ACC2605], GT - 2X [DSM ACC

_____, NM-H9, NM-E-2F9, NM-C-2F5, NM-H9D8 [DSM ACC 2806], NM-H9D8-E6, NM-H9D8-E6Q12 ou uma célula ou linhagem celular derivada delas.

12. Método, de acordo com pelo menos uma das reivindicações 1 a 11, em que um ácido nucleico é introduzido na célula hospedeira, codificando uma variante DHFR resistente a antifolato.

13. Método, de acordo com a reivindicação 12, em que o ácido nucleico codificando a referida variante DHFR resistente a antifolato é introduzido por um vetor separado além de um vetor compreendendo o ácido nucleico codificando pelo menos uma parte da referida proteína a ser expressa ou em que um vetor é usado, compreendendo pelo menos o ácido nucleico codificando pelo menos parte da referida proteína a ser expressa e o ácido nucleico codificando a variante DHFR resistente a antifolato.

14. Método, de acordo com a reivindicação 12 ou 13, em que a célula hospedeira é cultivada com o referido antifolato.

15. Método, de acordo com pelo menos uma das reivindicações 12 a 14, em que a sequência de ácido nucleico codificando pelo menos parte da referida molécula proteica a ser expressa é amplificada pelo aumento passo a passo da concentração de antifolato na cultura.

16. Método, de acordo com pelo menos uma das reivindicações 12 a 15, em que pelo menos uma das seguintes características é cumprida:

- (a) o antifolato é metotrexato
- (b) o ácido nucleico codificando a referida variante DHFR resistente ao antifolato codifica um polipeptídeo do grupo de sequência ID No. 1 a 9, preferivelmente ID No. 1.

17. Método, de acordo com pelo menos uma das reivindicações 1 a 16, em que a referida proteína é um anticorpo.

18. Método, de acordo com pelo menos uma das reivindicações 1 a 17, para produzir uma composição da molécula de anticorpo, compreendendo:

- (a) introduzir numa célula hospedeira de origem leucêmica mieloide humana pelo menos um ácido nucleico codifican-

5

de molécula de anticorpo ou pelo menos uma parte da
 e pelo menos um ácido nucleico compreendendo
 uma sequência de ácido nucleico codificando
 um polipeptídeo do grupo da sequência Nº 1
 sequência Nº 9; e

10

(b) a sequência de ácido nucleico codificando a refe-
 molécula de anticorpo ou pelo menos uma parte da
 pelo cultivo da referida célula hospedeira com me-
 to; e

(c) a referida célula hospedeira sob condições as quais
 a produção da referida composição da molécula
 do corpo, e

(d) is a referida composição da molécula de anticorpo.

15

19. Método de acordo com pelo menos uma das reivindicações
 1 a 18, para produzir uma composição de molécula de anticorpo com ativi-
 dade aumentada e rendimento aumentado e/ou homogeneidade aumen-
 tada, compreendendo:

20

(a) introduzir numa célula hospedeira de origem leucêmica
 de humana pelo menos um ácido nucleico codifican-
 do a molécula de anticorpo ou pelo menos uma parte da
 molécula, e

(b) cultivar a referida célula hospedeira sob condições as quais
 permitem a produção das referidas composições de molé-
 cula de anticorpo; e

25

(c) is a referida composição da molécula de anticorpo com
 atividade aumentada e/ou rendimento aumentado e/ou
 homogeneidade aumentada.

30

20. Método de acordo com pelo menos uma das reivindicações
 1 a 19, para produzir uma composição de molécula de anticorpo com ativi-
 dade aumentada e rendimento aumentado e/ou homogeneidade aumen-
 tada, compreendendo:

(a) introduzir numa célula hospedeira de origem leucêmica

mieloide humana pelo menos um ácido nucleico codifican-
do uma molécula de anticorpo ou pelo menos uma parte da
mesma, e pelo menos um ácido nucleico compreendendo
pelo menos uma sequência de ácido nucleico codificando
pelo menos um polipeptídeo do grupo da sequência Nº 1
até a sequência Nº 9; e

(b) amplificar a sequência de ácido nucleico codificando a refe-
rida molécula de anticorpo ou pelo menos uma parte da
mesma pelo cultivo da referida célula hospedeira com me-
totrexato; e

(c) cultivar a referida célula hospedeira sob condições as quais
permitem a produção da referida composição da molécula
de anticorpo, e

(d) isolar a referida composição da molécula de anticorpo com
atividade aumentada e/ou rendimento aumentado e/ou
homogeneidade aumentada.

21. Método para selecionar uma célula hospedeira para produzir
uma composição proteica com pelo menos uma das seguintes características
de glicosilação:

(i) ela não compreende NeuGc detectável; e/ou

(ii) ela tem um grau de galactosilação de galactose, o qual
está ligado ao GlcNAc, nas estruturas de carboidrato totais ou nas estruturas
de carboidrato em um sítio de glicosilação particular da molécula proteica
das moléculas de proteína na referida composição de molécula proteica que
é aumentado em comparação com a mesma quantidade de moléculas de
proteína em pelo menos uma composição de molécula proteica da mesma
molécula proteica isolada de CHOdhfr-[ATCC No. CRL-9096] quando ali ex-
pressa; e/ou

(iii) ela tem uma quantidade de estruturas G2 nas estruturas de
carboidrato total ou nas estruturas de carboidrato em um sítio de glicosilação
particular da molécula proteica das referidas moléculas de proteína na refe-
rida composição de molécula proteica a qual é pelo menos 5% mais alta em

comparação com a mesma quantidade de moléculas de proteína em pelo menos uma composição de molécula proteica da mesma molécula proteica isolada a partir de CHOdhfr-[ATCC No. CRL-9096] quando ali expressa; e/ou

(iv) ela tem uma quantidade de estruturas G0 nas estruturas de
5 carboidrato total ou nas estruturas de carboidrato em um sítio de glicosilação particular da molécula proteica das referidas moléculas de proteína na referida composição de molécula proteica a qual é pelo menos 5% mais baixa em comparação com a mesma quantidade de moléculas de proteína em pelo menos uma composição de molécula proteica da mesma molécula proteica isolada a partir de CHOdhfr-[ATCC No. CRL-9096] quando ali expressa;
10 e/ou

(v) ela não compreende Galalpha1-3Gal terminal detectável;
e/ou

(vi) ela compreende uma quantidade de fucose nas estruturas
15 de carboidrato total ou nas estruturas de carboidrato em um sítio de glicosilação particular da molécula proteica das referidas moléculas de proteína na referida composição de molécula proteica a qual é pelo menos 5% menor em comparação com a mesma quantidade de moléculas de proteína em pelo menos uma composição de molécula proteica da mesma molécula proteica isolada a partir de CHOdhfr-[ATCC No. CRL-9096] quando ali expressa;
20 e/ou

(vii) ela compreende pelo menos uma estrutura de carboidratos contendo GlcNAc bifurcado; e/ou

(viii) ela tem um padrão de sialilação o qual é alterado em
25 comparação com o padrão de sialilação de pelo menos uma composição de molécula proteica da mesma molécula proteica isolada de CHOdhfr-[ATCC No. CRL-9096] quando ali expressa;

pelas seguintes etapas

(a) introduzir em pelo menos duas células hospedeiras diferentes proporcionando um padrão de glicosilação divergente
30 de pelo menos um ácido nucleico codificando uma proteína ou pelo menos uma parte da mesma; em que pelo menos

uma das referidas células hospedeiras é uma célula sanguínea humana imortalizada e

- (b) cultivar as referidas pelo menos duas células hospedeiras diferentes, em que cada célula hospedeira diferente produz uma composição proteica com um padrão de glicosilação divergindo do padrão de glicosilação produzido pela outra célula hospedeira.
- (c) isolar as referidas composições proteicas expressas carregando um diferente padrão de glicosilação a partir de pelo menos duas células hospedeiras diferentes; e
- (d) seleccionar a referida célula hospedeira produzindo uma composição proteica a qual tenha pelo menos uma das características de glicosilação definidas em (i) a (viii).

22. Método, de acordo com a reivindicação 21, em que a referida composição proteica existe pelo menos uma das seguintes características:

- no caso dela ser uma composição de molécula de anticorpo, ela tem uma citotoxicidade celular mediada por Fc aumentada, a qual é pelo menos duas vezes maior do que a citotoxicidade celular mediada por Fc de pelo menos uma composição da molécula de anticorpo a partir da mesma molécula de anticorpo quando expressa na linhagem celular CHOdhfr- [ATCC No. CRL-9096];

e/ou

- no caso dela ser uma composição de molécula de anticorpo, ela tem uma ligação mediada por antígeno ou ligação mediada por Fc aumentada a qual é pelo menos 50% mais alta do que a ligação de pelo menos uma composição da molécula de anticorpo a partir da mesma molécula de anticorpo quando expressa na linhagem celular CHOdhfr- [ATCC No. CRL-9096];

e/ou

- ela tem uma média aumentada de rendimento máximo da referida composição da molécula proteica a qual é pelo menos 10% maior do que o rendimento de pelo menos uma composição de molécula proteica a

partir da mesma molécula de proteína quando expressa na linhagem celular CHOdhfr- [ATCC No. CRL-9096].

23. Método, de acordo com a reivindicação 21 ou 22, em que pelo menos uma das referidas pelo menos duas células hospedeiras diferentes de origem leucêmica mieloide humana é K562, NM-F9 [DSM ACC2606], NM-D4 [DSM ACC2605], GT – 2X [DSM ACC _____], NM-H9, NM-E-2F9, NM-C-2F5, NM-H9D8 [DSM ACC 2806], NM-H9D8-E6, NM-H9D8-E6Q12 ou uma célula ou linhagem celular derivada dessas.

24. Método, de acordo com a reivindicação 21 ou 22, em que pelo menos duas células hospedeiras diferentes são selecionadas a partir dos seguintes grupos de 1 a 4:

- (a) grupo 1, compreendendo células hospedeiras com atividade de sialilação tais como K562 ou linhagens celulares derivadas dessa;
- (b) grupo 2, compreendendo células hospedeiras devido a uma deficiência genética a uma baixa ou ausente sialilação, tais como NM-F9 [DSM ACC2606], NM-D4 [DSM ACC2605] e GT-2X ou linhagens celulares derivadas dessas;
- (c) grupo 3, compreendendo células hospedeiras com um grau de sialilação maior do que K562, tal como NM-H9 e NM-H9D8 ou células derivadas dessas;
- (d) grupo 4, compreendendo células hospedeiras com uma atividade baixa ou ausente de fucosilação, tais como NM-H9D8-E6 ou NM-H9D8-E6Q12 ou linhagens celulares derivadas dessas.

25. Método, de acordo com pelo menos uma das reivindicações 21 a 24, em que pelo menos uma célula hospedeira é selecionada, a qual produz uma composição proteica, preferivelmente uma composição de anticorpo, exibindo um padrão de glicosilação conforme definido nas reivindicações 2 a 9.

26. Proteína ou composição de molécula proteica, obtenível pelo

método de produção como definido em pelo menos uma das reivindicações 1 a 20.

27. Proteína ou composição de molécula proteica, de acordo com a reivindicação 26, em que a referida composição tem pelo menos uma das seguintes características:

- (i) ela não compreende NeuGc detectável; e/ou
- (ii) ela tem um grau de galactosilação de galactose na estrutura de carboidrato total ou nas estruturas de carboidratos em um sítio de glicosilação particular da molécula proteica das moléculas de proteína na referida composição de molécula proteica que é aumentado em comparação com a mesma quantidade de moléculas de proteína em pelo menos uma composição de molécula proteica da mesma molécula proteica isolada de CHOdhfr-[ATCC No. CRL-9096] quando ali expressa; e/ou
- (iii) ela tem uma quantidade de estruturas G2 nas estruturas de carboidrato total ou nas estruturas de carboidrato em um sítio de glicosilação particular da molécula proteica das referidas moléculas de proteína na referida composição de molécula proteica a qual é pelo menos 5% mais alta em comparação com a mesma quantidade de moléculas de proteína em pelo menos uma composição de molécula proteica da mesma molécula proteica isolada a partir de CHOdhfr-[ATCC No. CRL-9096] quando ali expressa; e/ou
- (iv) ela tem uma quantidade de estruturas G0 nas estruturas de carboidrato total ou nas estruturas de carboidrato em um sítio de glicosilação particular da molécula proteica das referidas moléculas de proteína na referida composição de molécula proteica a qual é pelo menos 5% mais baixa em comparação com a mesma quantidade de moléculas de proteína em pelo menos uma composição de molécula proteica da mesma molécula proteica isolada a partir de CHOdhfr-[ATCC No. CRL-9096] quando ali expressa; e/ou
- (v) ela não compreende Galalpha1-3Gal terminal detectável; e/ou
- (vi) ela compreende uma quantidade de fucose nas estruturas de carboidrato total ou nas estruturas de carboidrato em um sítio de glicosilação particular da molécula proteica das referidas moléculas de proteína na referida composição de molécula proteica a qual é pelo menos 5% mais alta em comparação com a mesma quantidade de moléculas de proteína em pelo menos uma composição de molécula proteica da mesma molécula proteica isolada a partir de CHOdhfr-[ATCC No. CRL-9096] quando ali expressa; e/ou

lação particular da molécula proteica das referidas moléculas de proteína na referida composição de molécula proteica a qual é pelo menos 5% menor em comparação com a mesma quantidade de moléculas de proteína em pelo menos uma composição de molécula proteica da mesma molécula proteica isolada a partir de CHOdhfr-[ATCC No. CRL-9096] quando ali expressa; e/ou

(vii) ela compreende pelo menos uma estrutura de carboidratos contendo GlcNAc bifurcado; e/ou

(viii) ela tem um padrão de sialilação o qual é alterado em comparação com o padrão de sialilação de pelo menos uma composição de molécula proteica da mesma molécula proteica isolada de CHOdhfr-[ATCC No. CRL-9096] quando ali expressa.

28. Proteína ou composição de molécula proteica, de acordo com a reivindicação 27, em que a composição de molécula proteica tem pelo menos uma das seguintes características:

- ela compreende alfa-2,6-NeuNAc ligado; e/ou

- ela tem um grau de sialilação aumentado com uma quantidade de NeuNAc na estrutura de carboidrato total ou nas estruturas de carboidrato de um sítio de glicosilação particular da molécula de proteína das moléculas de proteína na referida composição da molécula de proteína o qual é pelo menos 15% maior em comparação com a mesma quantidade de moléculas de proteína em pelo menos uma composição de molécula de proteína da mesma molécula de proteína isolada de CHOdhfr- [ATCC No. CRL-9096] quando ali expressa, e/ou

- ela tem um grau de sialilação reduzido com uma quantidade pelo menos 15% menor de NeuNAc na estrutura de carboidrato total ou nas estruturas de carboidrato em um sítio de glicosilação particular da molécula de proteína das moléculas de proteína na referida composição da molécula de proteína do que a mesma quantidade de moléculas de proteína de pelo menos uma composição de molécula de proteína da mesma molécula de proteína isolada de CHOdhfr- [ATCC No. CRL-9096] quando ali expressa, e/ou

- ela compreende pelo menos 20% a mais de cadeias de carboidratos N-glicosidicamente carregadas ligadas das unidades de carboidrato totais ou de pelo menos uma cadeia de carboidrato particular num sítio de glicosilação particular da molécula de proteína das moléculas de proteína na referida composição da molécula de proteína em comparação com a mesma quantidade de moléculas de proteína em pelo menos uma composição da molécula de proteína da mesma molécula de proteína isolada de CHOdhfr-
5 [ATCC No. CRL-9096] quanto ali expressa, e/ou

- ela compreende pelo menos 20% a menos de cadeias de carboidratos N-glicosidicamente carregadas ligadas das unidades de carboidrato totais ou de pelo menos uma cadeia de carboidrato particular num sítio de glicosilação particular da molécula de proteína das moléculas de proteína na referida composição da molécula de proteína em comparação com a mesma quantidade de moléculas de proteína em pelo menos uma composição da
10 molécula de proteína da mesma molécula de proteína isolada de CHOdhfr-
15 [ATCC No. CRL-9096] quanto ali expressa; e/ou

- ela compreende pelo menos 10% de estruturas de carboidratos das unidades de carboidratos totais de pelo menos uma cadeia de carboidrato particular num sítio de glicosilação particular de uma molécula de proteína das moléculas de proteína na referida composição de molécula proteica, sem-fucose; e/ou
20

- ela compreende pelo menos 2% de estruturas de carboidratos das unidades de carboidratos totais de pelo menos uma cadeia de carboidrato particular num sítio de glicosilação particular de uma molécula de proteína das moléculas de proteína na referida composição de molécula proteica, a qual contém GlcNAc bisecting; e/ou
25

- ela compreende mais de 35% de estruturas G2 nas estruturas de carboidrato total ou nas estruturas de carboidrato em um sítio de glicosilação particular da molécula de proteína das moléculas proteicas na referida composição proteica; e/ou
30

- ela compreende menos de 22% de estruturas G0 nas estruturas de carboidratos totais ou nas estruturas de carboidrato em um sítio de

glicosilação particular da molécula de proteína das moléculas de proteína na referida composição proteica; e/ou

5 - ela tem uma atividade aumentada e/ou rendimento aumentado em comparação com pelo menos uma composição de molécula proteica da mesma molécula proteica quando expressa na linhagem celular CHO dhfr- [ATCC No. CRL-9096]; e/ou

10 - ela tem uma homogeneidade melhorada em comparação com pelo menos uma composição de molécula proteica da mesma molécula proteica quando expressa na linhagem celular CHOdhfr- [ATCC No. CRL-9096]; e/ou

15 - ela tem uma média aumentada ou rendimento máximo o qual é pelo menos 10% maior do que o rendimento de pelo menos uma composição de molécula proteica a partir da mesma molécula proteica quando expressa na linhagem celular CHOdhfr- [ATCC No. CRL-9096]; e/ou

20 - ela tem uma atividade aumentada, a qual é pelo menos 10% maior do que a atividade de pelo menos uma composição de molécula proteica a partir da mesma molécula proteica quando expressa na linhagem celular CHOdhfr- [ATCC No. CRL-9096]; e/ou

25 - ela tem uma homogeneidade melhorada, a qual é uma homogeneidade de glicosilação melhorada em que a referida composição da molécula do anticorpo tem um grau de sialilação mais baixo do que o grau de sialilação de pelo menos uma composição de molécula de anticorpo a partir da mesma molécula de anticorpo quando expressa na linhagem celular CHOdhfr- [ATCC No. CRL-9096]; e/ou

30 - no caso da referida molécula proteica ser uma molécula de anticorpo, ela tem uma citotoxicidade celular mediada por Fc a qual é pelo menos duas vezes maior do que a citotoxicidade celular mediada por Fc de pelo menos uma composição da molécula de anticorpo a partir da mesma molécula de anticorpo quando expressa na linhagem celular CHOdhfr- [ATCC No. CRL-9096]; e/ou

 - no caso da referida molécula proteica ser uma molécula de anticorpo, ela tem uma ligação mediada por antígeno ou mediada por Fc au-

mentada, a qual é pelo menos 20%, preferivelmente 30 ou 50% maior do que a ligação de pelo menos uma composição da molécula de anticorpo a partir da mesma molécula de anticorpo quando expressa na linhagem celular CHOdhfr- [ATCC No. CRL-9096].

5 29. Proteína ou composição de molécula proteica, de acordo com pelo menos uma das reivindicações 26 a 28, em que a referida composição compreende pelo menos uma molécula de anticorpo, a ligação de um etitopo MUC1 compreendendo a sequência de aminoácidos DTR da região de repetição em tandem extracelular.

10 30. Proteína ou composição de molécula proteica, de acordo com a reivindicação 29, em que o referido anticorpo se liga ao etitopo TA-MUC1, compreendendo a sequência de aminoácidos DTR, em que o T é glicosilado.

15 31. Anticorpo ou composição de molécula de anticorpo, como definido na reivindicação 30, em que o referido anticorpo se liga ao etitopo glicosilado com uma afinidade maior do que o etitopo não-glicosilado ou não se liga ao etitopo não-glicosilado.

20 32. Anticorpo ou composição de molécula de anticorpo, de acordo com a reivindicação 30 ou 31, em que o referido anticorpo é selecionado dentre:

- o anticorpo PankoMab ou uma variante sua, se ligando competitivamente ao mesmo etitopo TA-MUC1 como PankoMab;
- o anticorpo Panko 1 ou uma variante sua, se ligando competitivamente ao mesmo etitopo TA-MUC1 como Panko 1;
- 25 - o anticorpo Panko 2 ou uma variante sua, se ligando competitivamente ao mesmo etitopo TA-MUC1 como Panko 2;

30 33. Anticorpo ou composição de molécula de anticorpo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 26 a 32, particularmente com a reivindicação 32, em que o referido anticorpo tem pelo menos uma das seguintes características de glicosilação:

- (a) ele tem um grau de sialilação aumentado com uma quantidade pelo menos 15% maior de ácido N-acetilneuramínico

- nas estruturas de carboidrato totais ou nas estruturas do carboidrato em um sítio de glicosilação particular da molécula de anticorpo das moléculas de anticorpo na referida composição da molécula de anticorpo do que a mesma quantidade das moléculas de anticorpo de pelo menos uma composição da molécula de anticorpo da mesma molécula de anticorpo isolada de CHOdhfr- [ATCC No. CRL-9096] quando ali expressa;
- 5
- (b) ela tem um grau de galactosilação com uma quantidade pelo menos 5% maior de estruturas G2 nas estruturas de carboidrato totais ou nas estruturas do carboidrato em um sítio de glicosilação particular da molécula de anticorpo das moléculas de anticorpo na referida composição da molécula de anticorpo do que a mesma quantidade das moléculas de anticorpo de pelo menos uma composição da molécula de anticorpo da mesma molécula de anticorpo isolada de CHOdhfr- [ATCC No. CRL-9096] quando ali expressa;
- 10
- 15
- (c) ela compreende bisecGlcNAc.
34. Anticorpo ou composição de moléculas de anticorpo, de acordo com uma das reivindicações 26 a 33, em particular com a reivindicação 33, em que o padrão de glicosilação resulta no seguinte padrão de atividade:
- 20
- (a) uma atividade CDC a qual é maior de 15% superior do que a atividade do mesmo anticorpo expresso em células CHO;
- 25
- (b) uma meia-vida soro a qual é maior por um fator de 2 em comparação com um anticorpo o qual possui um baixo ou nenhum grau de sialilação detectável;
- (c) ele tem uma citotoxicidade celular mediada por Fc aumentada a qual é pelo menos 2 vezes maior do que a citotoxicidade celular mediada por Fc de pelo menos uma composição de molécula de anticorpo a partir da mesma molécula de anticorpo quando expressa na linhagem celular CHOdh-
- 30

fr- [ATCC No. CRL-9096].

35. Anticorpo ou composição da molécula de anticorpo, de acordo com pelo menos uma das reivindicações 29 a 34, em que o referido anticorpo é selecionado a partir do seguinte grupo consistindo:

- 5 (a) no anticorpo PankoMab ou uma variante sua, com
 - (i) uma atividade ADCC aumentada a qual é pelo menos 2 ou pelo menos 4 vezes maior do que a atividade da composição da molécula do anticorpo a partir da mesma molécula de anticorpo expressa na linhagem celular CHOdhfr- [ATCC No. CRL-9096]; e/ou
 - 10 (ii) uma atividade CDC aumentada a qual é pelo menos 2 vezes maior do que a atividade da composição da molécula do anticorpo a partir da mesma molécula de anticorpo expressa na linhagem celular CHOdhfr- [ATCC No. CRL-9096]; e/ou
 - (iii) uma atividade de ligação de antígeno maior que é pelo
 - 15 menos 20%, preferivelmente 30% ou 40% maior do que a atividade da composição da molécula de anticorpo a partir da mesma molécula de anticorpo expressa na linhagem celular CHOdhfr- [ATCC No. CRL-9096]; e/ou
 - (iv) uma quantidade de estruturas G2 na estrutura de carboidrato total ou nas estruturas de carboidrato em um sítio de glicosilação particular da molécula de anticorpo das referidas moléculas de anticorpo na referida composição da molécula de anticorpo a qual é pelo menos 50% maior em comparação com a mesma quantidade de moléculas de anticorpo em pelo menos uma composição de molécula de anticorpo da mesma molécula de anticorpo isolada de CHOdhfr- [ATCC No. CRL-9096] quando ali expressa, e/ou
 - 25 (v) uma quantidade de estruturas bisectingGlcNAc nas estruturas de carboidratos totais ou nas estruturas de carboidratos em um sítio de glicosilação particular da molécula de proteína das referidas moléculas de anticorpo na referida composição da molécula de anticorpo a qual é pelo
 - 30 menos 20% maior em comparação com a mesma quantidade das moléculas de anticorpo em pelo menos uma composição da molécula de anticorpo da mesma molécula de anticorpo isolada de CHOdhfr- [ATCC No. CRL-9096]

quando ali expressa,

em que a referida composição da molécula PankoMab é obtenível com um rendimento superior pela sua produção na célula hospedeira NM-F9 em comparação com uma composição da molécula PankoMab isolada de CHOdhfr- [ATCC No. CRL-9096] quando ali expressa;

5 da de CHOdhfr- [ATCC No. CRL-9096] quando ali expressa;

(b) o anticorpo PankoMab ou uma variante sua, com

(i) uma atividade ADCC aumentada a qual é pelo menos 3 vezes maior do que a atividade da composição da molécula do anticorpo a partir da mesma molécula de anticorpo expressa na linhagem celular CHOdhfr- [ATCC No. CRL-9096]; e/ou

10 dhfr- [ATCC No. CRL-9096]; e/ou

(ii) uma atividade CDC aumentada a qual é pelo menos 20%, preferivelmente 30% ou 40% maior do que a atividade da composição da molécula de anticorpo a partir da mesma molécula de anticorpo expressa na linhagem celular CHOdhfr- [ATCC No. CRL-9096]; e/ou

15 (iii) 2-6 NeuNAc detectável, e/ou

(iv) uma meia-vida do soro a qual é preferivelmente pelo menos mais 1,5 vezes prolongada em comparação com uma composição da molécula do anticorpo da mesma molécula de anticorpo isolada de NM-F9 quando ali expressa; e/ou

20 (v) uma quantidade de estruturas G2 na estrutura de carboidrato total ou nas estruturas de carboidrato em um sítio de glicosilação particular da molécula de anticorpo das referidas moléculas de anticorpo na referida composição da molécula de anticorpo a qual é pelo menos 50% maior em comparação com a mesma quantidade de moléculas de anticorpo em pelo menos uma composição de molécula de anticorpo da mesma molécula de anticorpo isolada de CHOdhfr- [ATCC No. CRL-9096] quando ali expressa, e/ou

25 (vi) uma quantidade de estruturas bisectingGlcNAc nas estruturas de carboidrato total ou nas estruturas de carboidratos em um sítio de glicosilação particular da molécula de proteína das referidas moléculas de anticorpo na referida composição da molécula de anticorpo a qual é pelo menos 20% maior em comparação com a mesma quantidade das moléculas de an-

30

ticorpo em pelo menos uma composição da molécula de anticorpo da mesma molécula de anticorpo isolada de CHOdhfr- [ATCC No. CRL-9096] quando ali expressa,

5 em que a referida composição da molécula PankoMab é obtenível com um rendimento superior pela sua produção na célula hospedeira NM-H9D8 em comparação com uma composição da molécula PankoMab isolada de CHOdhfr- [ATCC No. CRL-9096] quando ali expressa;

(c) o anticorpo Panko 2 ou uma variante sua, com
(i) uma atividade ADCC aumentada a qual é pelo menos 4
10 vezes maior do que a atividade da composição da molécula do anticorpo a partir da mesma molécula de anticorpo expressa na linhagem celular CHOdhfr- [ATCC No. CRL-9096]; e/ou

(ii) 2-6 NeuNAc detectável, e/ou
(iii) uma atividade de ligação a antígeno maior que é pelo menos 30%, preferivelmente 40% ou 50% maior do que a atividade da composição da molécula de anticorpo a partir da mesma molécula de anticorpo expressa na linhagem celular CHOdhfr- [ATCC No. CRL-9096];
15

em que a referida composição da molécula Panko 2 é obtenível pela sua produção na célula hospedeira NM-H9D8;

20 (d) o anticorpo Panko 2 ou uma variante sua, com
(i) uma atividade ADCC aumentada a qual é pelo menos 4 vezes maior do que a atividade da composição da molécula do anticorpo a partir da mesma molécula de anticorpo expressa na linhagem celular CHOdhfr- [ATCC No. CRL-9096]; e/ou

25 (ii) uma atividade de ligação a antígeno maior que é pelo menos 30%, preferivelmente 40% ou 50% maior do que a atividade da composição da molécula de anticorpo a partir da mesma molécula de anticorpo expressa na linhagem celular CHOdhfr- [ATCC No. CRL-9096];

em que a referida composição da molécula Panko 2 é obtenível
30 pela sua produção na célula hospedeira GT-2x;

(e) o anticorpo Panko ou uma variante sua, com
(i) uma atividade ADCC aumentada a qual é pelo menos 8

vezes maior do que a atividade da composição da molécula do anticorpo a partir da mesma molécula de anticorpo expressa na linhagem celular CHOdhfr- [ATCC No. CRL-9096]; e/ou

5 (ii) uma quantidade de estruturas G2 na estrutura de carboidrato total ou nas estruturas de carboidrato em um sítio de glicosilação particular da molécula de anticorpo das referidas moléculas de anticorpo na referida composição da molécula de anticorpo a qual é pelo menos 50% maior em comparação com a mesma quantidade de moléculas de anticorpo em pelo menos uma composição de molécula de anticorpo da mesma molécula de anticorpo isolada de CHOdhfr- [ATCC No. CRL-9096] quando ali expressa, e/ou

15 (iii) uma quantidade maior de estruturas não-fucosiladas na estrutura de carboidrato total ou nas estruturas de carboidrato em um sítio de glicosilação particular da molécula de anticorpo das referidas moléculas de anticorpo na referida composição da molécula de anticorpo a qual é pelo menos 70% maior em comparação com a mesma quantidade de moléculas de anticorpo em pelo menos uma composição de molécula de anticorpo da mesma molécula de anticorpo isolada de CHOdhfr- [ATCC No. CRL-9096] quando ali expressa;

20 em que a referida composição da molécula Panko 1 é obténível pela sua produção na célula hospedeira NM-H9D8-E6;

f) o anticorpo Panko 1 ou uma variante sua, com

25 (i) uma atividade ADCC aumentada a qual é pelo menos 50% maior do que a atividade da composição da molécula do anticorpo a partir da mesma molécula de anticorpo expressa na linhagem celular CHOdhfr- [ATCC No. CRL-9096]; e/ou

30 (ii) uma quantidade de estruturas G2 na estrutura de carboidrato total ou nas estruturas de carboidrato em um sítio de glicosilação particular da molécula de anticorpo das referidas moléculas de anticorpo na referida composição da molécula de anticorpo a qual é pelo menos 50% maior em comparação com a mesma quantidade de moléculas de anticorpo em pelo menos uma composição de molécula de anticorpo da mesma molécula

de anticorpo isolada de CHOdhfr- [ATCC No. CRL-9096] quando ali expressa, e/ou

- (iii) uma ~~quantidade~~ maior de estruturas não-fucosiladas na estrutura de carboidrato ~~total ou nas~~ estruturas de carboidrato em um sítio de glicosilação particular da molécula de anticorpo das referidas moléculas de anticorpo na referida ~~composição~~ da molécula de anticorpo a qual é pelo menos 50% maior em ~~comparação~~ com a mesma quantidade de moléculas de anticorpo em pelo menos uma composição de molécula de anticorpo da mesma molécula de ~~anticorpo~~ isolada de CHOdhfr- [ATCC No. CRL-9096] quando ali expressa;

em que a referida composição da molécula Panko 1 é obtível pela sua produção na célula hospedeira NM-H9D8;

36. Anticorpo, de acordo com pelo menos uma das reivindicações 26 a 34, o qual ~~é~~ anticorpo cetuximab ou uma variante sua, que se liga ao mesmo epitopo ~~que~~ cetuximab.

37. Proteína, de acordo com pelo menos uma das reivindicações 26 a 30, em que a referida proteína é FSH.

38. Proteína, de acordo com a reivindicação 37, em que a referida FSH compreende ~~flu~~NAc ligado 2-6 detectável.

39. Célula ~~sanguínea~~ humana imortalizada, a qual é preferivelmente uma célula hospedeira de origem leucêmica mieloide humana para produzir uma proteína e particularmente uma composição de anticorpo como definidas em pelo menos uma das reivindicações 26 a 38, compreendendo pelo menos um ácido nucleico codificando uma molécula de proteína ou pelo menos uma parte da mesma num vetor de expressão apropriado.

40. Célula hospedeira, de acordo com a reivindicação 39, compreendendo pelo menos um ácido nucleico codificando uma molécula proteica ou pelo menos uma parte da mesma, e pelo menos um ácido nucleico compreendendo pelo menos uma sequência de ácido nucleico codificando pelo menos um polipeptídeo do grupo de sequência N° 1 até a sequência N° 9.

41. Célula hospedeira, de acordo com a reivindicação 39 ou 36,

em que a célula hospedeira é K562, NM-F9 [DSM ACC2606], NM-D4 [DSM ACC2605], NM-H9, H9, NM-H10, NM-E-2F9, NM-C-2F5, NM-H9D8, ou NM-H9D8-E6, ou uma célula ou linhagem celular derivada de qualquer uma das referidas células hospedeiras, compreendendo pelo menos um ácido nucleico codificando uma molécula de proteína ou pelo menos uma parte da mesma, e pelo menos um ácido nucleico compreendendo pelo menos uma sequência de ácido nucleico codificando pelo menos um polipeptídeo do grupo de sequência Nº 1 até a sequência Nº 9.

42. Célula hospedeira, de acordo com pelo menos uma das reivindicações 39 a 41, compreendendo pelo menos um ácido nucleico como definido na reivindicação 41 ou 42.

43. Célula hospedeira, de acordo com qualquer uma das reivindicações 39 a 42, em que a molécula de anticorpo codificada é um anticorpo como definido nas reivindicações 31 a 36.

44. Célula hospedeira, de acordo com qualquer uma das reivindicações 39 a 43, em que a molécula de anticorpo codificada é um anticorpo quimérico ou humanizado, particularmente PankoMab, Panko 1, Panko 2 ou Cetuximab, ou uma variante sua, se ligando ao mesmo etitopo.

45. Célula hospedeira, de acordo com qualquer uma das reivindicações 39 a 44, a qual cresce e produz a composição da molécula de anticorpo sob condições sem-soro.

46. Ácido nucleico compreendendo

- (a) uma sequência codificando uma molécula de proteína ou pelo menos uma parte da mesma, e
- (b) pelo menos uma sequência codificando uma sequência do grupo de sequência Nº 1 até a sequência Nº 9.

47. Ácido nucleico compreendendo

- (a) uma sequência codificando uma molécula de proteína ou pelo menos uma parte da mesma, e
- (b) pelo menos uma sequência codificando uma sequência do grupo de sequência Nº 1.

Fig. 1

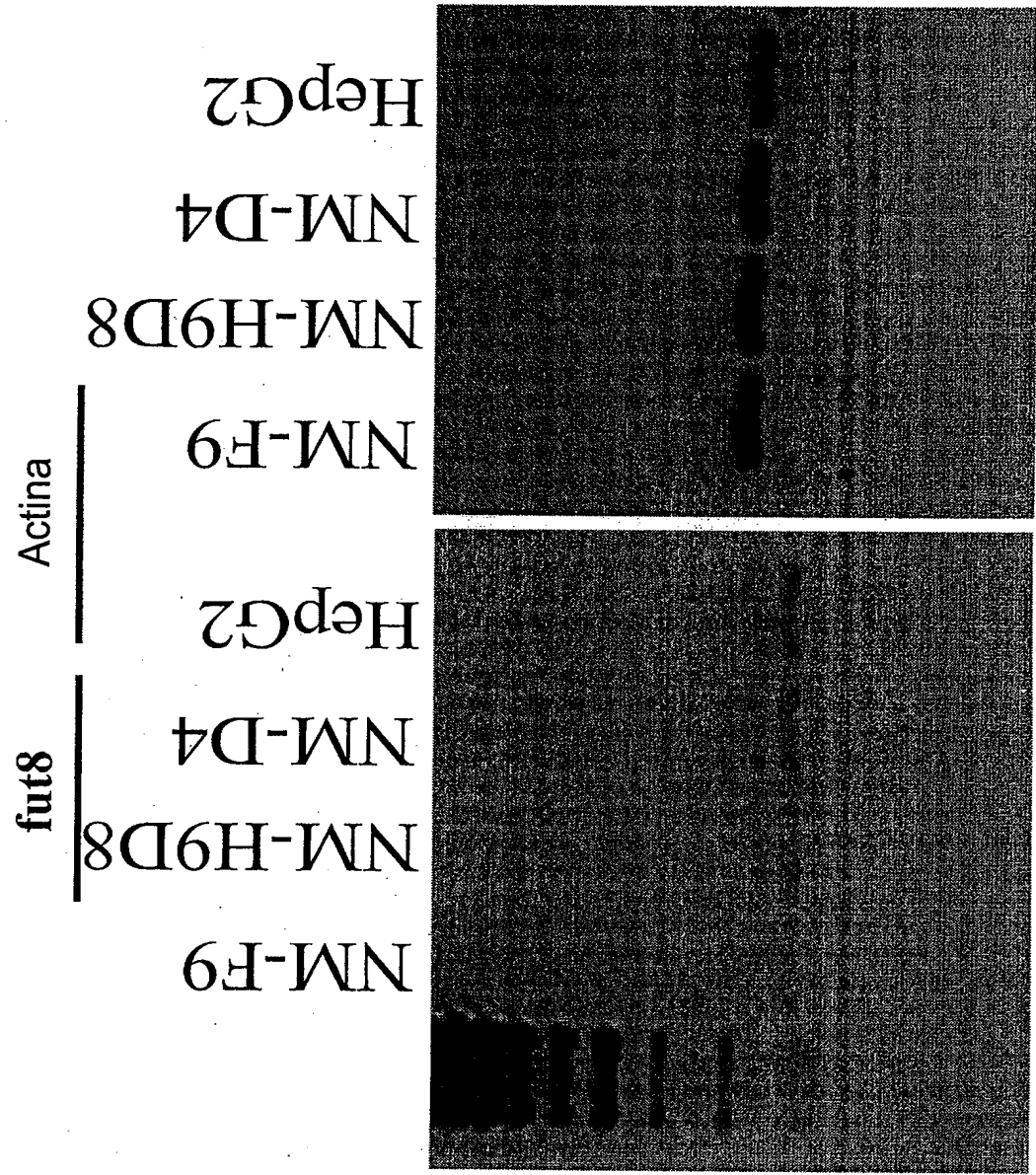
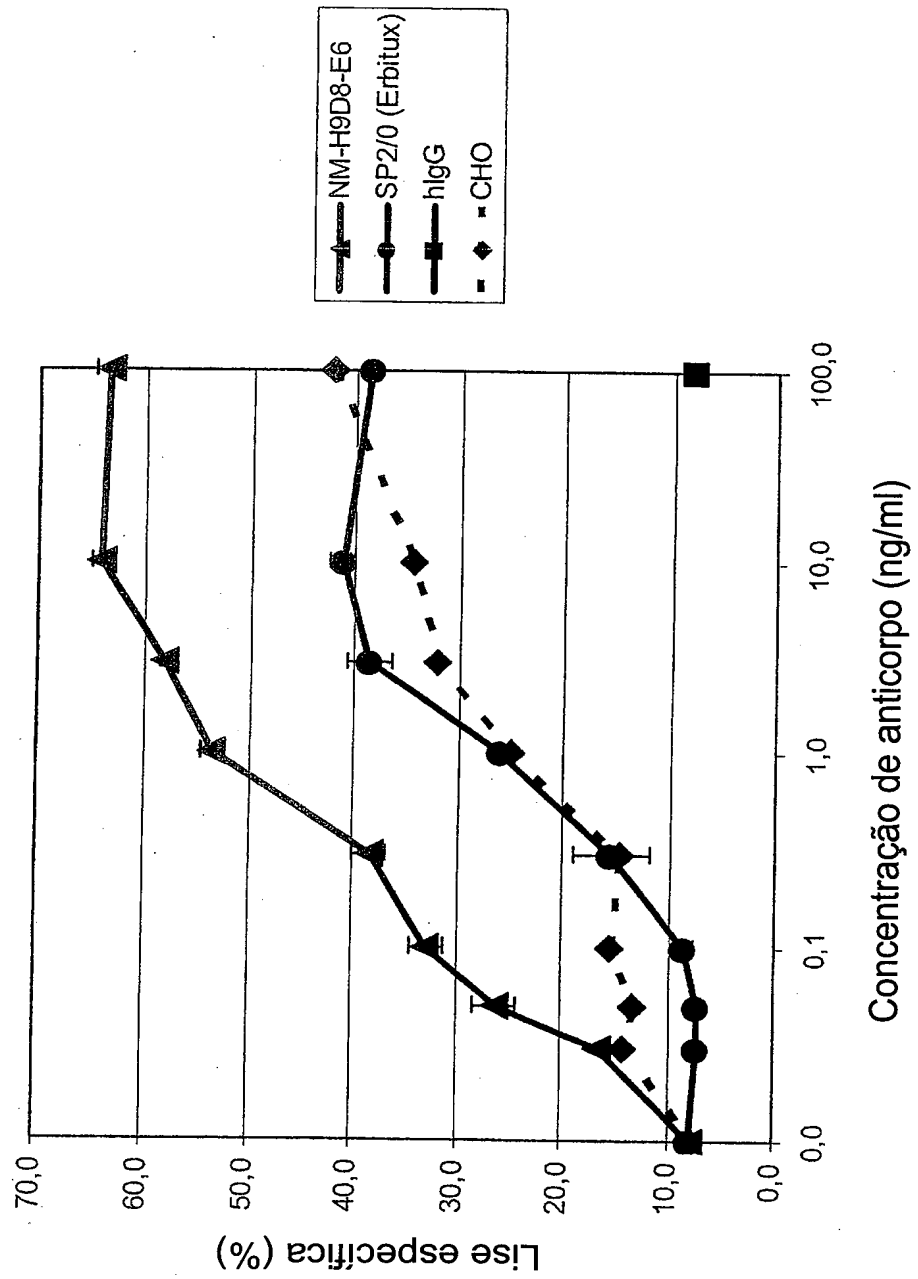
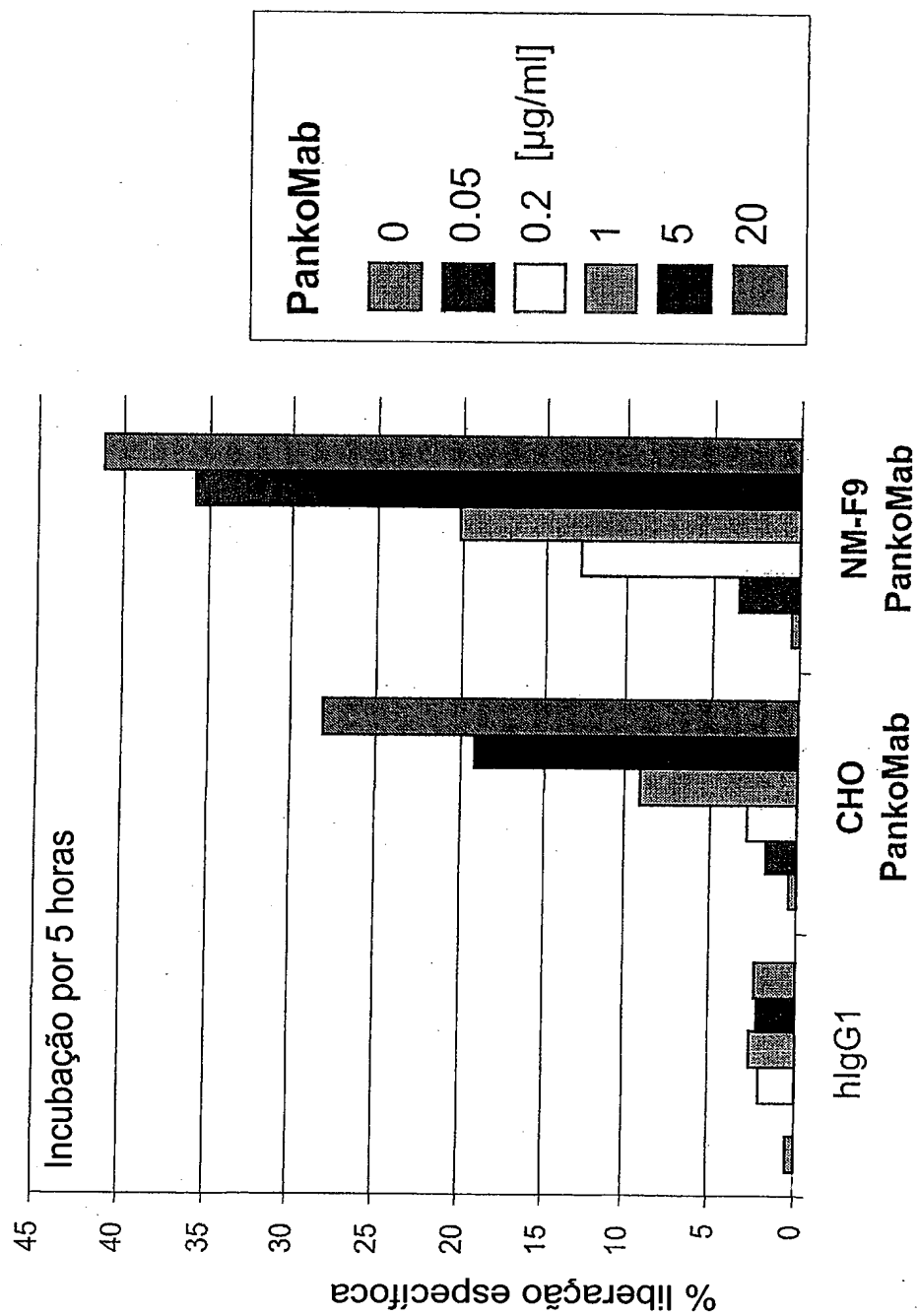


Fig. 2



3
60
11



Lise mediada por ADCC de células tumorais carregadas com Eu3+; razão célula alvo/efetora (ZR75-1/PBMC) 1:100

Fig. 4

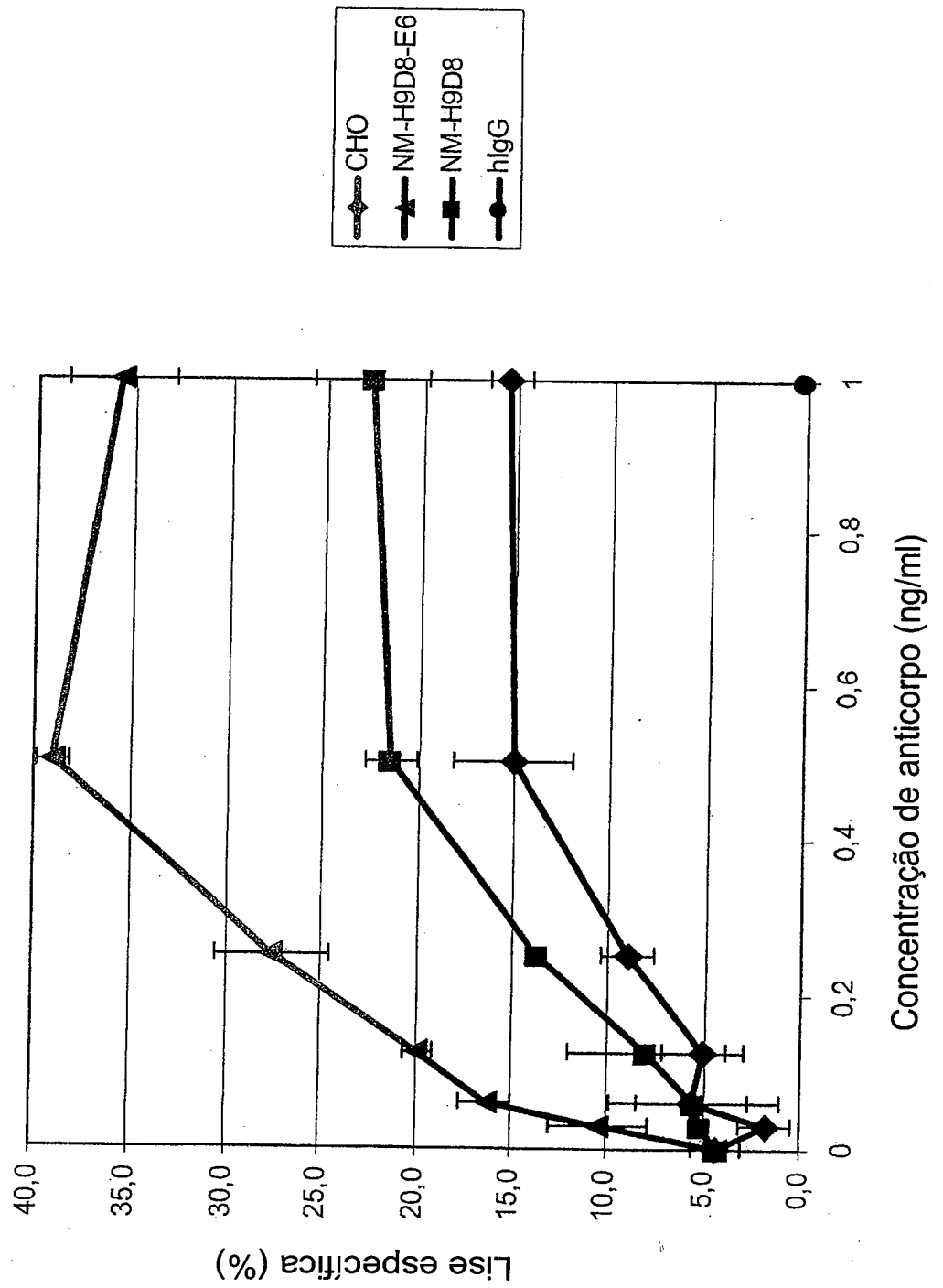


Fig. 5

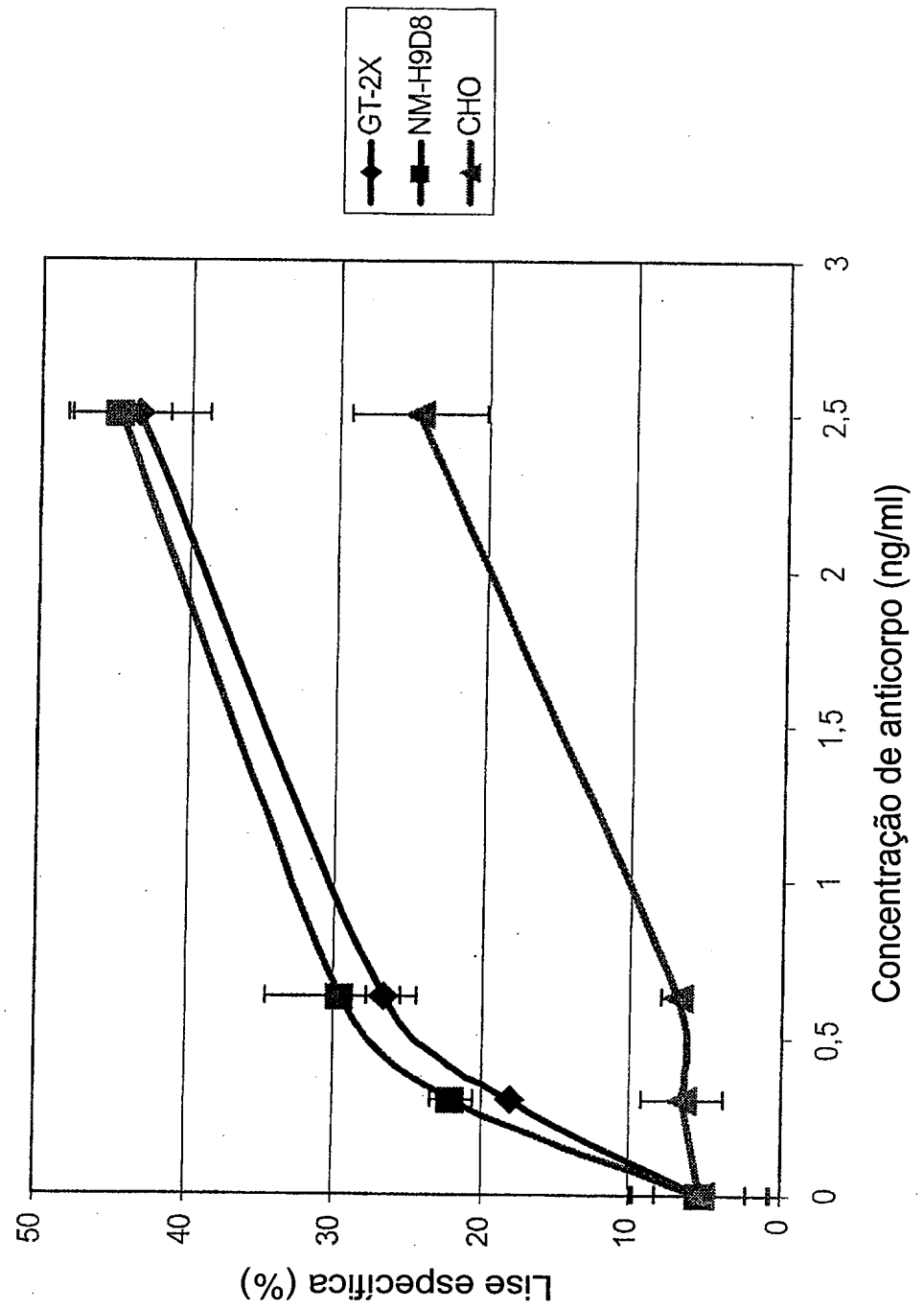


Fig. 6

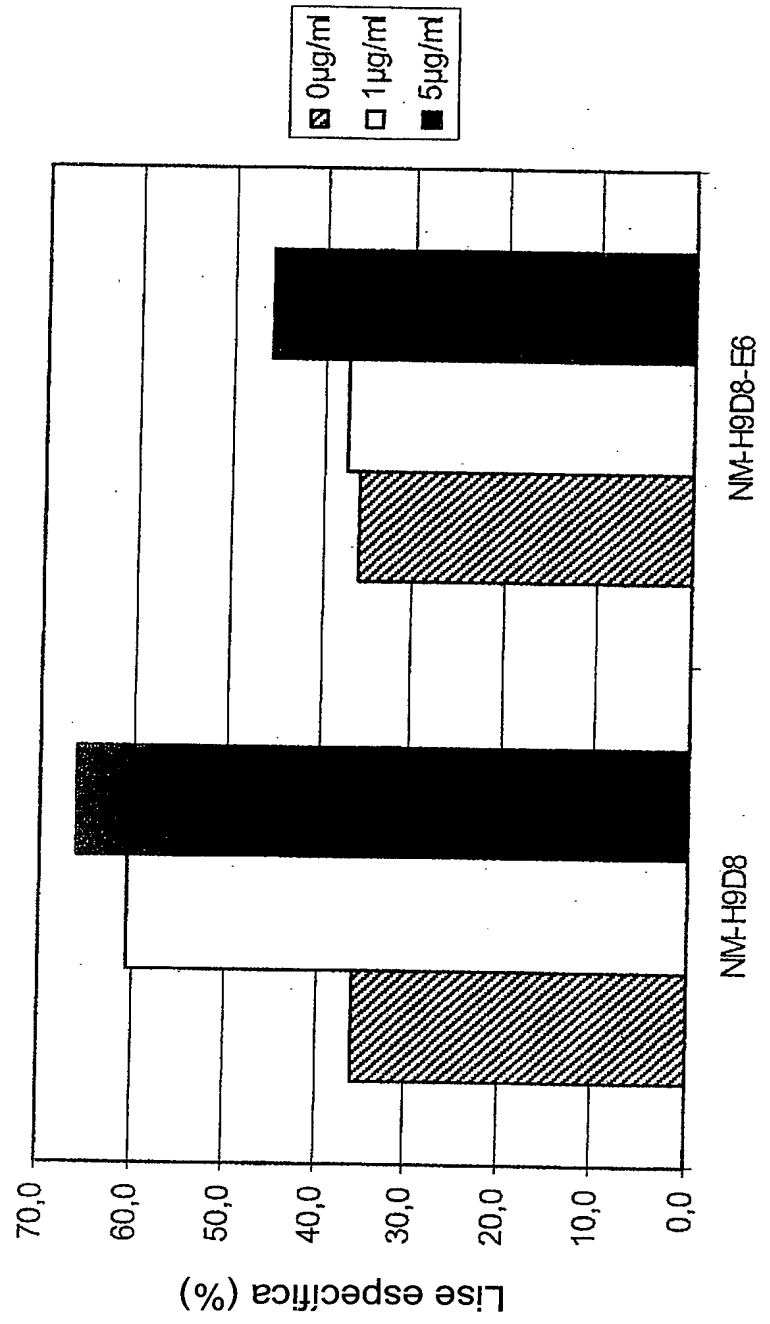


Fig. 7

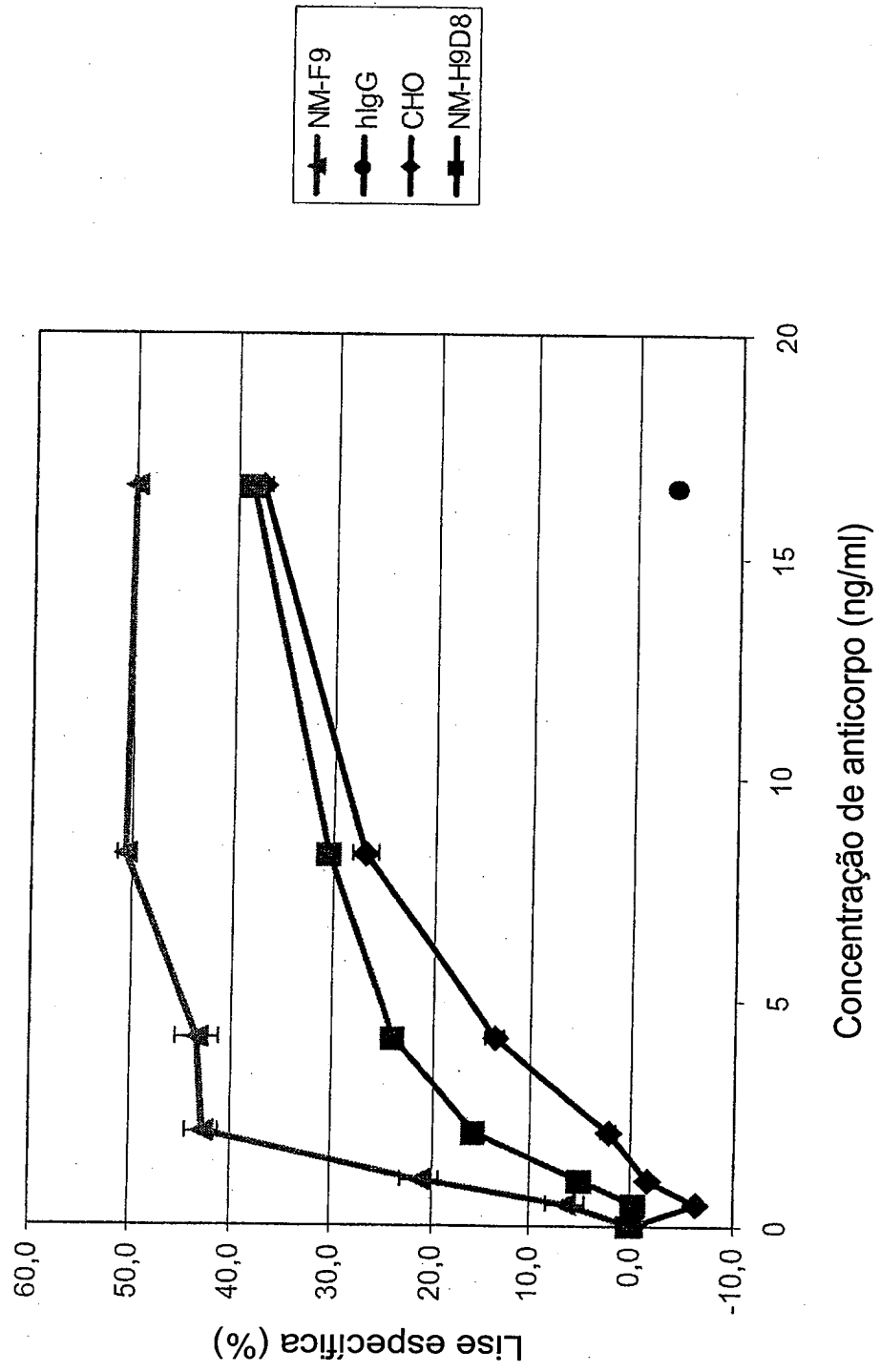


Fig. 8

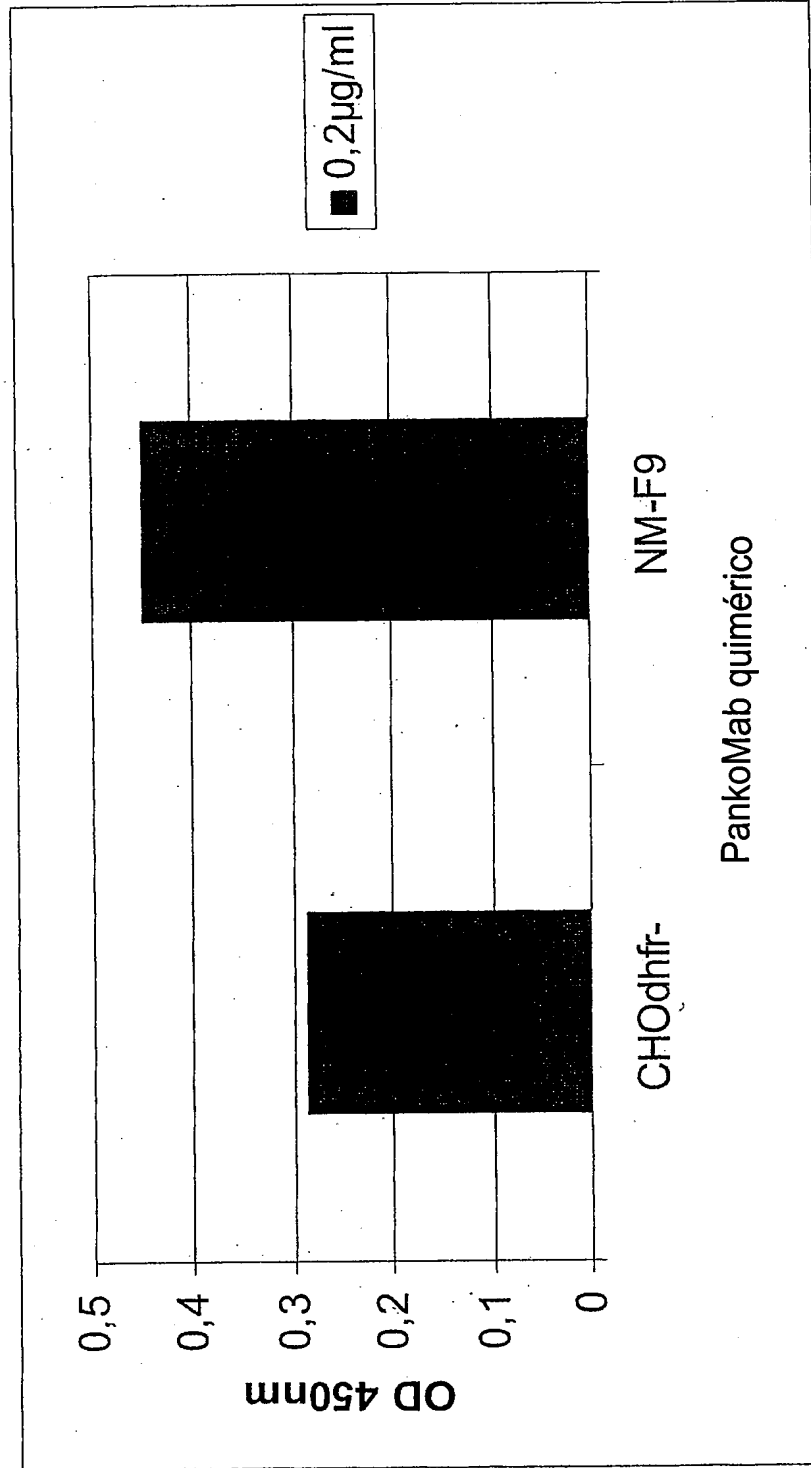


Fig. 9

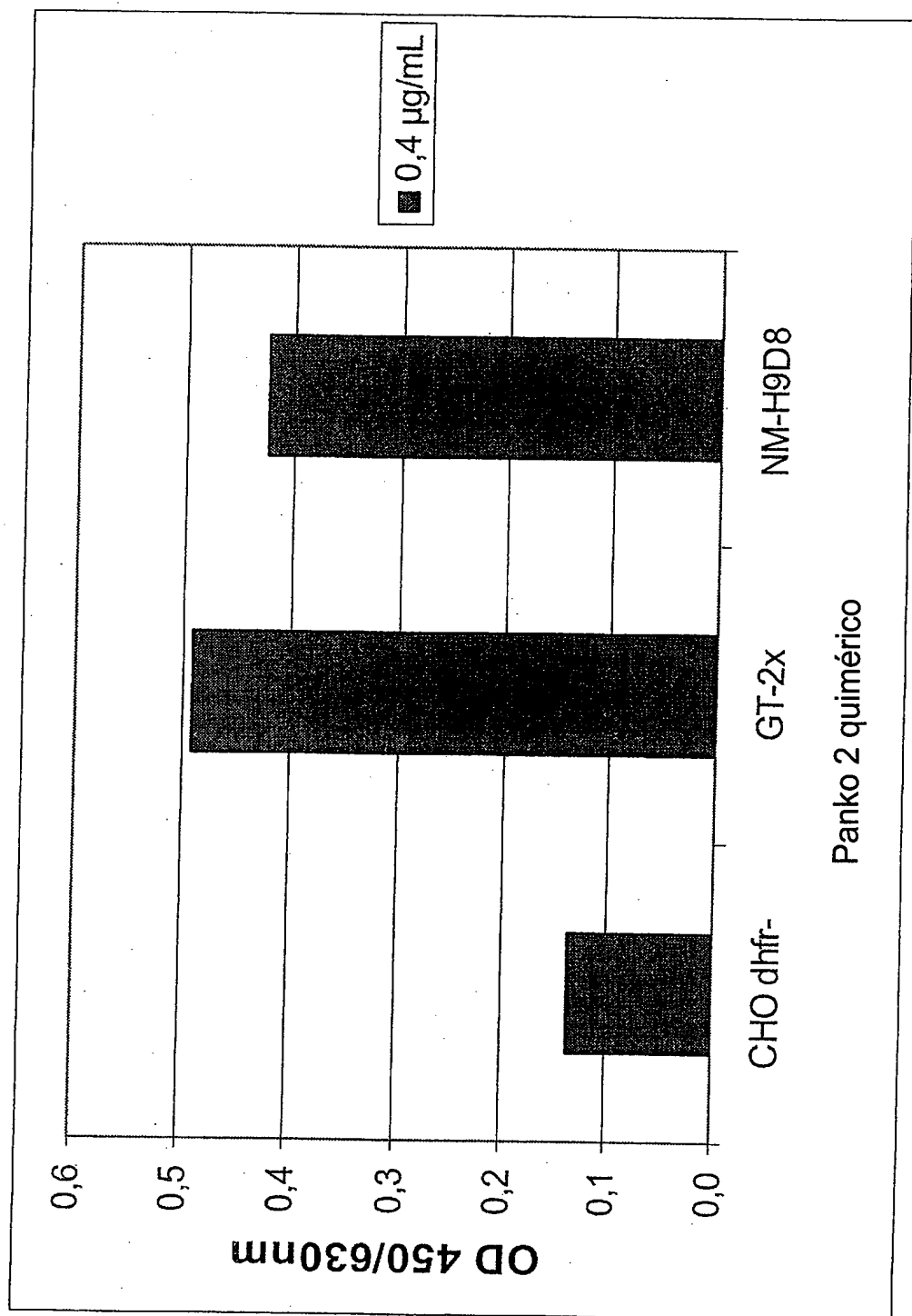


Fig. 10

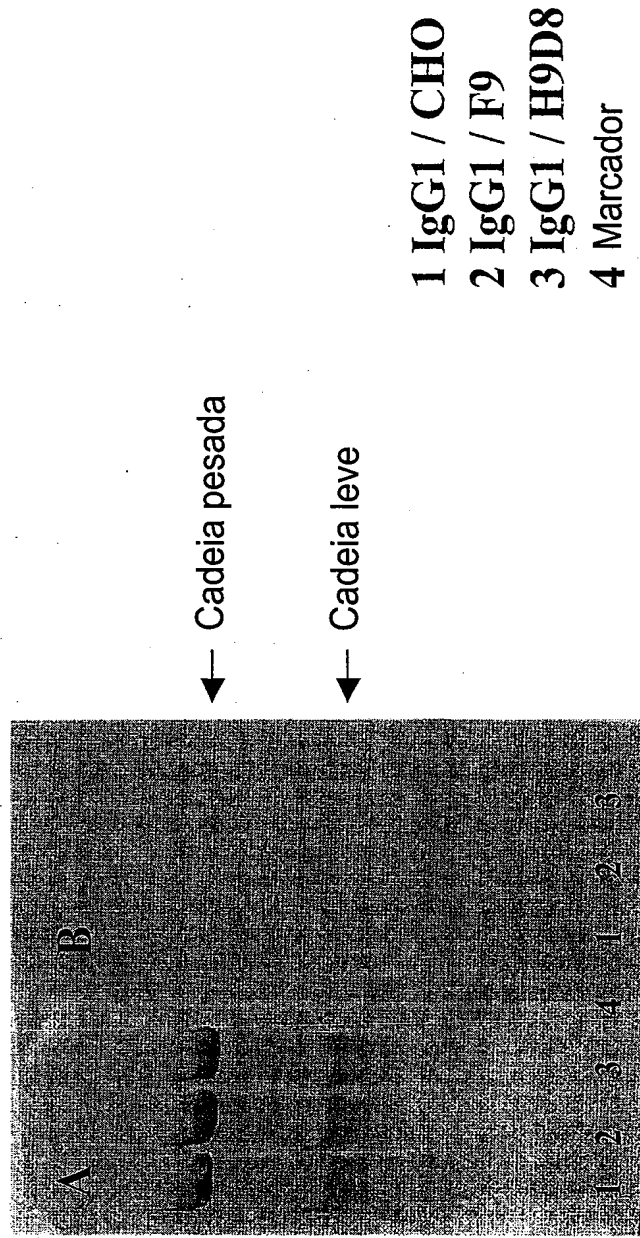


Fig. 11

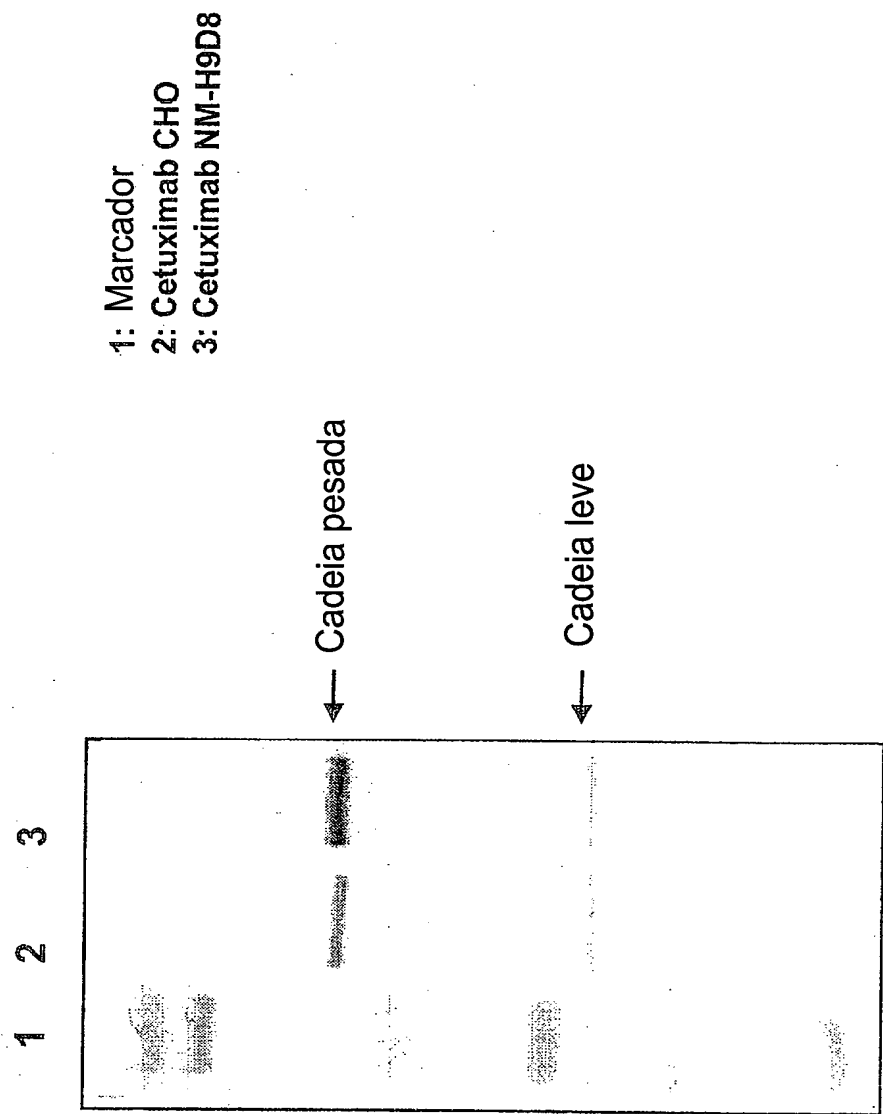


Fig. 12

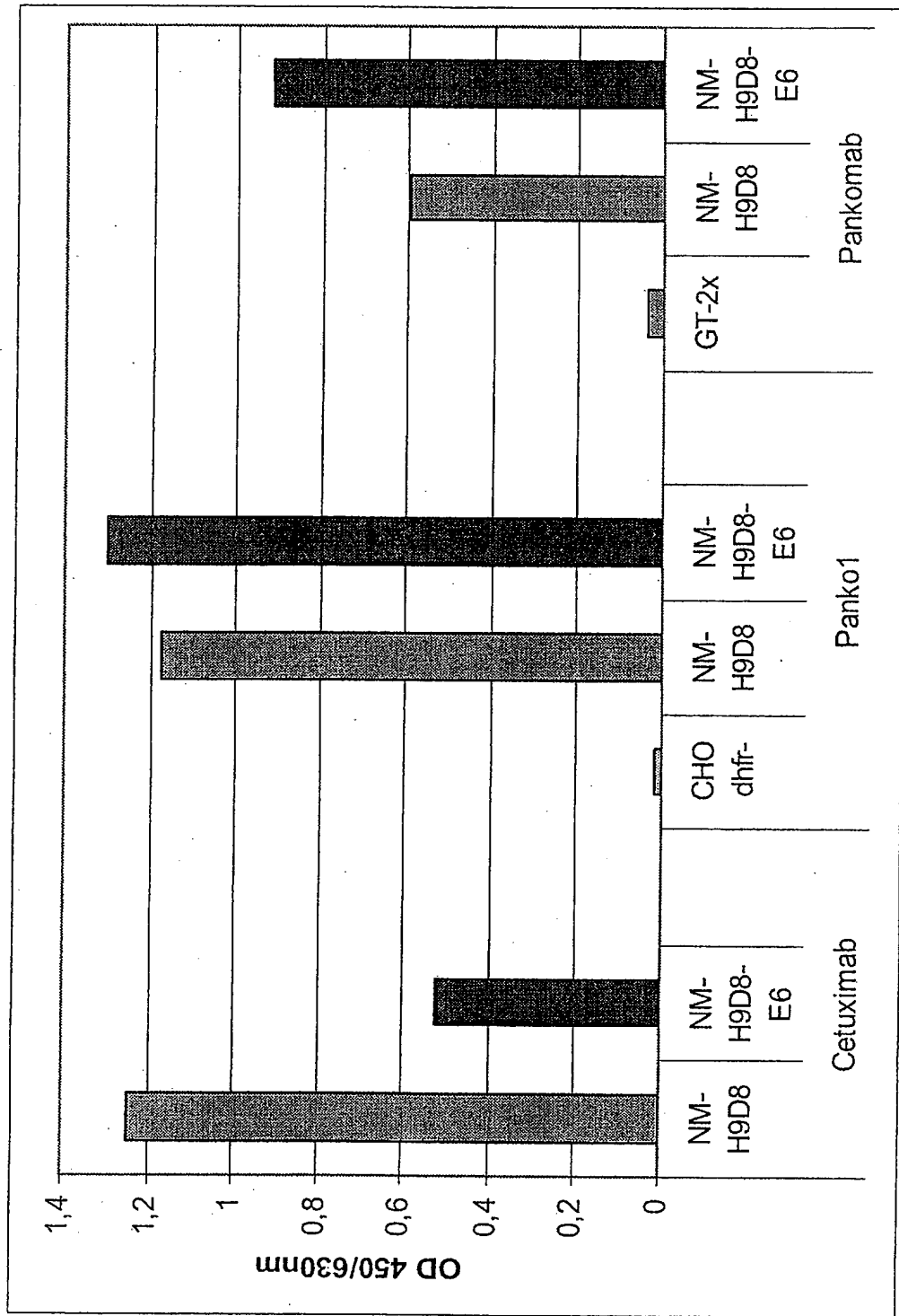


Fig. 13a

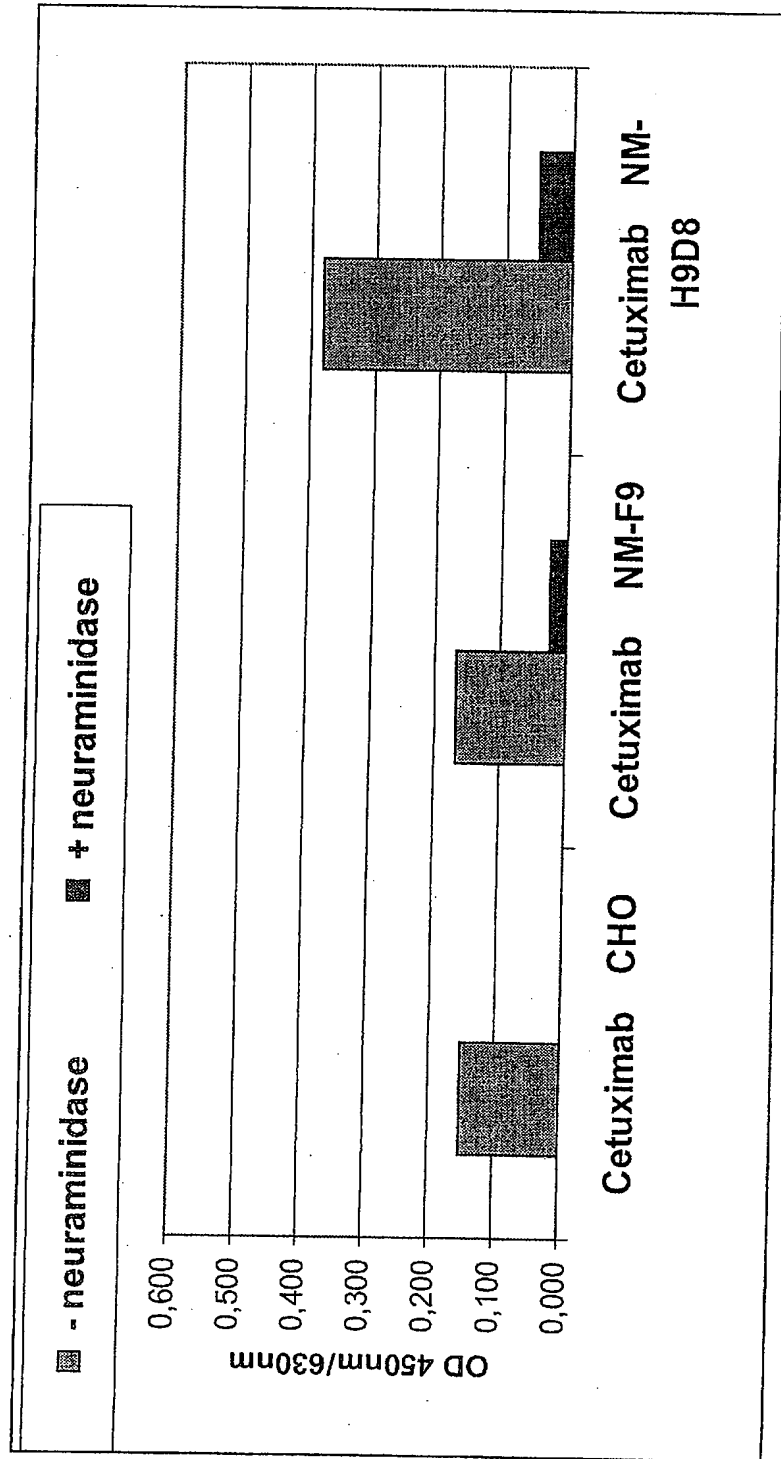


Fig. 13b

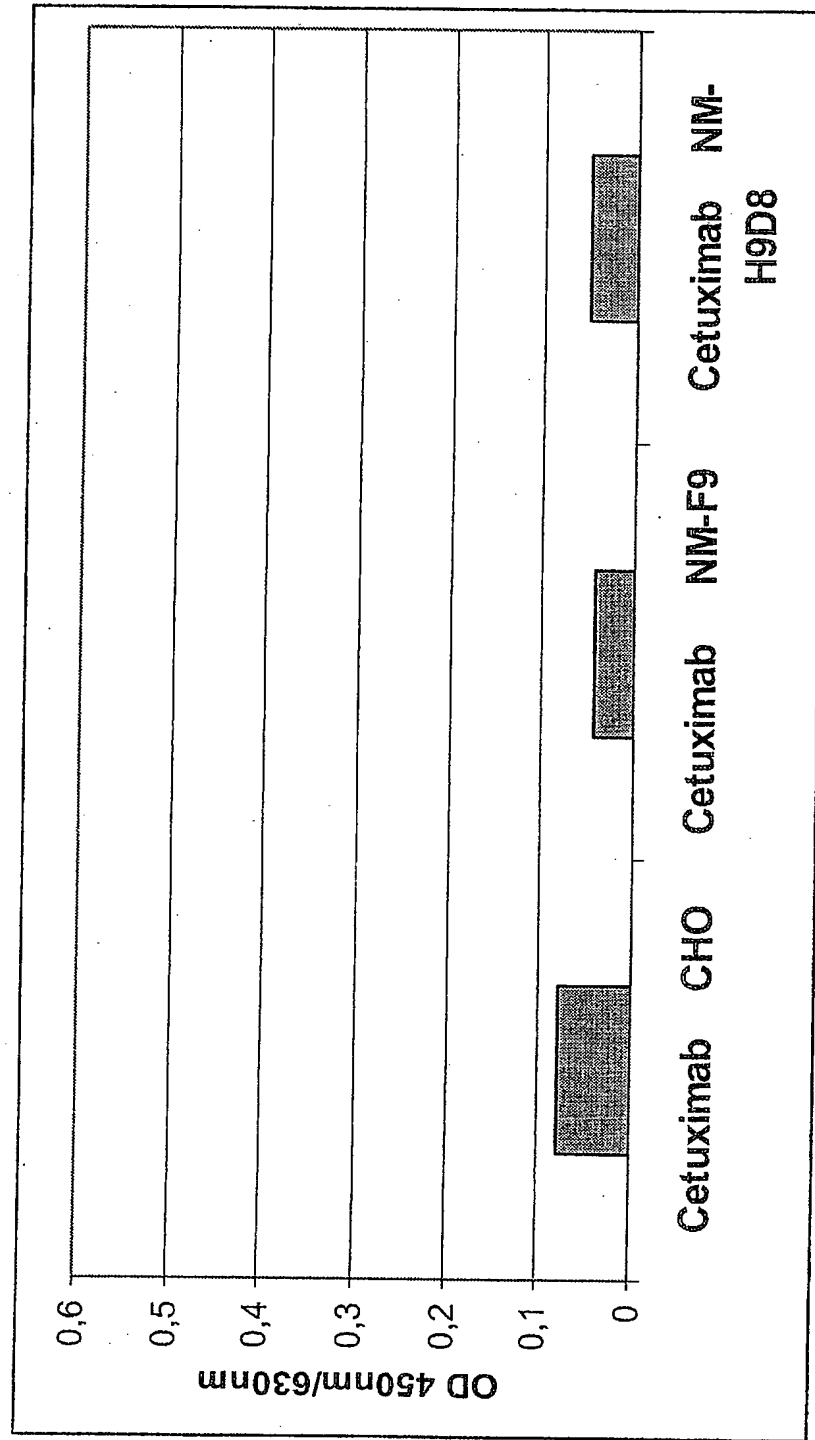


Fig. 14

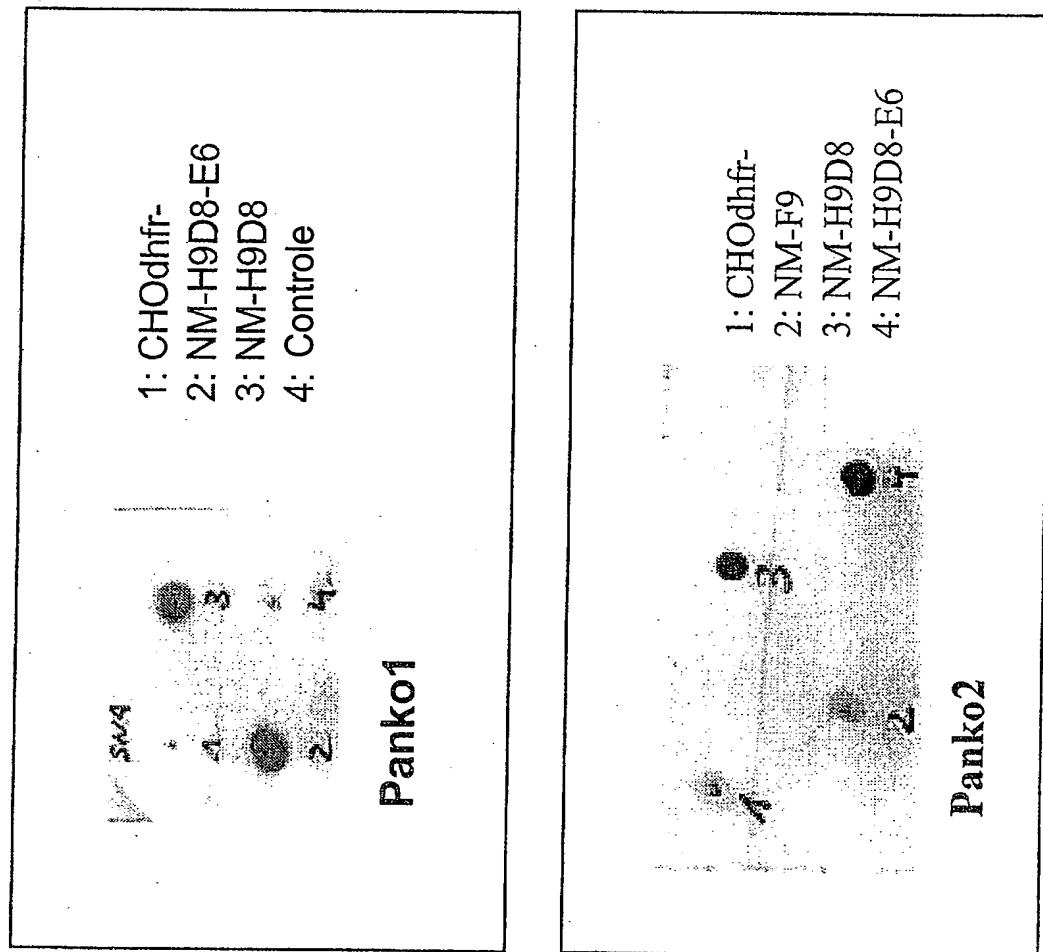


Fig. 15

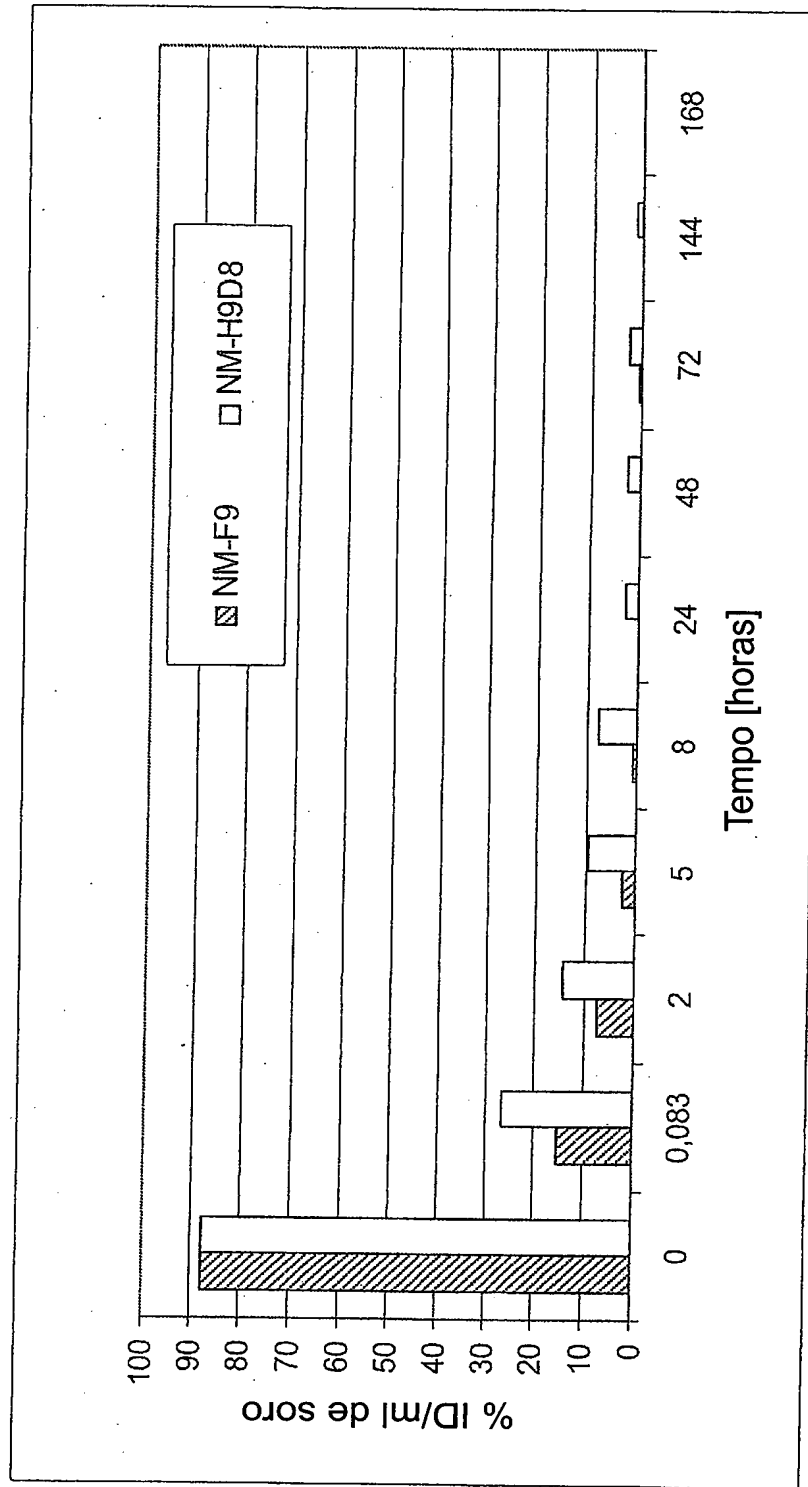


Fig. 16

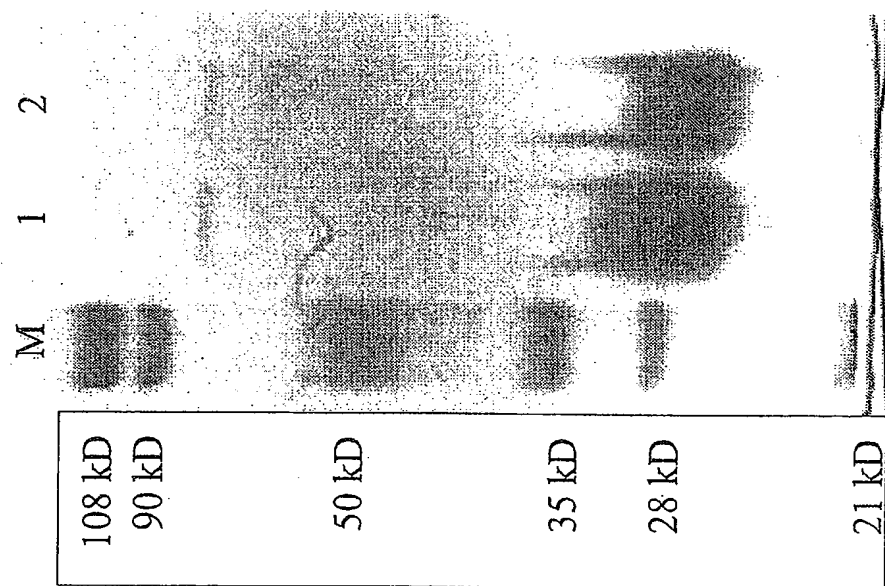


Fig. 17

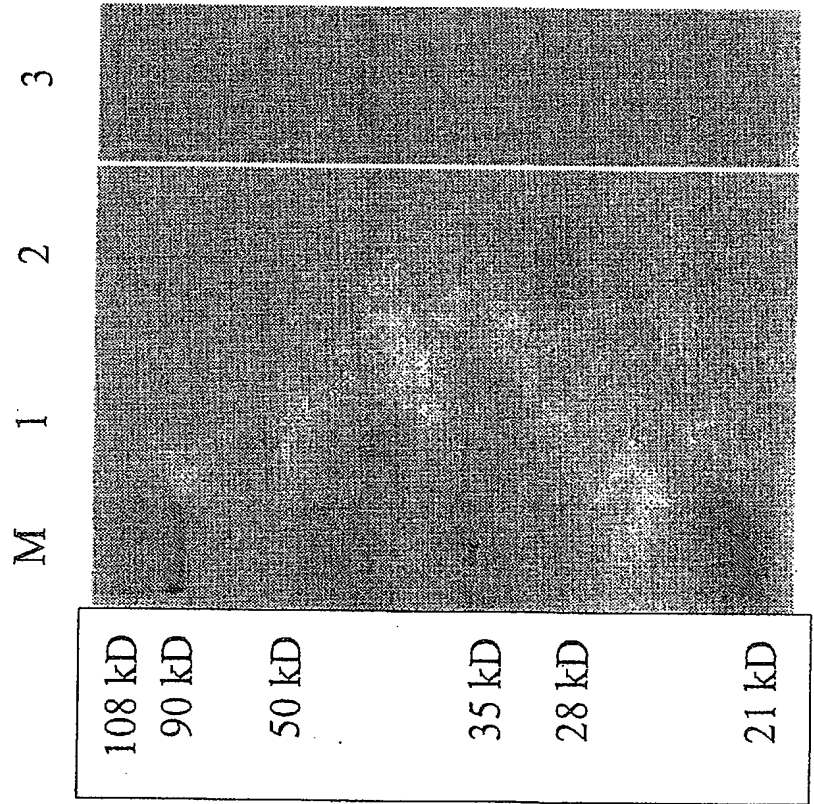
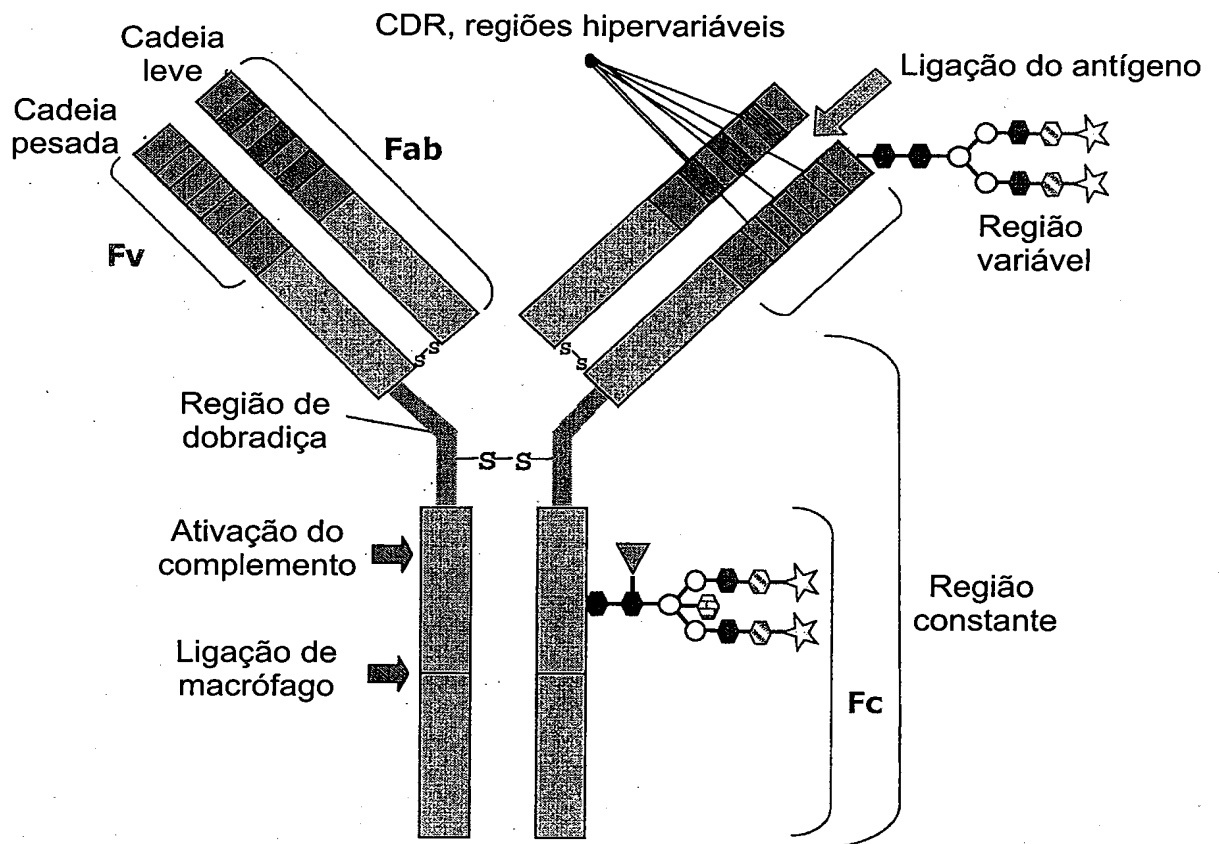


Fig. 18



☆	= Ácido siálico
▨	= Galactose
●	= GlcNAc
○	= Manose
▼	= Fucose
⬢	= GlcNAc biseccionante

RESUMO

Patente de Invenção: **SISTEMA DE PRODUÇÃO TOTALMENTE HUMANO DE RENDIMENTO ELEVADO PARA PROTEÍNAS E ANTICORPOS MELHORADOS".**

- 5 A presente invenção refere-se a um método para a produção de uma composição de molécula proteica com um padrão de glicosilação definido, compreendendo: a) a introdução numa célula hospedeira, a qual é uma célula sanguínea humana imortalizada, de pelo menos um ácido nucleico codificando pelo menos uma parte da referida proteína; e b) o cultivo da referida célula hospedeira sob condições as quais permitem a produção da referida composição da molécula proteica; e c) o isolamento da referida composição de molécula proteica.
- 10