



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

(21) BR 112020019559-6 A2



(22) Data do Depósito: 26/03/2019

(43) Data da Publicação Nacional: 12/01/2021

(54) Título: GLICOFORMAS AFUCOSILADAS TOTAIS DE ANTICORPOS PRODUZIDOS EM CULTURA DE CÉLULAS

(51) Int. Cl.: C12P 21/00; C12P 21/02; C12N 5/00; C07K 16/00.

(30) Prioridade Unionista: 26/03/2018 US 62/648,308.

(71) Depositante(es): AMGEN INC..

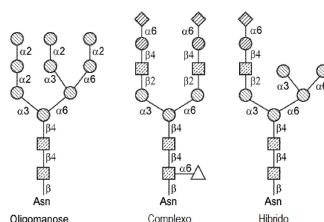
(72) Inventor(es): PRINCE BHEBE; MATTHEW JERUMS; IRENE LIU; KURT KUNAS.

(86) Pedido PCT: PCT US2019024154 de 26/03/2019

(87) Publicação PCT: WO 2019/191150 de 03/10/2019

(85) Data da Fase Nacional: 25/09/2020

(57) Resumo: São proporcionados aqui métodos de produção de uma composição de anticorpo compreendendo um nível desejado ou predeterminado ou pré-selecionado de glicoformas afucosiladas totais (TAF). Em modalidades exemplificativas, o método compreende manter células competentes para glicosilação em um meio de cultura de células compreendendo fucose e/ou glicose a uma concentração específica como descrito aqui, dependendo do nível de glicoformas TAF desejado. Composições relacionadas compreendendo proteínas glicosiladas e suas glicoformas TAF também são proporcionadas aqui. Também são proporcionados meios de cultura de células.



Representações Simbólicas de Monossacarídeos e Ligações Comuns

|                                  |                                       |
|----------------------------------|---------------------------------------|
| ● Galactose (Gal)                | ☆ Xilose (Xyl)                        |
| ■ N-Acetilgalactosamina (GalNAc) | ◆ N-Acetilneuramínico (Neu5Ac)        |
| □ Galactosamina (GalN)           | ◇ Ácido N-acetilneuramínico (Neu5Glc) |
| ○ Glicose (Glc)                  | ◇ Ácido 2-ceto-3-desoxononóico (Kdn)  |
| ■ N-Acetilglucosamina (GlcNAc)   | △ Fucose (Fuc)                        |
| □ Glucosamina (GlcN)             | ◇ Ácido alúronico (GlcA)              |
| ○ Manose (Man)                   | ◇ Ácido idurônico (IdoA)              |
| ■ N-Acetilmanosamina (ManNAc)    | ◇ Ácido galacturônico (GalA)          |
| □ Manosamina (ManN)              | ◇ Ácido manurônico (ManA)             |

Outros Monossacarídeos

Usar designação de letra dentro de símbolo para especificar, se necessário. ○ A

## GLICOFORMAS AFUCOSILADAS TOTAIS DE ANTICORPOS PRODUZIDOS EM CULTURA DE CÉLULAS

### REFERÊNCIA CRUZADA A PEDIDOS RELACIONADOS

[0001] Este pedido reivindica prioridade para o Pedido de Patente Provisória U.S. Nº 62/648,308, registrado em 26 de março de 2018. O conteúdo de cada pedido é incorporado aqui por referência.

### INCORPORAÇÃO POR REFERÊNCIA DE MATERIAL SUBMETIDO ELETRONICAMENTE

[0002] É incorporada por referência na sua totalidade uma listagem de sequências de nucleotídeos/aminoácidos legível por computador submetida simultaneamente aqui e identificada como se segue: Ficheiro ASCII (Texto) com 28 547 *bytes* intitulado "52249A\_Seqlisting.txt"; criado em 26 de março, 2019.

### ANTECEDENTES

[0003] A glicosilação é uma das modificações pós-tradução mais comuns, mas importante, pois desempenha um papel em muitas funções celulares, incluindo, por exemplo, dobramento de proteínas, controle de qualidade, tráfego e triagem moleculares, e interação com receptores da superfície celular. A glicosilação afeta a eficácia terapêutica de fármacos de proteínas recombinantes, pois influencia a bioatividade, farmacocinética, imunogenicidade, solubilidade, e eliminação *in vivo* de uma glicoproteína terapêutica. Os perfis de glicofórmos de Fc, em particular, são atributos importantes da qualidade do produto para anticorpos recombinantes, pois têm um impacto

direto na eficácia clínica e farmacocinética dos anticorpos.

**[0004]** Se verificou que o teor da glicoformas ricas em manose (HM) afeta propriedades farmacocinéticas de certos anticorpos terapêuticos (Goetze, *et al.*, (2011) *Glycobiology* 21, 949-59; Yu, *et al.*, (2012) *MAbs* 4, 475-87). As glicoformas HM não só influenciam a taxa de eliminação do soro dos anticorpos, mas tais glicoformas, para além de glicoformas afucosiladas (afuco), podem ter impacto na função efetora de anticorpos ou morte de células-alvo mediada por anticorpos, também conhecida como citotoxicidade celular dependente de anticorpos (ADCC).

**[0005]** Muitos fatores influenciam a estrutura da glicana e, assim, a forma glicosilada (glicoforma) final da proteína (glicoproteína). Por exemplo, a linhagem de células expressando o anticorpo, o meio de cultura de células, a composição do meio de alimentação, e a calendarização das alimentações durante a cultura de células podem ter impacto na produção de glicoformas da proteína.

**[0006]** Não obstante grupos de pesquisa terem sugerido muitos modos de influenciar os níveis de glicoformas particulares de um anticorpo, ainda são necessários na indústria biofarmacêutica métodos simples e eficientes para manipular e controlar os níveis de glicoformas afucosiladas totais (TAF) durante a produção recombinante de anticorpos terapêuticos.

## SUMÁRIO

**[0007]** São descritos pela primeira vez dados demonstrando que a concentração de fucose e/ou glicose em um meio de cultura de células compreendendo células produtoras de uma proteína glicosilada recombinante (por exemplo, um anticorpo ou proteína de ligação a anticorpos) influencia o nível de glicoformas TAF da proteína glicosilada recombinante produzida. Enquanto alterações maiores do nível de glicoformas TAF de uma proteína glicosilada recombinante (por exemplo, um anticorpo ou proteína de ligação a anticorpos) podem ser alcançadas manipulando a concentração de fucose no meio de cultura de células compreendendo células produtoras da proteína glicosilada recombinante (por exemplo, anticorpo ou proteína de ligação a anticorpos), alterações menores do nível de glicoformas TAF podem ser alcançadas alterando a concentração de glicose no meio de cultura de células, como descrito aqui. Além disso, os dados demonstram que, enquanto a concentração de glicose do meio de cultura de células afeta níveis de glicanas ricas em manose e glicanas afucosiladas, a concentração de fucose do meio de cultura de células afeta níveis de glicanas afucosiladas mas não influencia níveis de glicanas ricas em manose. A descoberta de que cada um destes açúcares, com fórmula química diferindo em somente um átomo de oxigênio, conduz a efeitos diferenciais em níveis de glicoformas TAF foi inesperada. Sem pretender ficar restringido a uma teoria particular, a manutenção de células produtoras da proteína glicosilada recombinante (por exemplo, anticorpo ou proteína de ligação a anticorpos) em um meio de cultura de células

compreendendo fucose e/ou glicose a concentrações como ensinado aqui permite a produção de uma composição de proteína glicosilada recombinante (por exemplo, um anticorpo ou proteína de ligação a anticorpos) tendo um nível desejado ou predeterminado ou pré-selecionado de glicoformas TAF (por exemplo, glicanas ricas em manose e glicanas afucosiladas). Em conformidade, a revelação se relaciona com métodos de produção de uma composição de proteína glicosilada recombinante (por exemplo, uma composição de anticorpo ou composição de proteína de ligação a anticorpos) compreendendo um nível desejado ou predeterminado ou pré-selecionado de glicoformas TAF.

**[0008]** A revelação proporciona métodos de produção de uma composição de proteína glicosilada recombinante (por exemplo, uma composição de anticorpo ou composição de proteína de ligação a anticorpos). Em modalidades exemplificativas, o método compreende manter células competentes para glicosilação em um meio de cultura de células compreendendo fucose e/ou glicose a uma concentração específica como descrito aqui, dependendo do nível de glicoformas TAF desejado.

**[0009]** Em modalidades exemplificativas, o nível de glicoformas TAF na composição de proteína glicosilada recombinante (por exemplo, composição de anticorpo ou composição de proteína de ligação a anticorpos) é menor do que ou cerca de 10% e, em aspectos exemplificativos, o método compreende manter células competentes para glicosilação em um meio de cultura de células compreendendo fucose, em que fucose está presente no meio de cultura a

uma concentração situada entre cerca de 0,17 g/L e cerca de 1,0 g/L.

**[0010]** Em modalidades exemplificativas, o nível de glicoformas TAF na composição de proteína glicosilada recombinante (por exemplo, composição de anticorpo ou composição de proteína de ligação a anticorpos) é menor do que ou cerca de 10% e, em aspectos exemplificativos, o método compreende manter células competentes para glicosilação em um meio de cultura de células compreendendo fucose, em que fucose está presente no meio de cultura a uma concentração situada entre cerca de 0,1 g/L e cerca de 1,0 g/L, e em que as células competentes para glicosilação não são geneticamente modificadas para alterar a atividade de uma enzima da via *de novo* ou da via de salvamento.

**[0011]** A revelação também proporciona métodos de produção de uma composição de proteína glicosilada recombinante (por exemplo, uma composição de anticorpo ou composição de proteína de ligação a anticorpos) compreendendo manter células competentes para glicosilação em um meio de cultura de células compreendendo fucose e glicose, em que fucose está presente no meio de cultura a uma concentração de cerca de 0,1 g/L até cerca de 1,0 g/L e adicionar glicose ao meio de cultura de células de acordo com uma calendarização de alimentação com glicose que alcança uma concentração média de glicose de cerca de 10 g/L ou menos.

**[0012]** Composições de proteína glicosilada recombinante (por exemplo, composições de anticorpos ou composições de proteínas de ligação a anticorpos) produzidas pelos métodos

da revelação são proporcionadas aqui. Adicionalmente, são proporcionadas composições farmacêuticas e meios de cultura de células relacionados. Em aspectos exemplificativos, o meio de cultura de células compreende um ácido nucleico exógeno codificando um anticorpo (por exemplo, um anticorpo IgG) e um meio de cultura compreendendo fucose a uma concentração de cerca de 0,1 g/L até cerca de 1,0 g/L ou cerca de 0,17 g/L até cerca de 1,0 g/L. Em alguns casos, as células competentes para glicosilação não são geneticamente modificadas para alterar a atividade de uma enzima da via *de novo* ou da via de salvamento. Opcionalmente, as células competentes para glicosilação não são geneticamente modificadas para nocaute de um gene codificando GDP-ceto-6-desoximanose-3,5-epimerase, 4-redutase. O meio de cultura, em alguns aspectos, compreende adicionalmente glicose a uma concentração menor do que cerca de 10 g/L, opcionalmente menor do que cerca de 9 g/L ou cerca de 6 g/L ou menos (por exemplo, cerca de 0,5 g/L até cerca de 4 g/L). Em casos exemplificativos, o pH do meio de cultura é cerca de 6,85 até cerca de 7,05, por exemplo, cerca de 6,90 até cerca de 7,00. Em alguns casos, o meio de cultura de células não compreende manose. Em certos aspectos, o anticorpo é um anticorpo IgG1. Em aspectos exemplificativos, o anticorpo é específico para um antígeno associado a tumores, tal como um compreendendo a SEQ ID NO: 3.

**[0013]** Métodos de alteração ou modulação do nível de glicanas TAF de uma composição de proteína glicosilada recombinante (por exemplo, uma composição de anticorpo ou composição de proteína de ligação a anticorpos) produzidas por células competentes para glicosilação em um meio de

cultura de células são adicionalmente proporcionados aqui. Em aspectos exemplificativos, o método compreende (A) adicionar fucose a um meio de cultura de células compreendendo as células competentes para glicosilação para alcançar uma concentração de fucose de cerca de 0,1 g/L até cerca de 1,0 g/L para decrescer o nível de glicanas TAF; (B) adicionar glicose a um meio de cultura de células compreendendo as células competentes para glicosilação para alcançar uma concentração de glicose menor do que cerca de 10 g/L para aumentar o nível de TAF; ou (C) uma combinação de ambos de (A) e (B).

**[0014]** Também são proporcionados métodos de modulação do nível de glicanas afucosiladas de uma composição de proteína glicosilada recombinante (por exemplo, uma composição de anticorpo ou composição de proteína de ligação a anticorpos) produzidas por células competentes para glicosilação. Em modalidades exemplificativas, o método compreende (A) adicionar fucose a um meio de cultura de células compreendendo as células competentes para glicosilação para alcançar uma concentração de fucose de cerca de 0,1 g/L até cerca de 1,0 g/L, para decrescer o nível de glicanas afucosiladas; (B) adicionar glicose a um meio de cultura de células compreendendo as células competentes para glicosilação para alcançar uma concentração de glicose menor do que ou cerca de 10 g/L para aumentar o nível de glicanas afucosiladas; ou (C) uma combinação de ambos de (A) e (B).

**[0015]** A presente revelação proporciona adicionalmente um método de modulação do nível de glicanas ricas em manose

(HM) de uma composição de proteína glicosilada recombinante (por exemplo, uma composição de anticorpo ou composição de proteína de ligação a anticorpos) produzidas por células competentes para glicosilação. Em modalidades exemplificativas, o método compreende adicionar glicose a um meio de cultura de células compreendendo as células competentes para glicosilação para alcançar uma concentração de glicose menor do que cerca de 10 g/L para aumentar o nível de glicanas HM.

**[0016]** Também são proporcionados pela presente revelação métodos de modulação do nível de glicanas afucosiladas de uma composição de proteína glicosilada recombinante (por exemplo, uma composição de anticorpo ou composição de proteína de ligação a anticorpos) produzidas por células competentes para glicosilação, compreendendo reduzir o pH do meio de cultura de células em cerca de 0,03 até cerca de 1,2 para reduzir o nível de glicanas afucosiladas da composição em cerca de 0,5% até cerca de 2%, ou aumentar o pH do meio de cultura de células em cerca de 0,03 até cerca de 1,2 para aumentar o nível de glicanas afucosiladas da composição em cerca de 0,5% até cerca de 2%.

**[0017]** Métodos de redução do nível de glicanas afucosiladas de uma composição de proteína glicosilada recombinante (por exemplo, uma composição de anticorpo ou composição de proteína de ligação a anticorpos) produzidas por células competentes para glicosilação em cerca de 1% até cerca de 2%, compreendendo reduzir o pH do meio de

cultura de células em cerca de 0,05 até cerca de 1,2, são proporcionados pela presente revelação.

**[0018]** São adicionalmente proporcionados métodos de redução do nível de glicanas afucosiladas de uma composição de proteína glicosilada recombinante (por exemplo, uma composição de anticorpo ou composição de proteína de ligação a anticorpos) produzidas por células competentes para glicosilação em cerca de 0,5% até cerca de 1,1%, compreendendo reduzir o pH do meio de cultura de células em cerca de 0,03-0,07.

**[0019]** A presente revelação proporciona adicionalmente métodos de aumento do nível de glicanas afucosiladas de uma composição de proteína glicosilada recombinante (por exemplo, uma composição de anticorpo ou composição de proteína de ligação a anticorpos) produzidas por células competentes para glicosilação em cerca de 1% até cerca de 2%, compreendendo aumentar o pH do meio de cultura de células em cerca de 0,05 até cerca de 1,2.

**[0020]** Também são proporcionados métodos de aumento do nível de glicanas afucosiladas de uma composição de proteína glicosilada recombinante (por exemplo, uma composição de anticorpo ou composição de proteína de ligação a anticorpos) produzidas por células competentes para glicosilação em cerca de 0,5% até cerca de 1,1%, compreendendo aumentar o pH do meio de cultura de células em cerca de 0,03-0,07.

**[0021]** A presente revelação proporciona adicionalmente métodos de modulação do nível de glicanas TAF de uma composição de proteína glicosilada recombinante (por

exemplo, uma composição de anticorpo ou composição de proteína de ligação a anticorpos) produzidas por células competentes para glicosilação, compreendendo modular, reduzir ou aumentar, o nível de glicanas afucosiladas da composição de acordo com um método presentemente revelado de modulação, redução ou aumento, do nível de glicanas afucosiladas.

**[0022]** A presente revelação proporciona um método de produção de uma composição de proteína glicosilada recombinante (por exemplo, uma composição de anticorpo ou composição de proteína de ligação a anticorpos), em que o nível de glicanas afucosiladas na composição é cerca de 6,2% até cerca de 8,4%, o método compreendendo manter células competentes para glicosilação em um meio de cultura de células a um pH maior do que 7,05 e menor do que 7,2, em que: (A) o pH do meio de cultura de células é alterado em menos do que 0,15 (opcionalmente em menos do que 0,10) durante o período de cultura ou (B) a temperatura do meio de cultura de células é alterada em não mais do que 2 graus C ou o método não compreende cultivar as células em um meio de cultura de células compreendendo manganês ou betaína ou (D) uma combinação de dois ou três de (A), (B) e (C).

#### DESCRIÇÃO BREVE DAS FIGURAS

**[0023]** A Figura 1A é uma ilustração dos três tipos de N-glicanas (oligomanose, complexa e híbrida) e símbolos habitualmente usados para tais sacarídeos.

**[0024]** A Figura 1B é uma ilustração de estruturas de glicanas exemplificativas.

**[0025]** A Figura 2 é um diagrama da via de salvamento e da via *de novo* do metabolismo da fucose. Na via de salvamento, L-fucose livre é convertida em GDP-fucose, ao passo que na via *de novo*, GDP-fucose é sintetizada via três reações catalisadas por GMD e FX. A GDP-fucose é então transportada do citosol para o lúmen de Golgi por GDP-Fuc Transferase e transferida para oligossacarídeos e proteínas aceitadores. O outro produto reacional, GDP, é convertido por um nucleotídeo difosfatase luminal em guanosina 5-monofosfato (GMP) e fosfato inorgânico (Pi). O primeiro é exportado para o citosol (via um sistema antiporto que está acoplado ao transporte de GDP-fucose), ao passo que é postulado que o último deixa o lúmen de Golgi via o canal aniônico de Golgi, GOLAC. Ver, por exemplo, Nordeen *et al.* 2000; Hirschberg *et al.* 2001,

**[0026]** A Figura 3 é um gráfico ilustrando (A) a concentração de glicose (g/L) da cultura de células usando um meio de controle (linha com triângulos brancos), um primeiro meio de teste (linha com círculos brancos), e um segundo meio de teste (linha com hexágonos brancos), ao longo da ronda da cultura de células, (B) a concentração de fucose (g/L) da cultura de células usando o segundo meio de teste (linha com quadrados brancos) ao longo da ronda da cultura de células, e (C) os níveis de glicanas TAF (%) da cultura de células usando o meio de controle (linha tracejada com triângulos negros), o primeiro meio de teste (linha tracejada com círculos negros), e segundo meio de teste (linha tracejada com hexágonos negros), ao longo da ronda da cultura de células.

**[0027]** A Figura 4 é um gráfico ilustrando (A) a concentração de glicose (g/L) da cultura de células usando um meio de controle (linha com triângulos brancos), um primeiro meio de teste (linha com círculos brancos), e um segundo meio de teste (linha com hexágonos brancos), ao longo da ronda da cultura de células, e (B) os níveis de glicanas ricas em manose (HM) (%) da cultura de células usando o meio de controle (linha tracejada com triângulos negros), o primeiro meio de teste (linha tracejada com círculos negros), e segundo meio de teste (linha tracejada com hexágonos negros), ao longo da ronda da cultura de células.

**[0028]** A Figura 5 é um gráfico ilustrando (A) a concentração de glicose (g/L) da cultura de células usando um meio de controle (linha com triângulos brancos), um primeiro meio de teste (linha com círculos brancos), e um segundo meio de teste (linha com hexágonos brancos), ao longo da ronda da cultura de células, e (B) os níveis de glicanas afucosiladas (afuc) (%) da cultura de células usando o meio de controle (linha tracejada com triângulos negros), o primeiro meio de teste (linha tracejada com círculos negros), e segundo meio de teste (linha tracejada com hexágonos negros), ao longo da ronda da cultura de células.

**[0029]** A Figura 6 é um gráfico dos níveis de glicanas TAF (%) em função da concentração de fucose (g/L) no meio de cultura de células contendo 0X glicose, 1X glicose ou 2X glicose.

**[0030]** A Figura 7 é um gráfico dos níveis de ADCC (expressos como % relativamente a um anticorpo de controle tendo a mesma sequência de aminoácidos) em função da concentração de fucose (g/L) no meio de cultura de células contendo 0X glicose, 1X glicose ou 2X glicose.

**[0031]** A Figura 8 é um gráfico ilustrando um modelo dos efeitos de glicose e fucose em níveis de glicanas TAF (%). São mostrados TAF mín, máx, e médio de acordo com o QTPP. A equação por baixo do gráfico mostra a relação matemática entre glicose, fucose e TAF.

**[0032]** A Figura 9A é uma série de gráficos mostrando: (i) níveis de glicanas TAF (%) em função da concentração de fucose (g/L) no meio de cultura de células (quadrante de cima à esquerda) ou em função da concentração de glicose (g/L) no meio de cultura de células (quadrante de cima à direita) e (ii) níveis de ADCC (expressos como % relativamente a um anticorpo de controle tendo a mesma sequência de aminoácidos) em função da concentração de fucose (g/L) no meio de cultura de células (quadrante de baixo à esquerda) ou em função da concentração de glicose (g/L) no meio de cultura de células (quadrante de baixo à direita). A gama de níveis de glicanas TAF (%) é 3,30684 até 3,73083 e a gama de níveis de ADCC é 78,3092-90,4408. A 0,2 g/L de fucose e 3,0 g/L de glicose, o nível de glicanas TAF (%) foi 3,518836, e o nível de ADCC (%) foi 84,37501.

**[0033]** A Figura 9B é uma série de gráficos mostrando: (i) níveis de glicanas TAF (%) em função da concentração de fucose (g/L) no meio de cultura de células (quadrante de cima à esquerda) ou em função da concentração de glicose

(g/L) no meio de cultura de células (quadrante de cima à direita) e (ii) níveis de ADCC (expressos como % relativamente a anticorpo inovador ou comercialmente disponível) em função da concentração de fucose (g/L) no meio de cultura de células (quadrante de baixo à esquerda) ou em função da concentração de glicose (g/L) no meio de cultura de células (quadrante de baixo à direita). A gama de níveis de glicanas TAF (%) é 3,52301 até 4,0559 e a gama de níveis de ADCC é 75,6911-90,9385. A 0 g/L de fucose e 0,554 g/L de glicose, o nível de glicanas TAF (%) foi 3,789458, e o nível de ADCC (%) foi 83,3148.

**[0034]** A Figura 9C é uma série de gráficos mostrando: (i) níveis de glicanas TAF (%) em função da concentração de fucose (g/L) no meio de cultura de células (quadrante de cima à esquerda) ou em função da concentração de glicose (g/L) no meio de cultura de células (quadrante de cima à direita) e (ii) níveis de ADCC (expressos como % relativamente a anticorpo inovador ou comercialmente disponível) em função da concentração de fucose (g/L) no meio de cultura de células (quadrante de baixo à esquerda) ou em função da concentração de glicose (g/L) no meio de cultura de células (quadrante de baixo à direita). A gama de níveis de glicanas TAF (%) é 2,9975-3,68468 e a gama de níveis de ADCC é 79,2215-98,8836. A 0,492 g/L de fucose e 6,0 g/L de glicose, o nível de glicanas TAF (%) foi 3,341092, e o nível de ADCC (%) foi 89,05256.

**[0035]** A Figura 10 é um gráfico de osmolalidade representado em função da concentração de fucose.

**[0036]** A Figura 11 é um gráfico da concentração de fucose representado em função do tempo (duração) em cultura de células.

**[0037]** A Figura 12 é um gráfico da % de TAF e da alimentação de fucose, cada uma representada em função do tempo.

**[0038]** A Figura 13 é um par de gráficos demonstrando que o controle de glicose na gama-alvo desde o Dia 6 ou anterior origina resultados de TAF equivalentes.

**[0039]** A Figura 14 é um gráfico da % de afucosilação representado em função do tempo da cultura.

#### DESCRIÇÃO DETALHADA

**[0040]** Muitas proteínas secretadas sofrem glicosilação pós-tradução, um processo pelo qual frações de açúcar (por exemplo, glicanas, sacarídeos) são covalentemente ligadas a aminoácidos específicos de uma proteína. Em células eucarióticas ocorrem dois tipos de reações de glicosilação: (1) glicosilação N-ligada, na qual glicanas são ligadas à asparagina da sequência de reconhecimento Asn-X-Thr/Ser, onde "X" é qualquer aminoácido exceto prolina, e (2) glicosilação O-ligada, na qual glicanas são ligadas a serina ou treonina. Independentemente do tipo de glicosilação (N-ligada ou O-ligada), existe micro-heterogeneidade de glicoformas de proteínas devido à gama ampla de estruturas de glicanas associadas a cada sítio (O ou N).

**[0041]** Todas as N-glicanas têm uma sequência de açúcar nuclear comum:  $\text{Man}\alpha 1-6(\text{Man}\alpha 1-3)\text{Man}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-$

Asn-X-Ser/Thr (Man<sub>3</sub>GlcNAc<sub>2</sub>Asn) e são classificadas em um de três tipos: (A) um tipo rico em manose (HM) ou oligomanose (OM), que consiste em duas frações N-acetilglucosamina (GlcNAc) e um grande número (por exemplo, 5, 6, 7, 8 ou 9) de resíduos manose (Man), (B) um tipo complexo, que compreende mais do que duas frações GlcNAc e qualquer número de outros tipos de açúcar, ou (C) um tipo híbrido, que compreende um resíduo Man em um lado do ramo e GlcNAc na base de um ramo complexo. A Figura 1A (retirada de Stanley *et al.*, Capítulo 8: "N-Glycans, Essentials of Glycobiology", 2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2009) mostra os três tipos de N-glicanas.

**[0042]** As glicanas N-ligadas compreendem tipicamente um ou mais monossacarídeos de galactose (Gal), N-acetilgalactosamina (GalNAc), galactosamina (GalN), glicose (GLc), N-acetilglucosamina (GlcNAc), glucosamina (GlcN), manose (Man), N-Acetilmanosamina (ManNAc), Manosamina (ManN), xilose (Xyl), Ácido N0-acetilneuramínico (Neu5Ac), Ácido N-glicolilneuramínico (Neu5Gc), ácido 2-ceto-3-doxinonônico (Kdn), fucose (Fuc), Ácido glucurônico (GLcA), Ácido idurônico (IdoA), Ácido galacturônico (Gal A), ácido manurônico (Man A). Os símbolos habitualmente usados para tais sacarídeos são mostrados na Figura 1A. Glicanas exemplificativas e sua identidade são mostradas na Figura 1B.

**[0043]** A glicosilação N-ligada começa no retículo endoplasmático (ER), onde um conjunto complexo de reações resulta na ligação de uma estrutura de glicana nuclear constituída essencialmente por dois resíduos GlcNAc e três

resíduos Man. O complexo de glicana formado no ER é modificado por ação de enzimas no aparelho de Golgi. Se o sacarídeo for relativamente inacessível às enzimas, tipicamente permanece na forma HM original. Se enzimas conseguirem aceder ao sacarídeo, então muitos dos resíduos Man são separados por clivagem e o sacarídeo é adicionalmente modificado, resultando na estrutura de N-glicanas tipo complexo. Por exemplo, a manosidase-1 localizada no cis-Golgi pode clivar ou hidrolisar uma glicana HM, enquanto a fucosiltransferase FUT-8, localizada no Golgi medial, fucosila a glicana (Hanrue Imai-Nishiya (2007), *BMC Biotechnology*, 7: 84).

**[0044]** Em conformidade, a composição de açúcar e a configuração estrutural de uma estrutura de glicana variam, dependendo da maquinaria da glicosilação no ER e no aparelho de Golgi, da acessibilidade das enzimas da maquinaria à estrutura da glicana, da ordem de ação de cada enzima e do estágio em que a proteína é liberada da maquinaria da glicosilação, entre outros fatores.

**[0045]** A revelação proporcionada aqui se relaciona com métodos de produção de uma composição de anticorpo compreendendo um nível desejado ou predeterminado ou pré-selecionado de glicoformas TAF. Em modalidades exemplificativas, o método compreende manter células competentes para glicosilação em um meio de cultura de células compreendendo fucose e/ou glicose a uma concentração específica como descrito aqui, dependendo do nível de glicoformas TAF desejado. Além disso, a revelação se relaciona com um método de produção de uma composição de

anticorpo compreendendo um nível desejado ou predeterminado ou pré-selecionado de glicoformas afucosiladas, por exemplo, o nível de glicanas afucosiladas na composição de anticorpo é cerca de 6,2% até cerca de 8,4%. Em modalidades exemplificativas, o método compreende manter células competentes para glicosilação em um meio de cultura de células a um pH maior do que 7,05 e menor do que 7,2, em que: (A) o pH do meio de cultura de células é alterado em menos do que 0,15 (opcionalmente em menos do que 0,10) durante o período de cultura ou (B) a temperatura do meio de cultura de células é alterada em não mais do que 2 graus C ou o método não compreende cultivar as células em um meio de cultura de células compreendendo manganês ou betaína ou (D) uma combinação de dois ou três de (A), (B) e (C). Sem pretender ficar restringido a uma teoria particular, se crê que os métodos da revelação proporcionam um meio para composições preparadas à medida compreendendo quantidades específicas de glicoformas particulares de um determinado anticorpo.

Em modalidades exemplificativas, os níveis de glicanas TAF são modulados. Como usado aqui, "glicanas afucosiladas totais" ou "glicanas TAF" ou "glicoformas afucosiladas totais" ou "glicoformas TAF" se relaciona com a quantidade somada de glicanas ricas em manose (HM) e glicanas afucosiladas. Em modalidades exemplificativas, os níveis de glicanas HM são modulados. Como usado aqui, o termo "glicanas ricas em manose" ou "glicanas HM" ou "glicoformas ricas em manose" ou "glicoformas HM" ou "HM" abrange glicanas compreendendo 5, 6, 7, 8, ou 9 resíduos manose, abreviadas como Man5, Man6, Man7, Man8, e Man9,

respectivamente. Em modalidades exemplificativas, os níveis de glicanas afucosiladas são modulados. Como usado aqui, o termo "glicana afucosilada" ou "glicana afuco" ou "glicoforma afucosilada" ou "Afuc" se relaciona com glicoformas que não têm uma fucose nuclear, por exemplo, uma fucose  $\alpha 1,6$ -ligada no resíduo GlcNAc envolvido na ligação amida com o Asn do sítio de N-glicosilação. Glicoformas afucosiladas incluem, mas sem limitação, A1G0, A2G0, A2G1a, A2G1b, A2G2 e A1G1M5. Glicanas afucosiladas adicionais incluem, por exemplo, A1G1a, G0[H3N4], G0[H4N4], G0[H5N4], FO-N[H3N3]. Ver, por exemplo, Reusch e Tejada, *Glycobiology* 25(12): 1325-1334 (2015). Em aspectos exemplificativos, o nível de TAF e as quantidades de glicoformas HM e glicoformas afucosiladas são determinados via Cromatografia Líquida de Interação Hidrofílica (HILIC), como adicionalmente descrito aqui no Exemplo 1. Após a clivagem enzimática das N-glicanas, HILIC é realizada para se obter um cromatograma com vários picos, em que cada pico representa uma distribuição (quantidade) média de uma glicoforma diferente. Para estes propósitos, % da Área do Pico = Área do Pico/Área de Picos Total x 100%, e % da Área de Picos Total = Área das Amostras Total/Área Total do Padrão x 100%. Os cálculos usados para determinar a % de TAF podem ser realizados do modo seguinte:

% de Glicoformas afucosiladas = %A1G0 + %A2G0 + %A2G1a + %A2G1b + %A2G2 + %A1G1M5.

% de Glicoformas ricas em manose = %Man5 (se detectável) + %Man6 (se detectável) + %Man7 (se detectável) + %Man8 (se detectável) + %Man9 (se detectável)

**[0046]** A revelação proporciona métodos de produção de uma composição de proteína glicosilada recombinante. Em modalidades exemplificativas, a composição de proteína glicosilada recombinante é uma composição de anticorpo. Em modalidades exemplificativas, o método compreende manter células competentes para glicosilação em um meio de cultura de células compreendendo fucose e/ou glicose a uma concentração específica como descrito aqui, dependendo do nível de glicoformas TAF desejado.

**[0047]** *Fucose*

**[0048]** Em modalidades exemplificativas dos métodos revelados aqui, fucose está presente no meio de cultura a uma concentração desde cerca de 0,1 g/L até cerca de 2,0 g/L, opcionalmente cerca de 0,1 g/L até cerca de 1,75 g/L, cerca de 0,1 g/L até cerca de 1,5 g/L ou cerca de 0,1 g/L até cerca de 1,2 g/L. Em casos exemplificativos, fucose está presente no meio de cultura a uma concentração menor do que ou cerca de 1,2 g/L. Em casos exemplificativos, fucose está presente no meio de cultura a uma concentração desde cerca de 0,1 g/L até cerca de 1,0 g/L. Em casos exemplificativos, o meio de cultura compreende fucose a uma concentração desde cerca de 0,17 g/L até cerca de 2,0 g/L, cerca de 0,17 g/L até cerca de 1,75 g/L, cerca de 0,17 g/L até cerca de 1,5 g/L ou cerca de 0,17 g/L até cerca de 1,2 g/L. Em aspectos exemplificativos, fucose está presente no meio de cultura a uma concentração desde cerca de 0,17 g/L até cerca de 1,2 g/L. Em casos exemplificativos, fucose está presente no meio de cultura a uma concentração desde cerca de 0,17 g/L até cerca de 1,0 g/L. Em casos

exemplificativos, o meio de cultura compreende fucose a uma concentração desde cerca de 0,2 g/L até cerca de 2,0 g/L, cerca de 0,2 g/L até cerca de 1,75 g/L, cerca de 0,2 g/L até cerca de 1,5 g/L ou cerca de 0,2 g/L até cerca de 1,2 g/L. Em casos exemplificativos, fucose está presente no meio de cultura a uma concentração desde cerca de 0,2 g/L até cerca de 1,0 g/L. Em casos exemplificativos, fucose está presente no meio de cultura a uma concentração menor do que ou cerca de 1,0 g/L. Por exemplo, em alguns casos, a concentração de fucose do meio de cultura é cerca de 0,10 g/L, cerca de 0,11 g/L, cerca de 0,12 g/L, cerca de 0,13 g/L, cerca de 0,14 g/L, cerca de 0,15 g/L, cerca de 0,16 g/L, cerca de 0,17 g/L, cerca de 0,18 g/L, cerca de 0,19 g/L ou cerca de 0,20 g/L. Em alguns casos, a concentração de fucose do meio de cultura é cerca de 0,3 g/L, cerca de 0,4 g/L, cerca de 0,5 g/L, cerca de 0,6 g/L, cerca de 0,7 g/L, cerca de 0,8 g/L ou cerca de 0,9 g/L. Em aspectos exemplificativos, a concentração de fucose é não mais do que ou cerca de 1,0 g/L, não mais do que ou cerca de 0,9 g/L, não mais do que ou cerca de 0,8 g/L, ou não mais do que ou cerca de 0,7 g/L. Em casos exemplificativos, fucose está presente no meio de cultura a uma concentração menor do que ou cerca de 0,75 g/L, ou cerca de 0,25 g/L até cerca de 0,75 g/L, por exemplo, cerca de 0,4 g/L até cerca de 0,5 g/L ou cerca de 0,6 g/L. Em aspectos exemplificativos, fucose está presente no meio de cultura a uma concentração menor do que cerca de 0,6 g/L, por exemplo, cerca de 0,2 g/L até cerca de 0,5 g/L.

**[0049]** Em aspectos exemplificativos, o método de produção de uma composição de proteína glicosilada

recombinante (por exemplo, uma composição de anticorpo ou composição de proteína de ligação a anticorpos) compreende manter as células competentes para glicosilação em dois meios diferentes de cultura de células. Em aspectos exemplificativos, o método de produção de uma composição de proteína glicosilada recombinante (por exemplo, uma composição de anticorpo ou composição de proteína de ligação a anticorpos) compreende manter as células competentes para glicosilação em um primeiro meio de cultura de células durante um período de tempo inicial e subsequentemente manter as células competentes para glicosilação em um segundo meio de cultura de células, opcionalmente em que o primeiro meio de cultura de células não compreende fucose a uma concentração de cerca de 0,1 g/L até cerca de 1,0 g/L e o segundo meio de cultura de células compreende fucose a uma concentração de cerca de 0,1 g/L até cerca de 1,0 g/L e o segundo meio de cultura de células compreende fucose, por exemplo, a uma das concentrações acima. Em casos exemplificativos, o período de tempo inicial começa quando células são inoculadas em um biorreator compreendendo meio de cultura de células, por exemplo, o meio de cultura de células. Em alguns aspectos, o período de tempo inicial é cerca de 1 dia até cerca de 3 dias, por exemplo, cerca de 24 horas até cerca de 72 horas. Em aspectos exemplificativos, o período de tempo inicial é maior do que cerca de 3 dias (cerca de 72 horas) mas menor do que cerca de 10 dias (cerca de 240 horas) ou menor do que cerca de 156 horas. Em aspectos exemplificativos, o período de tempo inicial é cerca de 3, cerca de 4, cerca de 5, cerca de 6, cerca de 7, cerca de 8 ou cerca de 9 dias.

Em aspectos exemplificativos, o método compreende adicionar fucose ao meio de cultura após o período de tempo inicial. Em alguns aspectos, fucose é adicionada ao primeiro meio de cultura para se obter o segundo meio de cultura de células. Por exemplo, em vários aspectos, o método compreende adicionar fucose após cerca de 1 dia até cerca de 3 dias, após cerca de 3 dias, mas menos do que cerca de 10 dias, ou após cerca de 3, cerca de 4, cerca de 5, cerca de 6, cerca de 7, cerca de 8 ou cerca de 9 dias. Em aspectos exemplificativos, o método compreende adicionar fucose ao meio de cultura de células, por exemplo, o primeiro meio de cultura de células, no 6º dia, 7º dia, 8º dia, ou 9º dia após a inoculação da cultura de células. Em aspectos exemplificativos, fucose é adicionada para uma concentração final maior do que cerca de 0,1 g/L, maior do que cerca de 0,17 g/L, ou maior do que cerca de 0,2 g/L, e menor do que cerca de 2,0 g/L. Em aspectos exemplificativos, o primeiro meio de cultura de células não compreende fucose. Em aspectos exemplificativos, o primeiro meio de cultura de células compreende fucose, mas a uma concentração que é indetectável ou não é mensurável, ou a uma concentração que é substancialmente inferior à concentração de fucose do segundo meio de cultura de células, por exemplo, substancialmente inferior a 0,1 g/L, inferior a cerca de 0,17 g/L, ou inferior a cerca de 0,2 g/L.

**[0050]** Em aspectos alternativos, os métodos compreendem manter células competentes para glicosilação em um meio de cultura de células compreendendo fucose (por exemplo, a uma concentração maior do que cerca de 0,1 g/L, maior do que cerca de 0,17 g/L, ou maior do que cerca de 0,2 g/L, e

menor do que cerca de 2,0 g/L), durante todo o período em que as células competentes para glicosilação são mantidas em cultura de células, ou durante uma grande parte do período de cultura. Em alguns aspectos, o método de produção de uma composição de proteína glicosilada recombinante (por exemplo, uma composição de anticorpo ou composição de proteína de ligação a anticorpos) compreende inocular as células competentes para glicosilação em um biorreator compreendendo meio de cultura de células compreendendo fucose e manter as células no meio de cultura de células à concentração de fucose mantida de modo a ser substancialmente igual durante a cultura de células.

**[0051]** Em modalidades exemplificativas, a concentração de fucose flutua muito pouco durante a cultura de células. Em aspectos exemplificativos, a concentração de fucose flutua em cerca de 0,2 g/L ou menos durante o período em que as células competentes para glicosilação são mantidas no meio de cultura de células compreendendo fucose. Em aspectos exemplificativos, a concentração de fucose flutua em cerca de 0,1 g/L ou menos durante o período em que as células competentes para glicosilação são mantidas no meio de cultura de células compreendendo fucose. Em aspectos exemplificativos, quando fucose é adicionada ao meio de cultura de células, por exemplo, após o período inicial da cultura de células, fucose é adicionada ao meio não mais do que uma vez ou duas vezes durante o período de cultura de células.

**[0052]** *Glicose*

**[0053]** Em modalidades exemplificativas dos métodos revelados aqui, glicose está presente no meio de cultura. Em aspectos exemplificativos, glicose está presente no meio de cultura a uma concentração menor do que ou cerca de 10 g/L, menor do que ou cerca de 9,0 g/L, ou menor do que ou cerca de 6,0 g/L. Em aspectos exemplificativos, glicose está presente no meio de cultura a uma concentração desde cerca de 0,5 g/L até cerca de 4,0 g/L. Em aspectos exemplificativos, glicose está presente a uma concentração desde cerca de X g/L até cerca de Y g/L, em que X é cerca de 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3,0, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, ou 3,9, e Y é cerca de 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3,0, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4,0, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, ou 5,0, desde que X seja menor do que Y.

**[0054]** Em aspectos exemplificativos, o método compreende manter a concentração da glicose no meio de cultura de células durante um período de tempo que é equivalente ao período de cultura de células. Em casos exemplificativos, manter a concentração da glicose no meio de cultura de células compreende proceder à amostragem do meio de cultura de células periodicamente, por exemplo, hora à hora, a cada duas horas, uma vez a cada 3, 4, 5, ou 6 horas, uma vez ao dia, duas vezes ao dia, três vezes diariamente, ou 4 vezes diariamente, e similares, medir a concentração de glicose do meio de cultura de células submetido a amostragem, e adicionar glicose à cultura de

células, se a concentração de glicose do meio de cultura de células submetido a amostragem for menor do que a concentração de glicose mantida desejada. Em aspectos exemplificativos, manter a concentração da glicose no meio de cultura de células compreende medir a concentração de glicose do meio de cultura de células via um sensor de glicose. Em aspectos exemplificativos, a concentração de glicose é medida via um sensor de glicose em intervalos regulares, por exemplo, hora à hora, a cada duas horas, uma vez a cada 3, 4, 5, ou 6 horas, uma vez ao dia, duas vezes ao dia, três vezes diariamente, ou 4 vezes diariamente, e similares, e glicose é adicionada à cultura de células se for determinado, via o sensor de glicose, que a concentração de glicose é menor do que a concentração de glicose mantida desejada. Em aspectos alternativos, o método compreende manter as células competentes para glicosilação em meio de cultura de células compreendendo glicose, mas manter a concentração da glicose no meio de cultura de células somente após um período de tempo inicial. Em modalidades exemplificativas, o período de tempo inicial é cerca de 1 dia até cerca de 3 dias (cerca de 24 horas até cerca de 72 horas). Em alguns casos, o período de tempo inicial é menor do que ou cerca de 6 dias, opcionalmente em que o período de tempo inicial é 3 dias ou 4 dias ou 5 dias após a inoculação da cultura de células. Em aspectos exemplificativos, o método compreende manter as células competentes para glicosilação em meio de cultura de células compreendendo glicose e manter a concentração da glicose no meio de cultura de células no 6º dia pós-inoculação e subsequentemente em seguida. Em aspectos

exemplificativos, a concentração de glicose é mantida durante pelo menos cerca de 4 dias ou cerca de 5 dias após o período de tempo inicial, ou opcionalmente, mantida durante pelo menos cerca de 6 dias após o período de tempo inicial.

**[0055]** Em aspectos exemplificativos, o meio de cultura de células compreende uma concentração de glicose inicial durante um período de tempo inicial. Por exemplo, em vários aspectos, a concentração de glicose inicial é cerca de 1,0 g/L até cerca de 15 g/L, cerca de 1,0 até cerca de 12 g/L, ou cerca de 1,0 g/L até cerca de 10 g/L. A concentração de glicose inicial, em alguns aspectos, é cerca de 1,0 g/L, cerca de 1,5 g/L, cerca de 2,0 g/L, cerca de 2,5 g/L, cerca de 3,0 g/L, cerca de 3,5 g/L, cerca de 4,0 g/L, cerca de 4,5 g/L, cerca de 5,0 g/L, cerca de 5,5 g/L, cerca de 6,0 g/L, cerca de 6,5 g/L, cerca de 7,0 g/L, cerca de 7,5 g/L, cerca de 8,0 g/L, cerca de 8,5 g/L, cerca de 9,0 g/L, cerca de 9,5 g/L, cerca de 10,0 g/L, cerca de 10,5 g/L, cerca de 11,0 g/L, cerca de 11,5 g/L ou cerca de 12,0 g/L. Em alguns aspectos, a concentração de glicose inicial é cerca de 12 g/L  $\pm$  1 g/L ou cerca de 9 g/L  $\pm$  1 g/L ou cerca de 6 g/L  $\pm$  1 g/L. Em alguns aspectos, a concentração de glicose inicial é menor do que cerca de 5,0 g/L ou menor do que cerca de 4,0 g/L. Em aspectos exemplificativos, a concentração de glicose inicial é a concentração de glicose do meio de cultura de células usado durante o período de tempo inicial. Em aspectos exemplificativos, a concentração de glicose inicial é a concentração de glicose do meio de cultura de células mantida durante o período de tempo inicial.

**[0056]** Em aspectos exemplificativos, a concentração de glicose inicial é igual à concentração de glicose mantida após o período de tempo inicial. Em aspectos alternativos, a concentração de glicose inicial é diferente da concentração de glicose mantida após o período de tempo inicial. Em aspectos exemplificativos, o método compreende adicionar glicose ao meio de cultura de células após o período de tempo inicial e manter glicose a uma concentração diferente relativamente à concentração de glicose inicial. Em aspectos exemplificativos, o método compreende adicionar glicose ao meio de cultura de células após o período de tempo inicial para manter glicose a uma concentração diferente relativamente à concentração de glicose inicial, em que o passo de adicionar glicose alcança uma concentração de glicose de cerca de 10 g/L ou menos (por exemplo, cerca de 9 g/L ou menos, cerca de 6 g/L ou menos, cerca de 0,5 g/L até cerca de 4 g/L).

**[0057]** Em aspectos exemplificativos, o método compreende adicionar glicose ao meio de cultura de células de acordo com uma calendarização de alimentação com glicose. Em alguns aspectos, a calendarização de alimentação com glicose é iniciada após o período de tempo inicial. Por exemplo, em alguns aspectos, o período de tempo inicial é pelo menos 3 dias ou 4 dias e a calendarização de alimentação com glicose é iniciada cerca de 4 até cerca de 6 dias pós-inoculação da cultura de células, por exemplo, cerca de 4 dias, cerca de 5 dias, cerca de 6 dias pós-inoculação da cultura de células. Em casos exemplificativos, a calendarização de alimentação com glicose alcança uma concentração média de glicose de cerca

de 10 g/L ou menos (por exemplo, cerca de 9 g/L ou menos, cerca de 6 g/L ou menos, cerca de 0,5 g/L até cerca de 4 g/L). O termo “concentração média de glicose” se relaciona com as concentrações médias de glicose no meio de cultura de células determinadas por um sensor de glicose ao longo de um período de tempo (por exemplo, 1 até 2 dias). Em casos exemplificativos, a calendarização de alimentação com glicose alcança uma concentração média de glicose com base na concentração de fucose do meio de cultura de células. Em alguns aspectos, a concentração média de glicose é calculada com base na Fórmula I:

$$T = 3,354 - 1,388F + 0,111G + [F - 0,4375] \times [1,9527(F - 0,4375)]$$

(Fórmula I)

em que T é a % de glicanas afucosiladas totais (TAF) visada e é cerca de 2,5% até cerca de 6%, cerca de 2,75% até cerca de 5,5% ou cerca de 3% até cerca de 5%, F é a concentração (g/L) de fucose no meio, e G é a concentração média de glicose (g/L).

**[0058]** Em casos exemplificativos, (i) a concentração de fucose é cerca de  $0,2 \pm 0,1$  g/L e a concentração média de glicose é cerca de 2 até cerca de 4 g/L; (ii) a concentração de fucose é cerca de  $0,5 \pm 0,1$  g/L e a concentração média de glicose é cerca de 3 até cerca de 6 g/L; ou (iii) a concentração de fucose é cerca de  $0,75 \pm 0,1$  g/L e a concentração média de glicose é cerca de 4,5 até cerca de 9 g/L.

**[0059]**      *Níveis de TAF, HM, e Glicanas Afucosiladas*

**[0060]**      Em modalidades exemplificativas, os métodos revelados aqui produzem uma composição de proteína glicosilada recombinante (por exemplo, uma composição de anticorpo ou composição de proteína de ligação a anticorpos), em que o nível de glicanas TAF na composição é menor do que ou cerca de 10%. Em aspectos exemplificativos, o nível de glicanas TAF na composição é menor do que ou cerca de 9%, menor do que ou cerca de 8%, menor do que ou cerca de 7%, menor do que ou cerca de 6%, menor do que ou cerca de 5%. Em aspectos exemplificativos, o nível de glicanas TAF na composição é maior do que ou cerca de 4%, por exemplo, entre cerca de 4% e cerca de 10%. Em alguns aspectos, o nível de glicanas TAF na composição é cerca de 2% até cerca de 6% ou cerca de 2,5% até cerca de 5%. Em alguns aspectos, o nível de glicanas TAF é cerca de 2,0%, cerca de 2,5%, cerca de 3,0%, cerca de 3,5%, cerca de 4,0%, cerca de 4,5%, cerca de 5%, cerca de 5,5% ou cerca de 6,0%. Em aspectos exemplificativos, o nível de glicanas TAF é cerca de 2% até cerca de 5% ou cerca de 2% até cerca de 4%.

**[0061]**      Em aspectos exemplificativos dos métodos de produção de uma composição de proteína glicosilada recombinante (por exemplo, uma composição de anticorpo ou composição de proteína de ligação a anticorpos), fucose está presente no meio de cultura a uma concentração situada entre cerca de 0,1 g/L e cerca de 1,0 g/L, ou entre cerca de 0,17 g/L e cerca de 1,0 g/L, e o nível de glicanas TAF na composição é menor do que cerca de 10%.

**[0062]** Em modalidades exemplificativas, os métodos revelados aqui produzem uma composição de proteína glicosilada recombinante (por exemplo, uma composição de anticorpo ou composição de proteína de ligação a anticorpos), em que o nível de glicanas ricas em manose na composição de anticorpo é menor do que ou cerca de 3,5%, por exemplo, menor do que ou cerca de 3,25%, menor do que ou cerca de 3,0%, menor do que ou cerca de 2,5%, menor do que ou cerca de 2,0%. Em aspectos exemplificativos, o nível de glicanas ricas em manose na composição de anticorpo é cerca de 0,7% até cerca de 3,0%, opcionalmente cerca de 0,7%, cerca de 0,8%, cerca de 0,9%, cerca de 1,0%, cerca de 1,1%, cerca de 1,2%, cerca de 1,3%, cerca de 1,4%, cerca de 1,5%, cerca de 1,6%, cerca de 1,7%, cerca de 1,8%, cerca de 1,9%, cerca de 2,0%, cerca de 2,1%, cerca de 2,2%, cerca de 2,3%, cerca de 2,4%, cerca de 2,5%, cerca de 2,6%, cerca de 2,7%, cerca de 2,8%, cerca de 2,9% ou cerca de 3,0%.

**[0063]** Em modalidades exemplificativas, os métodos revelados aqui produzem uma composição de proteína glicosilada recombinante (por exemplo, uma composição de anticorpo ou composição de proteína de ligação a anticorpos), em que o nível de glicanas afucosiladas na composição de anticorpo é menor do que ou cerca de 3,5%, por exemplo, menor do que ou cerca de 3,25%, menor do que ou cerca de 3,0%, menor do que ou cerca de 2,5%, menor do que ou cerca de 2,0%. Em aspectos exemplificativos, o nível de glicanas afucosiladas na composição de anticorpo é cerca de 0,8% até cerca de 2,8%, opcionalmente cerca de 0,8%, cerca de 0,9%, cerca de 1,0%, cerca de 1,1%, cerca de 1,2%, cerca de 1,3%, cerca de 1,4%, cerca de 1,5%, cerca de 1,6%,

cerca de 1,7%, cerca de 1,8%, cerca de 1,9%, cerca de 2,0%, cerca de 2,1%, cerca de 2,2%, cerca de 2,3%, cerca de 2,4%, cerca de 2,5%, cerca de 2,6%, cerca de 2,7% ou cerca de 2,8%.

**[0064]** *Métodos de medição de glicoformas*

**[0065]** São conhecidos na técnica vários métodos para avaliar glicoformas presentes em uma composição contendo glicoproteínas ou para determinar, detectar ou medir um perfil de glicoformas de uma amostra particular compreendendo glicoproteínas. Métodos adequados incluem, mas sem limitação, análise MALDI-TOF com íons positivos, análise MALDI-TOF com íons negativos, cromatografia de troca aniônica fraca (WAX), cromatografia de fase normal (NP-HPLC), digestão com exoglicosidases, cromatografia com Bio-Gel P-4, cromatografia de troca aniônica e espectroscopia de r.m.n. unidimensional, e suas combinações. Ver, por exemplo, Mattu *et al.*, *JBC* 273: 2260-2272 (1998); Field *et al.*, *Biochem J* 299(Parte 1): 261-275 (1994); Yoo *et al.*, *MAbs* 2(3): 320-334 (2010) Wuhrer M. *et al.*, *Journal of Chromatography B*, 2005, Vol.825, Fascículo 2, páginas 124-133; Ruhaak L.R., *Anal Bioanal Chem*, 2010, Vol. 397:3457-3481 e Geoffrey, R. G. *et al. Analytical Biochemistry* 1996, Vol. 240, páginas 210-226. Além disso, os exemplos apresentados aqui descrevem um método adequado para avaliar glicoformas presentes em uma composição contendo glicoproteínas.

**[0066]** No que se refere à revelação, a cultura de células pode ser mantida de acordo com qualquer conjunto de condições adequadas para a produção de uma proteína

glicosilada recombinante. Por exemplo, em alguns aspectos, a cultura de células é mantida a um pH, temperatura, densidade celular, volume da cultura, nível de oxigênio dissolvido, pressão, osmolalidade particulares, e similares. Em aspectos exemplificativos, a cultura de células antes da inoculação é agitada (por exemplo, a 70 rpm) a 5% de CO<sub>2</sub> sob condições umidificadas padrão em uma incubadora de CO<sub>2</sub>. Em aspectos exemplificativos, a cultura de células é inoculada com uma densidade de sementes de cerca de 10<sup>6</sup> células/mL em 1,5 L de meio.

**[0067]** Em aspectos exemplificativos, os métodos da revelação compreendem manter as células competentes para glicosilação em um meio de cultura de células a um pH de cerca de 6,85 até cerca de 7,05, por exemplo, em vários aspectos, cerca de 6,85, cerca de 6,86, cerca de 6,87, cerca de 6,88, cerca de 6,89, cerca de 6,90, cerca de 6,91, cerca de 6,92, cerca de 6,93, cerca de 6,94, cerca de 6,95, cerca de 6,96, cerca de 6,97, cerca de 6,98, cerca de 6,99, cerca de 7,00, cerca de 7,01, cerca de 7,02, cerca de 7,03, cerca de 7,04 ou cerca de 7,05. Em alguns aspectos, o meio de cultura de células tem um pH de cerca de 6,9 até cerca de 7,0.

**[0068]** Em aspectos exemplificativos, os métodos compreendem manter a cultura de células a uma temperatura situada entre 30 °C e 40 °C. Em modalidades exemplificativas, a temperatura está situada entre cerca de 32 °C e cerca de 38 °C ou entre cerca de 35 °C e cerca de 38 °C.

**[0069]** Em aspectos exemplificativos, os métodos compreendem manter a osmolalidade entre cerca de 200 mOsm/kg e cerca de 500 mOsm/kg. Em aspectos exemplificativos, o método compreende manter a osmolalidade entre cerca de 225 mOsm/kg e cerca de 400 mOsm/kg ou cerca de 225 mOsm/kg e cerca de 375 mOsm/kg. Em aspectos exemplificativos, o método compreende manter a osmolalidade entre cerca de 225 mOsm/kg e cerca de 350 mOsm/kg. Em vários aspectos, a osmolalidade (mOsm/kg) é mantida a cerca de 200, 225, cerca de 250, cerca de 275, cerca de 300, cerca de 325, cerca de 350, cerca de 375, cerca de 400, cerca de 425, cerca de 450, cerca de 475 ou cerca de 500.

**[0070]** Em aspectos exemplificativos, os métodos compreendem manter o nível de oxigênio dissolvido (DO) da cultura de células a cerca de 20% até cerca de 60% de saturação de oxigênio durante o período inicial da cultura de células. Em casos exemplificativos, o método compreende manter o nível de DO da cultura de células a cerca de 30% até cerca de 50% (por exemplo, cerca de 35% até cerca de 45%) de saturação de oxigênio durante o período inicial da cultura de células. Em casos exemplificativos, o método compreende manter o nível de DO da cultura de células a cerca de 20%, cerca de 25%, cerca de 30%, cerca de 35%, cerca de 40%, cerca de 45%, cerca de 50%, cerca de 55% ou cerca de 60% de saturação de oxigênio durante o período inicial da cultura de células. Em aspectos exemplificativos, o nível de DO é cerca de 35 mm Hg até cerca de 85 mmHg ou cerca de 40 mm Hg até cerca de 80 mmHg ou cerca de 45 mm Hg até cerca de 75 mm Hg.

**[0071]** A cultura de células é mantida em qualquer um ou mais meios de cultura. Em aspectos exemplificativos, a cultura de células é mantida em um meio adequado para o crescimento celular e/ou é dotada de um ou mais meios de alimentação de acordo com qualquer calendarização de alimentação adequada. Em aspectos exemplificativos, o método compreende manter a cultura de células em um meio compreendendo glicose, lactato, amônia, glutamina e/ou glutamato. Em aspectos exemplificativos, o método compreende manter a cultura de células em um meio compreendendo manganês a uma concentração menor do que ou cerca de 1  $\mu\text{M}$  durante o período inicial da cultura de células. Em aspectos exemplificativos, o método compreende manter a cultura de células em um meio compreendendo cerca de 0,25  $\mu\text{M}$  até cerca de 1  $\mu\text{M}$  de manganês. Em aspectos exemplificativos, o método compreende manter a cultura de células em um meio compreendendo quantidades desprezáveis de manganês. Em aspectos exemplificativos, o método compreende manter a cultura de células em um meio compreendendo cobre a uma concentração menor do que ou cerca de 50 ppb durante o período inicial da cultura de células. Em aspectos exemplificativos, o método compreende manter a cultura de células em um meio compreendendo cobre a uma concentração menor do que ou cerca de 40 ppb durante o período inicial da cultura de células. Em aspectos exemplificativos, o método compreende manter a cultura de células em um meio compreendendo cobre a uma concentração menor do que ou cerca de 30 ppb durante o período inicial da cultura de células. Em aspectos exemplificativos, o método compreende manter a cultura de células em um meio

compreendendo cobre a uma concentração menor do que ou cerca de 20 ppb durante o período inicial da cultura de células. Em aspectos exemplificativos, o meio compreende cobre a uma concentração maior do que ou cerca de 5 ppb ou maior do que ou cerca de 10 ppb. Em aspectos exemplificativos, o meio de cultura de células compreende manose. Em aspectos exemplificativos, o meio de cultura de células não compreende manose.

**[0072]** Em modalidades exemplificativas, o tipo de cultura de células é uma cultura descontínua ou uma cultura de perfusão contínua. No entanto, os métodos da revelação vantajosamente não estão limitados a nenhum tipo particular de cultura de células.

**[0073]** *Células*

**[0074]** A revelação se relaciona com métodos de produção de uma composição de proteína glicosilada recombinante (por exemplo, uma composição de anticorpo ou composição de proteína de ligação a anticorpos), compreendendo manter células competentes para glicosilação em um meio de cultura de células. Em aspectos exemplificativos, as células competentes para glicosilação são células eucarióticas, incluindo, mas sem limitação, células de levedura, células de fungos filamentosos, células de protozoário, células de alga, células de inseto, ou células de mamífero. Tais células hospedeiras são descritas na técnica. Ver, p.ex., Frenzel, *et al.*, *Front Immunol* 4: 217 (2013). Em aspectos exemplificativos, as células eucarióticas são células de mamífero. Em aspectos exemplificativos, as células de mamífero são células de mamífero não humano. Em alguns

aspectos, as células são células de Ovário de Hamster Chinês (CHO) e seus derivados (p.ex., CHO-K1, CHO pro-3), células de mieloma de camundongo (p.ex., NS0, GS-NS0, Sp2/0), células manipuladas para serem deficientes na atividade de di-hidrofolatorredutase (DHFR) (p.ex., DUKX-X11, DG44), células 293 renais embriônicas humanas (HEK293) ou seus derivados (p.ex., HEK293T, HEK293-EBNA), células renais de macaco-africano verde (p.ex., células COS, células VERO), células de câncer cervical humano (p.ex., HeLa), células epiteliais de osteossarcoma ósseo humano U2-OS, células epiteliais basais alveolares humanas adenocarcinômicas A549, células de fibrossarcoma humano HT1080, células de tumor do cérebro humano CAD, células de carcinoma embriônico P19, fibroblastos de embrião de camundongo NIH 3T3, fibroblastos de camundongo L929, células de neuroblastoma de camundongo N2a, células de câncer da mama humano MCF-7, células de retinoblastoma Y79, células de retinoblastoma humano SO-Rb50, células de câncer do fígado humano Hep G2, células de mieloma B de camundongo J558L ou células renais de hamster bebê (BHK) (Gaillet *et al.* 2007; Khan, *Adv Pharm Bull* 3 (2): 257-263 (2013)).

**[0075]** Células que não são competentes para glicosilação também podem ser transformadas em células competentes para glicosilação, por exemplo, transfectando as mesmas com genes codificando enzimas relevantes necessárias para a glicosilação. Enzimas exemplificativas incluem, mas sem limitação, oligossacariltransferases, glicosidases, glucosidase I, glucosidase II, calnexina/calreticulina, glicosiltransferases, manosidases,

GlcNAc transferases, galactosiltransferases e sialiltransferases.

**[0076]** Em modalidades exemplificativas, as células competentes para glicosilação não são geneticamente modificadas para alterar a atividade de uma enzima da via *de novo* ou da via de salvamento. Estas duas vias do metabolismo da fucose são mostradas na Figura 2. Em modalidades exemplificativas, as células competentes para glicosilação não são geneticamente modificadas para alterar a atividade de qualquer uma ou mais de: uma fucosiltransferase (FUT, por exemplo, FUT1, FUT2, FUT3, FUT4, FUT5, FUT6, FUT7, FUT8, FUT9), uma fucose cinase, uma GDP-fucose pirofosforilase, GDP-D-manose-4,6-desidratase (GMD), e GDP-ceto-6-desoximanose-3,5-epimerase, 4-redutase (FX). Em modalidades exemplificativas, as células competentes para glicosilação não são geneticamente modificadas para nocaute de um gene codificando FX.

**[0077]** Em modalidades exemplificativas, as células competentes para glicosilação não são geneticamente modificadas para alterar a atividade de  $\beta(1,4)$ -N-acetilglucosaminiltransferase III (GNTIII) ou GDP-6-desoxi-D-lixo-4-hexulose redutase (RMD). Em aspectos exemplificativos, as células competentes para glicosilação não são geneticamente modificadas para sobre-expressar GNTIII ou RMD.

**[0078]** *Proteínas glicosiladas recombinantes*

**[0079]** Em modalidades exemplificativas, a proteína glicosilada recombinante compreende uma sequência de

aminoácidos compreendendo uma ou mais sequências de consenso de N-glicosilação de fórmula:



em que Xaa<sub>1</sub> é qualquer aminoácido exceto Pro, e Xaa<sub>2</sub> é Ser ou Thr.

**[0080]** Em modalidades exemplificativas, a proteína glicosilada recombinante compreende um polipeptídeo de fragmento cristalizável (Fc). O termo “polipeptídeo Fc”, como usado aqui, inclui formas nativas e de muteína de polipeptídeos derivados da região Fc de um anticorpo. Formas truncadas de tais polipeptídeos contendo a região de dobradiça que promove a dimerização também estão incluídas. Proteínas de fusão compreendendo frações Fc (e oligômeros formados a partir dessas) oferecem a vantagem purificação fácil por cromatografia de afinidade em colunas de Proteína A ou Proteína G. Em modalidades exemplificativas, a proteína glicosilada recombinante compreende o Fc de uma IgG, por exemplo, uma IgG humana. Em aspectos exemplificativos, a proteína glicosilada recombinante compreende o Fc de uma IgG1 ou IgG2. Em aspectos exemplificativos, a proteína glicosilada recombinante é um anticorpo, um produto proteico de anticorpo, um peptícorpo ou uma proteína de fusão com Fc.

**[0081]** Em aspectos exemplificativos, a proteína glicosilada recombinante é um anticorpo. Como usado aqui, o termo “anticorpo” se relaciona com uma proteína tendo um formato de imunoglobulina convencional, compreendendo cadeias pesadas e leves e compreendendo regiões variáveis e constantes. Por exemplo, um anticorpo pode ser uma IgG que

é uma estrutura “em forma de Y” de dois pares idênticos de cadeias polipeptídicas, tendo cada par uma cadeia “leve” (tendo tipicamente um peso molecular de cerca de 25 kDa) e uma “pesada” (tendo tipicamente um peso molecular de cerca de 50-70 kDa). Um anticorpo tem uma região variável e uma região constante. Em formatos de IgG, a região variável tem geralmente cerca de 100-110 ou mais aminoácidos, compreende três regiões determinantes da complementaridade (CDRs), é maioritariamente responsável pelo reconhecimento de antígenos e varia substancialmente entre outros anticorpos que se ligam a diferentes antígenos. Ver, p.ex., Janeway *et al.*, “*Structure of the Antibody Molecule and the Immunoglobulin Genes*”, *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*, 4ª ed. Elsevier Science Ltd./Garland Publishing (1999).

**[0082]** Brevemente, em um molde de anticorpo, as CDRs estão embutidas dentro de um arcabouço na região variável de cadeia pesada e leve onde constituem as regiões largamente responsáveis pela ligação e reconhecimento de antígenos. Uma região variável compreende pelo menos três CDRs de cadeia pesada ou leve (Kabat *et al.*, 1991, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Public Health Service N.I.H., Bethesda, Md.; ver também Chothia e Lesk, 1987, *J. Mol. Biol.* 196: 901-917; Chothia *et al.*, 1989, *Nature* 342: 877-883), dentro de uma região de arcabouço (designadas regiões de arcabouço 1-4, FR1, FR2, FR3 e FR4, por Kabat *et al.*, 1991; ver também Chothia e Lesk, 1987, *supra*).

**[0083]** As cadeias leves humanas são tipicamente classificadas como cadeias leves  $\kappa$  e  $\lambda$ . As cadeias pesadas são classificadas como  $\mu$ ,  $\delta$ ,  $\gamma$ ,  $\alpha$  ou  $\epsilon$  e definem o isótipo do anticorpo como IgM, IgD, IgG, IgA e IgE, respectivamente. A IgG tem várias subclasses, incluindo, mas não se limitando a, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. A IgM tem subclasses, incluindo, mas não se limitando a, IgM1 e IgM2. As modalidades da divulgação incluem todas essas classes ou isótipos de anticorpos. A região constante de cadeia leve pode ser, por exemplo, uma região constante de cadeia leve tipo  $\kappa$  ou  $\lambda$ , p.ex., uma região constante de cadeia leve tipo  $\kappa$  ou  $\lambda$  humana. A região constante de cadeia pesada pode ser, por exemplo, uma região constante de cadeia pesada tipo  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$  ou  $\mu$ , p.ex., uma região constante de cadeia pesada tipo  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$  ou  $\mu$  humana. Conformemente, em modalidades exemplificativas, o anticorpo é um anticorpo do isótipo IgA, IgD, IgE, IgG ou IgM, incluindo qualquer um de IgG1, IgG2, IgG3 ou IgG4.

**[0084]** Em vários aspectos, o anticorpo pode ser um anticorpo monoclonal ou um anticorpo policlonal. Em alguns aspectos, o anticorpo compreende uma sequência que é substancialmente similar a um anticorpo ocorrendo naturalmente produzido por um mamífero, p.ex., camundongo, rato, coelho, cabra, cavalo, galinha, hamster, porco, humano e similares. A este respeito, o anticorpo pode ser considerado como um anticorpo de mamífero, p.ex., um anticorpo de camundongo, anticorpo de rato, anticorpo de coelho, anticorpo de cabra, anticorpo de cavalo, anticorpo de galinha, anticorpo de hamster, anticorpo de porco,

anticorpo humano e similares. Em certos aspectos, a proteína glicosilada recombinante é um anticorpo monoclonal humano. Em certos aspectos, a proteína glicosilada recombinante é um anticorpo quimérico ou um anticorpo humanizado. O termo “anticorpo quimérico” é usado aqui para se referir a um anticorpo contendo domínios constantes de uma espécie e os domínios variáveis de uma segunda ou, mais geralmente, contendo trechos de sequências de aminoácidos de pelo menos duas espécies. O termo “humanizado”, quando usado em relação a anticorpos, se refere a anticorpos tendo pelo menos regiões CDR de uma fonte não humana que são manipulados para terem uma estrutura e função imunológica mais similares a anticorpos humanos verdadeiros do que os anticorpos originais da fonte. Por exemplo, a humanização pode envolver enxerto de CDR de um anticorpo não humano, tal como um anticorpo de camundongo, em um anticorpo humano. A humanização pode também envolver selecionar substituições de aminoácidos para fazer com que uma sequência não humana se pareça mais como uma sequência humana.

**[0085]** Um anticorpo, em vários aspectos, é clivado em fragmentos por enzimas, tais como, p.ex., papaína e pepsina. A papaína cliva um anticorpo para produzir dois fragmentos Fab e um único fragmento Fc. Pepsina procede à clivagem de um anticorpo para produzir um fragmento  $F(ab')_2$  e um fragmento  $pFc'$ . Em aspectos exemplificativos, a proteína glicosilada recombinante é um fragmento de anticorpo, por exemplo, um Fab, Fc,  $F(ab')_2$  ou um  $pFc'$ , que retém pelo menos um sítio de glicosilação. No que diz respeito aos métodos da divulgação, o anticorpo pode não

ter certas porções de um anticorpo, e pode ser um fragmento de anticorpo. Em vários aspectos, o fragmento de anticorpo compreende um sítio de glicosilação. Em alguns aspectos, o fragmento é um "Fragmento Fc Glicosilado" que compreende pelo menos uma porção da região Fc de um anticorpo que é glicosilada de modo pós-tradução em células eucarióticas.

**[0086]** A arquitetura de anticorpos tem sido explorada para criar uma gama crescente de formatos alternativos de anticorpos que abrange uma gama de pesos moleculares de pelo menos ou cerca de 12-150 kDa e uma gama de valências (n) desde monomérica (n = 1), dimérica (n = 2) e trimérica (n = 3) até tetramérica (n = 4) e potencialmente mais elevada; tais formatos alternativos de anticorpos são referidos aqui como "produtos proteicos de anticorpos" ou "proteínas de ligação a anticorpos".

**[0087]** Os produtos de proteínas de anticorpos podem ter um formato de ligação a antígenos baseado em fragmentos de anticorpos, p.ex., scFvs, Fabs e VHH/VH, que retêm a capacidade total de ligação a antígenos. O fragmento de ligação a antígenos mais pequeno que retém seu local de ligação a antígenos completo é o fragmento Fv, que consiste inteiramente em regiões variáveis (V). Um ligante de peptídeo de aminoácidos flexível, solúvel é usado para conectar as regiões V a um fragmento scFv (variável de fragmento de cadeia única) para estabilização da molécula, ou os domínios constantes (C) são adicionados às regiões V para gerar um fragmento Fab [fragmento, ligação a antígenos]. Tanto scFv como Fab são fragmentos amplamente usados que podem ser facilmente produzidos em hospedeiros

procarióticos. Outros produtos proteicos de anticorpos incluem scFv estabilizado por ligações dissulfeto (ds-scFv), Fab de cadeia única (scFab), bem como formatos de anticorpos di- e multiméricos, como dia-, tria- e tetracorpos, ou minicorpos (miniAbs) que compreendem diferentes formatos consistindo em scFvs ligados a domínios de oligomerização. Os fragmentos mais pequenos são VHH/VH de Abs de cadeia pesada de camelídeo, bem como Abs de domínio único (sdAb). O bloco de construção que é o mais frequentemente usado para criar novos formatos de anticorpos é o fragmento de anticorpo de domínio variável (V) de cadeia única (scFv), que compreende domínios V da cadeia pesada e leve (domínio VH e VL) ligados por um ligante de peptídeo de ~15 resíduos de aminoácidos. Um pepticorpo ou fusão peptídeo-Fc é ainda outro produto proteico de anticorpo. A estrutura de um pepticorpo consiste em um peptídeo biologicamente ativo enxertado em um domínio Fc. Os pepticorpos estão bem descritos na técnica. Ver, p.ex., Shimamoto *et al.*, *mAbs* 4 (5): 586-591 (2012).

**[0088]** Outros produtos proteicos de anticorpos incluem um anticorpo de cadeia única (SCA); um diacorpo; um triacorpo; um tetracorpo; anticorpos biespecíficos ou triespecíficos e similares. Os anticorpos biespecíficos podem ser divididos em cinco classes principais: BsIgG, IgG pendente, fragmentos de BsAb, proteínas de fusão biespecíficas e conjugados de BsAb. Ver, p.ex., Spiess *et al.*, *Molecular Immunology* 67 (2) Parte A: 97-106 (2015).

**[0089]** Em aspectos exemplificativos, a proteína glicosilada recombinante compreende qualquer um destes produtos proteicos de anticorpos (por exemplo, scFv, Fab VHH/VH, fragmento Fv, ds-scFv, scFab, anticorpo dimérico, anticorpo multimérico (por exemplo, um diacorpo, triacorpo, tetracorpo), miniAb, pepticorpo VHH/VH de anticorpo de cadeia pesada de camelídeo, sdAb, diacorpo; um triacorpo; um tetracorpo; um anticorpo biespecífico ou triespecífico, BsIgG, IgG pendente, fragmento BsAb, proteína de fusão biespecífica, e conjugado de BsAb) e compreende uma ou mais sequências de consenso de N-glicosilação, opcionalmente um ou mais polipeptídeos Fc. Em vários aspectos, o produto proteico de anticorpo compreende um sítio de glicosilação. Em aspectos exemplificativos, um produto proteico de anticorpo pode ser um Fragmento Fc Glicosilado conjugado a um fragmento de ligação a anticorpo ("produto de anticorpo de Fragmento Fc Glicosilado").

**[0090]** A proteína glicosilada recombinante pode ser um produto proteico de anticorpo em forma monomérica, ou forma polimérica, oligomérica ou multimérica. Em certas modalidades nas quais o anticorpo compreende dois ou mais fragmentos de regiões de ligação a antígenos distintos, o anticorpo é considerado biespecífico, triespecífico ou multiespecífico, ou bivalente, trivalente ou multivalente, dependendo do número de epítomos distintos que são reconhecidos e ligados pelo anticorpo.

**[0091]** Vantajosamente, os métodos não estão limitados à especificidade para antígenos do anticorpo. Em conformidade, o anticorpo tem qualquer especificidade de

ligação para virtualmente qualquer antígeno. Em aspectos exemplificativos, o anticorpo se liga a um hormônio, fator de crescimento, citocina, um receptor da superfície celular, ou qualquer seu ligante. Em aspectos exemplificativos, o anticorpo se liga a uma proteína expressa na superfície celular de uma célula imune. Em aspectos exemplificativos, o anticorpo se liga a um agregado de moléculas de diferenciação selecionadas do grupo consistindo em: CD1a, CD1b, CD1c, CD1d, CD2, CD3, CD4, CD5, CD6, CD7, CD8, CD9, CD10, CD11A, CD11B, CD11C, CDw12, CD13, CD14, CD15, CD15s, CD16, CDw17, CD18, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD24, CD25, CD26, CD27, CD28, CD29, CD30, CD31, CD32, CD33, CD34, CD35, CD36, CD37, CD38, CD39, CD40, CD41, CD42a, CD42b, CD42c, CD42d, CD43, CD44, CD45, CD45R0, CD45RA, CD45RB, CD46, CD47, CD48, CD49a, CD49b, CD49c, CD49d, CD49e, CD49f, CD50, CD51, CD52, CD53, CD54, CD55, CD56, CD57, CD58, CD59, CDw60, CD61, CD62E, CD62L, CD62P, CD63, CD64, CD65, CD66a, CD66b, CD66c, CD66d, CD66e, CD66f, CD68, CD69, CD70, CD71, CD72, CD73, CD74, CD75, CD76, CD79 $\alpha$ , CD79 $\beta$ , CD80, CD81, CD82, CD83, CDw84, CD85, CD86, CD87, CD88, CD89, CD90, CD91, CDw92, CD93, CD94, CD95, CD96, CD97, CD98, CD99, CD100, CD101, CD102, CD103, CD104, CD105, CD106, CD107a, CD107b, CDw108, CD109, CD114, CD 115, CD116, CD117, CD118, CD119, CD120a, CD120b, CD121a, CDw121b, CD122, CD123, CD124, CD125, CD126, CD127, CDw128, CD129, CD130, CDw131, CD132, CD134, CD135, CDw136, CDw137, CD138, CD139, CD140a, CD140b, CD141, CD142, CD143, CD144, CD145, CD146, CD147, CD148, CD150, CD151, CD152, CD153, CD154, CD155, CD156, CD157, CD158a, CD158b, CD161, CD162, CD163, CD164, CD165, CD166, e CD182.

[0092] Em aspectos exemplificativos, o anticorpo é um dos descritos na Patente U.S. No.7947809 e Publicação do Pedido de Patente U.S. No. 20090041784 (receptor de glucagon), Patente U.S. No. 7939070, Patente U.S. No. 7833527, Patente U.S. No. 7767206 e Patente U.S. No. 7786284 (receptor de IL-17 A), Patente U.S. No. 7872106 e Patente U.S. No. 7592429 (Esclerostina), Patente U.S. No. 7871611, Patente U.S. No. 7815907, Patente U.S. No. 7037498, Patente U.S. No. 7700742, e Publicação do Pedido de Patente U.S. No. 20100255538 (receptor de IGF-1), Patente U.S. No. 7868140 (B7RP1), Patente U.S. No. 7807159 e Publicação do Pedido de Patente U.S. No. 20110091455 (miostatina), Patente U.S. No. 7736644, Patente U.S. No. 7628986, Patente U.S. No. 7524496, e Publicação do Pedido de Patente U.S. No. 20100111979 (mutantes de deleção do receptor do fator de crescimento epidérmico), Patente U.S. No. 7728110 (coronavírus SARS), Patente U.S. No. 7718776 e Publicação do Pedido de Patente U.S. No. 20100209435 (OPGL), Patente U.S. No. 7658924 e Patente U.S. No. 7521053 (Angiopoietina-2), Patente U.S. No. 7601818, Patente U.S. No. 7795413, Publicação do Pedido de Patente U.S. No. 20090155274, Publicação do Pedido de Patente U.S. No. 20110040076 (NGF), Patente U.S. No. 7579186 (receptor de TGF- $\beta$  tipo II), Patente U.S. No. 7541438 (fator de crescimento do tecido conjuntivo), Patente U.S. No. 7438910 (IL1-R1), Patente U.S. No. 7423128 (properdina), Patente U.S. No. 7411057, Patente U.S. No. 7824679, Patente U.S. No. 7109003, Patente U.S. No. 6682736, Patente U.S. No. 7132281, e Patente U.S. No. 7807797 (CTLA-4), Patente U.S. No. 7084257, Patente U.S. No. 7790859, Patente U.S. No.

7335743, Patente U.S. No. 7084257, e Publicação do Pedido de Patente U.S. No. 20110045537 (interferon-gama), Patente U.S. No. 7932372 (MAdCAM), Patente U.S. No. 7906625, Publicação do Pedido de Patente U.S. No. 20080292639, e Publicação do Pedido de Patente U.S. No. 20110044986 (amiloide), Patente U.S. No. 7815907 e Patente U.S. No. 7700742 (fator de crescimento do tipo insulina I), Patente U.S. No. 7566772 e Patente U.S. No. 7964193 (interleucina-1 $\beta$ ), Patente U.S. No. 7563442, Patente U.S. No. 7288251, Patente U.S. No. 7338660, Patente U.S. No. 7626012, Patente U.S. No. 7618633, e Publicação do Pedido de Patente U.S. No. 20100098694 (CD40), Patente U.S. No. 7498420 (c-Met), Patente U.S. No. 7326414, Patente U.S. No. 7592430, e Patente U.S. No. 7728113 (M-CSF), Patente U.S. No. 6924360, Patente U.S. No. 7067131, e Patente U.S. No. 7090844 (MUC18), Patente U.S. No. 6235883, Patente U.S. No. 7807798, e Publicação do Pedido de Patente U.S. No. 20100305307 (receptor do fator de crescimento epidérmico), Patente U.S. No. 6716587, Patente U.S. No. 7872113, Patente U.S. No. 7465450, Patente U.S. No. 7186809, Patente U.S. No. 7317090, e Patente U.S. No. 7638606 (receptor de interleucina-4 ), Publicação do Pedido de Patente U.S. No. 20110135657 (BETA-KLOTH0), Patente U.S. No. 7887799 e Patente U.S. No. 7879323 (polipeptídeos do tipo fator de crescimento de fibroblastos), Patente U.S. No. 7867494 (IgE), Publicação do Pedido de Patente U.S. No. 20100254975 (ALFA-4 BETA-7), Publicação do Pedido de Patente U.S. No. 20100197005 e Patente U.S. No. 7537762 (CINASE-1 DO TIPO RECEPTOR DE ACTIVINA), Patente U.S. No. 7585500 e Publicação do Pedido de Patente U.S. No. 20100047253 (IL-

13), Publicação do Pedido de Patente U.S. No. 20090263383 e Patente U.S. No. 7449555 (CD148), Publicação do Pedido de Patente U.S. No. 20090234106 (ACTIVINA A), Publicação do Pedido de Patente U.S. No. 20090226447 (angiopoietina-1 e angiopoietina-2), Publicação do Pedido de Patente U.S. No. 20090191212 (Angiopoietina-2), Publicação do Pedido de Patente U.S. No. 20090155164 (C-FMS), Patente U.S. No. 7537762 (cinase-1 do tipo receptor de activina), Patente U.S. No. 7371381 (galanina), Publicação do Pedido de Patente U.S. No. 20070196376 (FATORES DE CRESCIMENTO DO TIPO INSULINA), Patente U.S. No. 7267960 e Patente U.S. No. 7741115 (LDCAM), US7265212 (CD45RB), Patente U.S. No. 7709611, Publicação do Pedido de Patente U.S. No. 20060127393 e Publicação do Pedido de Patente U.S. No. 20100040619 (DKK1), Patente U.S. No. 7807795, Publicação do Pedido de Patente U.S. No. 20030103978 e Patente U.S. No. 7923008 (osteoprotegerina), Publicação do Pedido de Patente U.S. No. 20090208489 (OV064), Publicação do Pedido de Patente U.S. No. 20080286284 (PSMA), Patente U.S. No. 7888482, Publicação do Pedido de Patente U.S. No. 20110165171, e Publicação do Pedido de Patente U.S. No. 20110059063 (PAR2), Publicação do Pedido de Patente U.S. No. 20110150888 (HEPCIDINA), Patente U.S. No. 7939640 (B7L-1), Patente U.S. No. 7915391 (c-Kit), Patente U.S. No. 7807796, Patente U.S. No. 7193058, e Patente U.S. No. 7427669 (ULBP), Patente U.S. No. 7786271, Patente U.S. No. 7304144, e Publicação do Pedido de Patente U.S. No. 20090238823 (TSLP), Patente U.S. No. 7767793 (SIGIRR), Patente U.S. No. 7705130 (HER-3), Patente U.S. No. 7704501 (polipeptídeo do tipo ataxina-1), Patente U.S. No. 7695948

e Patente U.S. No. 7199224 (enzima conversora de TNF- $\alpha$ ),  
Publicação do Pedido de Patente U.S. No. 20090234106  
(ACTIVINA A), Publicação do Pedido de Patente U.S. No.  
20090214559 e Patente U.S. No. 7438910 (IL1-R1), Patente  
U.S. No. 7579186 (receptor do TGF- $\beta$  tipo II), Patente U.S.  
No. 7569387 (moléculas do tipo receptor do TNF), Patente  
U.S. No. 7541438, (fator de crescimento do tecido  
conjuntivo), Patente U.S. No. 7521048 (receptor de TRAIL-  
2), Patente U.S. No. 6319499, Patente U.S. No. 7081523, e  
Publicação do Pedido de Patente U.S. No. 20080182976  
(receptor de eritropoietina), Publicação do Pedido de  
Patente U.S. No. 20080166352 e Patente U.S. No. 7435796  
(B7RP1), Patente U.S. No. 7423128 (properdina), Patente  
U.S. No. 7422742 e Patente U.S. No. 7141653 (interleucina-  
5), Patente U.S. No. 6740522 e Patente U.S. No. 7411050  
(RANKL), Patente U.S. No. 7378091 (antígeno tumoral de  
anidrase carbônica IX (CA IX)), Patente U.S. No. 7318925 e  
Patente U.S. No. 7288253 (hormônio da paratireoide),  
Patente U.S. No. 7285269 (TNF), Patente U.S. No. 6692740 e  
Patente U.S. No. 7270817 (ACPL), Patente U.S. No. 7202343  
(proteína quimioatratadora de monócitos-1), Patente U.S. No.  
7144731 (SCF), Patente U.S. No. 6355779 e Patente U.S. No.  
7138500 (4-1BB), Patente U.S. No. 7135174 (PDGFD), Patente  
U.S. No. 6630143 e Patente U.S. No. 7045128 (ligante de  
Flt-3), Patente U.S. No. 6849450 (inibidor de  
metaloproteinase), Patente U.S. No. 6596852 (LERK-5),  
Patente U.S. No. 6232447 (LERK-6), Patente U.S. No. 6500429  
(fator neurotrófico derivado do cérebro), Patente U.S. No.  
6184359 (fator de células T derivado do epitélio), Patente  
U.S. No. 6143874 (fator neurotrófico NNT-1), Publicação do

Pedido de Patente U.S. No. 20110027287 (PROPROTEÍNA CONVERTASE SUBTILISINA QUEXINA DO TIPO 9 (PCSK9)), Publicação do Pedido de Patente U.S. No. 20110014201 (RECEPTOR DE IL-18), e Publicação do Pedido de Patente U.S. No. 20090155164 (C-FMS). As patentes e pedidos de patentes publicados acima são incorporados aqui a título de referência na sua totalidade para propósitos da sua revelação de polipeptídeos de domínio variável, ácidos nucleicos codificando domínios variáveis, células hospedeiras, vetores, métodos de fabricação de polipeptídeos codificando os referidos domínios variáveis, composições farmacêuticas, e métodos de tratamento de doenças associadas ao respectivo alvo da proteína ou anticorpo de ligação a antígenos contendo domínio variável.

**[0093]** Em modalidades exemplificativas, o anticorpo é um de Muromonab-CD3 (produto comercializado com a marca registrada Orthoclone Okt3®), Abciximab (produto comercializado com a marca registrada Reopro®), Rituximab (produto comercializado com a marca registrada MabThera®, Rituxan®), Basiliximab (produto comercializado com a marca registrada Simulect®), Daclizumab (produto comercializado com a marca registrada Zenapax®), Palivizumab (produto comercializado com a marca registrada Synagis®), Infliximab (produto comercializado com a marca registrada Remicade®), Trastuzumab (produto comercializado com a marca registrada Herceptin®), Alemtuzumab (produto comercializado com a marca registrada MabCampath®, Campath-1H®), Adalimumab (produto comercializado com a marca registrada Humira®), Tositumomab-I131 (produto comercializado com a marca registrada Bexxar®), Efalizumab (produto comercializado com a marca

registrada Raptiva®), Cetuximab (produto comercializado com a marca registrada Erbitux®), I'Ibritumomab tiuxetano (produto comercializado com a marca registrada Zevalin®), I'Omalizumab (produto comercializado com a marca registrada Xolair®), Bevacizumab (produto comercializado com a marca registrada Avastin®), Natalizumab (produto comercializado com a marca registrada Tysabri®), Ranibizumab (produto comercializado com a marca registrada Lucentis®), Panitumumab (produto comercializado com a marca registrada Vectibix®), I'Eculizumab (produto comercializado com a marca registrada Soliris®), Certolizumab pegol (produto comercializado com a marca registrada Cimzia®), Golimumab (produto comercializado com a marca registrada Simponi®), Canaquinumab (produto comercializado com a marca registrada Ilaris®), Catumaxomab (produto comercializado com a marca registrada Removab®), Ustequinumab (produto comercializado com a marca registrada Stelara®), Tocilizumab (produto comercializado com a marca registrada RoActemra®, Actemra®), Ofatumumab (produto comercializado com a marca registrada Arzerra®), Denosumab (produto comercializado com a marca registrada Prolia®), Belimumab (produto comercializado com a marca registrada Benlysta®), Raxibacumab, Ipilimumab (produto comercializado com a marca registrada Yervoy®), e Pertuzumab (produto comercializado com a marca registrada Perjeta®). Em modalidades exemplificativas, o anticorpo é um de anticorpos anti-TNF alfa tais como adalimumab, infliximab, etanercept, golimumab, e certolizumab pegol; anticorpos anti-IL1beta tais como canaquinumab; anticorpos anti-IL12/23 (p40) tais como ustequinumab e briaquinumab; e anticorpos anti-IL2R, tais como daclizumab. Em aspectos

exemplificativos, o anticorpo se liga a um antígeno associado a tumor e é um anticorpo anti-cancerígeno. Exemplos de anticorpos anti-cancerígenos adequados incluem, mas sem limitação, anticorpos anti-BAFF tais como belimumab; anticorpos anti-CD20 tais como rituximab; anticorpos anti-CD22 tais como epratuzumab; anticorpos anti-CD25 tais como daclizumab; anticorpos anti-CD30 tais como iratumumab, anticorpos anti-CD33 tais como gemtuzumab, anticorpos anti-CD52 tais como alemtuzumab; anticorpos anti-CD152 tais como ipilimumab; anticorpos anti-EGFR tais como cetuximab; anticorpos anti-HER2 tais como trastuzumab e pertuzumab; anticorpos anti-IL6, tais como siltuximab; e anticorpos anti-VEGF tais como bevacizumab; anticorpos anti-receptores de IL6 tais como tocilizumab. Em aspectos exemplificativos, o antígeno associado a tumor é CD20 e o anticorpo é um anticorpo anti-CD20. Em aspectos exemplificativos, o antígeno associado a tumor compreende a SEQ ID NO: 3. Em casos exemplificativos, o anticorpo compreende uma sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 1 e uma sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 2. Em aspectos exemplificativos, o anticorpo é um anticorpo anti-CD20, por exemplo, um anticorpo monoclonal anti-CD20. Em aspectos alternativos, o anticorpo IgG1 é rituximab, ou um seu biossimilar. O termo rituximab se relaciona com um anticorpo monoclonal IgG1 capa quimérico murino/humano que se liga ao antígeno CD20 (ver CAS Número: 174722-31-7; DrugBank - DB00073; "Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes" (KEGG) entrada D02994). Em aspectos exemplificativos, o anticorpo compreende uma cadeia leve compreendendo uma CDR1, CDR2, e CDR3 como apresentado na Tabela A. Em aspectos exemplificativos, o anticorpo

compreende uma cadeia pesada compreendendo uma CDR1, CDR2, e CDR3 como apresentado na Tabela A. Em vários casos, o anticorpo compreende a VH e VL ou compreende sequências VH-IgG1 e VL-IgG capa listadas na Tabela A.

TABELA A: Sequências de Aminoácidos de Rituximab

| Descrição     | Sequência                                                                                                                                    | SEQ ID NO: |
|---------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| CDR1 de LC    | RASSSVSYIH                                                                                                                                   | 4          |
| CDR2 de LC    | ATSNLAS                                                                                                                                      | 5          |
| CDR3 de LC    | QQWTSNPPT                                                                                                                                    | 6          |
| CDR1 de HC    | SYNMH                                                                                                                                        | 7          |
| CDR2 de HC    | AIYPGNGDTSYNQKFKG                                                                                                                            | 8          |
| CDR3 de HC    | STYYGGDWYFNV                                                                                                                                 | 9          |
| VL            | QIVLSQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVSYIHWFQQKPGSSPK<br>PWIYATSNLASGVPVRFSGSGSGTSYSLTISRVEAEDAATYYCQ<br>QWTSNPPTFGGGTKLEIK                           | 10         |
| VH            | QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGRG<br>LEWIGAIYPGNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTS<br>EDSAVYYCARSTYYGGDWYFNVWGAGTTVTVSA            | 11         |
| VL - IgG Capa | QIVLSQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVSYIHWFQQKPGSSPK<br>PWIYATSNLASGVPVRFSGSGSGTSYSLTISRVEAEDAATYYCQ<br>QWTSNPPTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVV | 12         |

|         |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |    |
|---------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
|         | CLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |    |
| VH-IgG1 | QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWKQTPGRGLEWIGAIYPGNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARSTYYGGDWYFNVWGAGTTVTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKAEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK | 13 |

LC, cadeia leve; HC, cadeia pesada; VL, cadeia leve variável; VH, cadeia pesada variável.

**[0094]** Em aspectos exemplificativos, o anticorpo é um anticorpo anti-EGFR, por exemplo, um anticorpo monoclonal anti-HER2. Em aspectos exemplificativos, o anticorpo é trastuzumab, ou um seu biossimilar. O termo trastuzumab se relaciona com um anticorpo monoclonal IgG1 capa humanizado que se liga ao antígeno HER2/neu (ver CAS Número: 180288-69-1; DrugBank - DB00072; "Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes" (KEGG) entrada D03257). Em aspectos exemplificativos, o anticorpo compreende uma cadeia leve compreendendo uma CDR1, CDR2, e CDR3 como apresentado na Tabela B. Em aspectos exemplificativos, o anticorpo compreende uma cadeia pesada compreendendo uma CDR1, CDR2, e CDR3 como apresentado na Tabela B. Em vários casos, o anticorpo compreende a VH e VL ou compreende sequências VH-IgG1 e VL-IgG1 capa listadas na Tabela B.

**TABELA B:** Sequências de Aminoácidos de Trastuzumab

| Descrição     | Sequência                                                                                                                                                                                                                             | SEQ ID NO: |
|---------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| CDR1 de LC    | QDVNTA                                                                                                                                                                                                                                | 14         |
| CDR2 de LC    | SAS                                                                                                                                                                                                                                   | 15         |
| CDR3 de LC    | QQHYTTPPT                                                                                                                                                                                                                             | 16         |
| CDR1 de HC    | GFNIKDTY                                                                                                                                                                                                                              | 17         |
| CDR2 de HC    | IYPTNGYT                                                                                                                                                                                                                              | 18         |
| CDR3 de HC    | SRWGGDGFYAMDY                                                                                                                                                                                                                         | 19         |
| VL            | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKA<br>PKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATY<br>YCQQHYTTPPTFGQGTKVEIK                                                                                                                   | 20         |
| VH            | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGK<br>GLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSL<br>RAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLLTVSS                                                                                                      | 21         |
| VL - IgG Capa | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKA<br>PKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATY<br>YCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGT<br>ASVVCLLNFPYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDST<br>YLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC | 22         |
| VH - IgG1     | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGK<br>GLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSL<br>RAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLLTVSSASTKGPSVF                                                                                             | 23         |

|  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |  |
|--|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|
|  | PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT<br>FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD<br>KKVEPPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS<br>RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN<br>STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK<br>GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES<br>NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSS<br>VMHEALHNHYTQKSLSLSPG |  |
|--|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|

LC, cadeia leve; HC, cadeia pesada; VL, cadeia leve variável;  
 VH, cadeia pesada variável.

#### **[0095]**      *Passos Adicionais*

**[0096]**      Os métodos revelados aqui, em vários aspectos, compreendem passos adicionais. Por exemplo, em alguns aspectos, os métodos compreendem um ou mais passos a montante ou passos a jusante envolvidos na produção, purificação, e formulação de uma proteína glicosilada recombinante. Em modalidades exemplificativas, o método compreende passos para gerar células hospedeiras que expressam uma proteína glicosilada recombinante (por exemplo, anticorpo ou proteína de ligação a anticorpos). As células hospedeiras, em alguns aspectos, são células hospedeiras procarióticas, por exemplo, *E. coli* ou *Bacillus subtilis*, ou as células hospedeiras, em alguns aspectos, são células hospedeiras eucarióticas, por exemplo, células de levedura, células de fungos filamentosos, células de protozoário, células de inseto, ou células de mamífero (por exemplo, células CHO). Tais células hospedeiras são descritas na técnica. Ver, p.ex., Frenzel, *et al.*, *Front*

*Immunol* 4: 217 (2013) e aqui sob “Células”. Por exemplo, os métodos compreendem, em alguns casos, introduzir em células hospedeiras um vetor compreendendo um ácido nucleico compreendendo uma sequência de nucleotídeos codificando a proteína glicosilada recombinante, ou uma sua cadeia polipeptídica.

**[0097]** Em modalidades exemplificativas, os métodos revelados aqui compreendem passos para isolar e/ou purificar a proteína glicosilada recombinante (por exemplo, anticorpo recombinante) a partir da cultura. Em aspectos exemplificativos, o método compreende um ou mais passos de cromatografia incluindo, mas sem limitação, por exemplo, cromatografia de afinidade (por exemplo, cromatografia de afinidade com proteína A), cromatografia de troca iônica e/ou cromatografia de interação hidrofóbica. Em aspectos exemplificativos, o método compreende passos para produzir biomoléculas cristalinas a partir de uma solução compreendendo as proteínas glicosiladas recombinantes.

**[0098]** Os métodos da revelação, em vários aspectos, compreendem um ou mais passos para preparar uma composição, incluindo, em alguns aspectos, uma composição farmacêutica, compreendendo a proteína glicosilada recombinante purificada. Tais composições são discutidas abaixo.

**[0099]** *Composições*

**[00100]** São proporcionadas aqui composições compreendendo proteínas glicosiladas recombinantes. Em modalidades exemplificativas, as composições são preparadas pelos métodos inventivos de produção de uma composição de proteína glicosilada recombinante, descrita aqui. Em

aspectos exemplificativos, a proteína glicosilada recombinante é um anticorpo. Em conformidade, são proporcionadas aqui composições de anticorpos. Em modalidades exemplificativas, a composição de anticorpo compreende diferentes glicoformas do anticorpo. Em modalidades exemplificativas, a composição de anticorpo compreende glicoformas TAF, glicoformas HM e/ou glicoformas afucosiladas do anticorpo. Composições compreendendo fragmentos de anticorpos ou produtos proteicos de anticorpos também são proporcionadas. Em vários aspectos, os fragmentos de anticorpos, produtos proteicos de anticorpos, Fragmentos Fc Glicosilados, ou produtos de anticorpos de Fragmentos Fc Glicosilados compreendem um sítio de glicosilação. Em modalidades exemplificativas, a composição de anticorpo é produzida por um método compreendendo manter células competentes para glicosilação em um meio de cultura de células compreendendo fucose, em que fucose está presente no meio de cultura a uma concentração situada entre cerca de 0,17 g/L e cerca de 1,0 g/L. Em modalidades exemplificativas, a composição de anticorpo é produzida por um método compreendendo manter células competentes para glicosilação em um meio de cultura de células compreendendo fucose, em que fucose está presente no meio de cultura a uma concentração situada entre cerca de 0,1 g/L e cerca de 1,0 g/L, e em que as células competentes para glicosilação não são geneticamente modificadas para alterar a atividade de uma enzima da via *de novo* ou da via de salvamento. Em modalidades exemplificativas, a composição de anticorpo é produzida por um método compreendendo manter células competentes para

glicosilação em um meio de cultura de células compreendendo fucose e glicose, em que fucose está presente no meio de cultura a uma concentração de cerca de 0,1 g/L até cerca de 1,0 g/L, e adicionar glicose ao meio de cultura de células de acordo com uma calendarização de alimentação com glicose que alcança uma concentração média de glicose de cerca de 10 g/L ou menos. Em modalidades exemplificativas, a composição de anticorpo é produzida implementando um método de modulação do nível de glicanas TAF, glicanas afucosiladas, ou glicana rica em manose de uma composição de anticorpo produzidas por células competentes para glicosilação. Em aspectos exemplificativos, a composição de anticorpo é produzida implementando um método de modulação do nível de glicanas TAF, compreendendo (A) adicionar fucose a um meio de cultura de células compreendendo as células competentes para glicosilação para alcançar uma concentração de fucose de cerca de 0,1 g/L até cerca de 1,0 g/L para decrescer o nível de glicanas TAF; (B) adicionar glicose a um meio de cultura de células compreendendo as células competentes para glicosilação para alcançar uma concentração de glicose menor do que cerca de 10 g/L para aumentar o nível de glicanas TAF; ou (C) ambos de (A) e (B). Em aspectos exemplificativos, a composição de anticorpo é produzida implementando um método de modulação do nível de glicanas afucosiladas de uma composição de anticorpo produzidas por células competentes para glicosilação, compreendendo (A) adicionar fucose a um meio de cultura de células compreendendo as células competentes para glicosilação para alcançar uma concentração de fucose de cerca de 0,1 g/L até cerca de 1,0 g/L para decrescer o

nível de glicanas afucosiladas; (B) adicionar glicose a um meio de cultura de células compreendendo as células competentes para glicosilação para alcançar uma concentração de glicose menor do que ou cerca de 10 g/L para aumentar o nível de glicanas afucosiladas; ou (C) ambos de (A) e (B). Em casos exemplificativos, a composição de anticorpo é produzida implementando um método de modulação do nível de glicanas ricas em manose de uma composição de anticorpo produzidas por células competentes para glicosilação, compreendendo adicionar glicose a um meio de cultura de células compreendendo as células competentes para glicosilação para alcançar uma concentração de glicose menor do que ou cerca de 10 g/L para aumentar o nível de glicanas ricas em manose.

**[00101]** Em aspectos exemplificativos, menos do que ou cerca de 50% (por exemplo, menos do que ou cerca de 40%, menos do que ou cerca de 30%, menos do que ou cerca de 25%, menos do que ou cerca de 20%, menos do que ou cerca de 15%) da proteína glicosilada recombinante na composição consiste em glicoformas TAF. Em aspectos exemplificativos, menos do que cerca de 10% (por exemplo, menos do que ou cerca de 9%, menos do que ou cerca de 8%, menos do que ou cerca de 7%, menos do que ou cerca de 6%, menos do que ou cerca de 5%, menos do que ou cerca de 4%, menos do que ou cerca de 3%, menos do que ou cerca de 2%) da proteína glicosilada recombinante na composição consiste em glicoformas TAF. Em aspectos exemplificativos, cerca de 4% até cerca de 10% da proteína glicosilada recombinante na composição consiste em glicoformas TAF. Em aspectos exemplificativos, cerca de 2% até cerca de 6% da proteína glicosilada recombinante na

composição consiste em glicoformas TAF. Em aspectos exemplificativos, cerca de 2,5% até cerca de 5% da proteína glicosilada recombinante na composição consiste em glicoformas TAF. Em aspectos exemplificativos, menos do que ou cerca de 4% da proteína glicosilada recombinante na composição consiste em glicoformas TAF. Em aspectos exemplificativos adicionais, menos do que ou cerca de 4% e mais do que ou cerca de 2% da proteína glicosilada recombinante na composição consiste em glicoformas TAF.

**[00102]** Em aspectos exemplificativos, as composições da revelação têm um perfil de glicoformas que é menor do que ou cerca de 50% (por exemplo, menor do que ou cerca de 40%, menor do que ou cerca de 30%, menor do que ou cerca de 25%, menor do que ou cerca de 20%, menor do que ou cerca de 15%) de glicoformas TAF. Em aspectos exemplificativos, as composições da revelação têm um perfil de glicoformas que é menor do que ou cerca de 10% (por exemplo, menor do que ou cerca de 9%, menor do que ou cerca de 8%, menor do que ou cerca de 7%, menor do que ou cerca de 6%, menor do que ou cerca de 5%, menor do que ou cerca de 4%, menor do que ou cerca de 3%, menor do que ou cerca de 2%) de glicoformas TAF. Em aspectos exemplificativos, as composições da revelação têm um perfil de glicoformas que compreende cerca de 4% até cerca de 10% de glicoformas TAF. Em aspectos exemplificativos, as composições da revelação têm um perfil de glicoformas que é cerca de 2% até cerca de 6% de glicoformas TAF. Em aspectos exemplificativos, as composições da revelação têm um perfil de glicoformas que é cerca de 2,5% até cerca de 5% de glicoformas TAF. Em aspectos exemplificativos, as composições da revelação têm

um perfil de glicoformas que é menor do que ou cerca de 4% de glicoformas TAF. Em aspectos exemplificativos, as composições da revelação têm um perfil de glicoformas que é menor do que ou cerca de 4% e maior do que ou cerca de 2% de glicoformas TAF.

**[00103]** Em aspectos exemplificativos, menos do que ou cerca de 5% da proteína glicosilada recombinante (por exemplo, anticorpo ou proteína de ligação a anticorpos) na composição consiste em glicoformas afucosiladas. Em aspectos exemplificativos, menos do que ou cerca de 4% da proteína glicosilada recombinante (por exemplo, anticorpo ou proteína de ligação a anticorpos) na composição consiste em glicoformas afucosiladas. Em aspectos exemplificativos, menos do que ou cerca de 3,5% da proteína glicosilada recombinante (por exemplo, anticorpo ou proteína de ligação a anticorpos) na composição consiste em glicoformas afucosiladas. Em aspectos exemplificativos, cerca de 0,8% até cerca de 2,8% da proteína glicosilada recombinante na composição consiste em glicoformas afucosiladas. Em alguns aspectos, o nível de glicanas afucosiladas na composição de anticorpo é cerca de 0,8%, cerca de 0,9%, cerca de 1,0%, cerca de 1,1%, cerca de 1,2%, cerca de 1,3%, cerca de 1,4%, cerca de 1,5%, cerca de 1,6%, cerca de 1,7%, cerca de 1,8%, cerca de 1,9%, cerca de 2,0%, cerca de 2,1%, cerca de 2,2%, cerca de 2,3%, cerca de 2,4%, cerca de 2,5%, cerca de 2,6%, cerca de 2,7% ou cerca de 2,8%.

**[00104]** Em aspectos exemplificativos, menos do que ou cerca de 5% da proteína glicosilada recombinante (por exemplo, anticorpo ou proteína de ligação a anticorpos) na

composição consiste em glicoformas ricas em manose. Em aspectos exemplificativos, menos do que ou cerca de 4% da proteína glicosilada recombinante (por exemplo, anticorpo ou proteína de ligação a anticorpos) na composição consiste em glicoformas ricas em manose. Em aspectos exemplificativos, menos do que ou cerca de 3,5% da proteína glicosilada recombinante (por exemplo, anticorpo ou proteína de ligação a anticorpos) na composição consiste em glicoformas ricas em manose. Em aspectos exemplificativos, cerca de 0,7% até cerca de 3,0% da proteína glicosilada recombinante na composição consiste em glicoformas ricas em manose. Em alguns aspectos, o nível de glicanas ricas em manose na composição de anticorpo é cerca de 0,7%, cerca de 0,8%, cerca de 0,9%, cerca de 1,0%, cerca de 1,1%, cerca de 1,2%, cerca de 1,3%, cerca de 1,4%, cerca de 1,5%, cerca de 1,6%, cerca de 1,7%, cerca de 1,8%, cerca de 1,9%, cerca de 2,0%, cerca de 2,1%, cerca de 2,2%, cerca de 2,3%, cerca de 2,4%, cerca de 2,5%, cerca de 2,6%, cerca de 2,7%, cerca de 2,8%, cerca de 2,9% ou cerca de 3,0%.

**[00105]** Em modalidades exemplificativas, a composição é combinada com um transportador, diluente ou excipiente farmacêuticamente aceitável. Em conformidade, são proporcionadas aqui composições farmacêuticas compreendendo a composição de proteína glicosilada recombinante (por exemplo, a composição de anticorpo ou composição de proteína de ligação a anticorpos) descrita aqui e um transportador, diluente ou excipiente farmacêuticamente aceitável. Como usado aqui, o termo “transportador farmacêuticamente aceitável” inclui qualquer um dos transportadores farmacêuticos padrão, tais como uma solução

salina tamponada com fosfato, água, emulsões tais como uma emulsão óleo/água ou água/óleo e vários tipos de agentes molhantes.

**[00106]** Meio de Cultura de Células

**[00107]** É proporcionado aqui um meio de cultura de células compreendendo: (a) células competentes para glicosilação compreendendo uma sequência de nucleotídeos exógena codificando um anticorpo; e (b) um meio de cultura compreendendo fucose a uma concentração de cerca de 0,1 g/L até cerca de 1,0 g/L ou cerca de 0,17 g/L até cerca de 1,0 g/L. As células competentes para glicosilação podem consistir em qualquer célula descrita aqui. Em casos exemplificativos, as células competentes para glicosilação não são geneticamente modificadas para alterar a atividade de uma enzima da via *de novo* ou da via de salvamento, opcionalmente em que as células competentes para glicosilação não são geneticamente modificadas para nocaute de um gene codificando GDP-ceto-6-desoximanose-3,5-epimerase, 4-redutase. Em modalidades exemplificativas, o meio de cultura compreende adicionalmente glicose. Em alguns aspectos, o meio de cultura compreende glicose a uma concentração menor do que cerca de 10 g/L ou menor do que cerca de 9 g/L, por exemplo, cerca de 6 g/L ou menos ou cerca de 0,5 g/L até cerca de 4 g/L. Em alguns aspectos, o meio de cultura compreende a fucose. Em aspectos exemplificativos, o pH do meio de cultura é cerca de 6,85 até cerca de 7,05, opcionalmente cerca de 6,90 até cerca de 7,00. Em casos exemplificativos, as células competentes para glicosilação não são geneticamente modificadas para

alterar a atividade de uma enzima da via *de novo* ou da via de salvamento. Por exemplo, as células competentes para glicosilação não são geneticamente modificadas para nocaute de um gene codificando GDP-ceto-6-desoximanose-3,5-epimerase, 4-redutase. Em aspectos exemplificativos, o anticorpo é um anticorpo IgG, opcionalmente um anticorpo IgG1. O anticorpo IgG1, em aspectos exemplificativos, é específico para um antígeno associado a tumor, por exemplo, CD20. Em aspectos exemplificativos, o meio de cultura de células não compreende manose.

**[00108]**      *Métodos de Modulação*

**[00109]**      Métodos de alteração ou modulação dos níveis de glicanas TAF de uma proteína glicosilada recombinante (por exemplo, uma composição de anticorpo ou composição de proteína de ligação a anticorpos) produzidas por células competentes para glicosilação em um meio de cultura de células são adicionalmente proporcionados aqui. Em aspectos exemplificativos, o método compreende (A) adicionar fucose a um meio de cultura de células compreendendo as células competentes para glicosilação para alcançar uma concentração de fucose de cerca de 0,1 g/L até cerca de 1,0 g/L para decrescer o nível de glicanas TAF; (B) adicionar glicose a um meio de cultura de células compreendendo as células competentes para glicosilação para alcançar uma concentração de glicose menor do que cerca de 10 g/L para aumentar o nível de glicanas TAF; ou (C) ambos de (A) e (B).

**[00110]**      A presente revelação também proporciona métodos de modulação do nível de glicanas afucosiladas de uma

proteína glicosilada recombinante (por exemplo, uma composição de anticorpo ou composição de proteína de ligação a anticorpos) produzidas por células competentes para glicosilação. Em aspectos exemplificativos, os métodos compreendem (A) adicionar fucose a um meio de cultura de células compreendendo as células competentes para glicosilação para alcançar uma concentração de fucose de cerca de 0,1 g/L até cerca de 1,0 g/L para decrescer o nível de glicanas afucosiladas; (B) adicionar glicose a um meio de cultura de células compreendendo as células competentes para glicosilação para alcançar uma concentração de glicose menor do que cerca de 10 g/L para aumentar o nível de glicanas afucosiladas; ou (C) ambos de (A) e (B).

**[00111]** Também são proporcionados métodos de modulação do nível de glicanas ricas em manose de uma proteína glicosilada recombinante (por exemplo, uma composição de anticorpo ou composição de proteína de ligação a anticorpos) produzidas por células competentes para glicosilação. Em modalidades exemplificativas, os métodos compreendem adicionar glicose a um meio de cultura de células compreendendo as células competentes para glicosilação para alcançar uma concentração de glicose menor do que cerca de 10 g/L para aumentar o nível de glicanas HM.

**[00112]** Em conformidade, em algumas modalidades exemplificativas, os métodos da revelação se relacionam com o aumento dos níveis de glicanas TAF, HM, ou afucosiladas de uma proteína, por exemplo, um anticorpo, produzidas por

células em uma cultura de células. Em aspectos exemplificativos, os níveis de glicoformas HM da proteína glicosilada recombinante são aumentados, relativamente à cultura de células de controle. Em aspectos exemplificativos, os níveis de uma ou mais de Man5, Man6, Man7, Man8 e/ou Man9 da proteína glicosilada recombinante são aumentados, relativamente à cultura de células de controle. Em aspectos exemplificativos, os níveis de glicoformas afucosiladas da proteína glicosilada recombinante são aumentados, relativamente à cultura de células de controle. Em aspectos exemplificativos, os níveis de uma ou mais de A1G0, A2G0, A2G1a, A2G1b, A2G2 e A1G1M5 da proteína glicosilada recombinante são aumentados, relativamente à cultura de células de controle. Em aspectos exemplificativos, os níveis de uma ou mais de A1G1a, G0[H3N4], G0[H4N4], G0[H5N4], e FO-N[H3N3] DA PROTEÍNA glicosilada recombinante são aumentados, relativamente à cultura de células de controle. Em alguns aspectos, o aumento é um aumento relativamente à cultura de células de controle, determinado por Cromatografia Líquida de Interação Hidrofílica (HILIC). Em alguns aspectos, o aumento é um aumento relativamente à cultura de células de controle determinado por métodos conhecidos do perito na técnica.

**[00113]** Em alguns aspectos, os métodos da revelação aumentam os níveis de glicoformas TAF, HM, ou afuco em qualquer grau ou nível relativamente a uma cultura de células de controle. Por exemplo, em alguns aspectos, o aumento proporcionado pelos métodos da revelação é um aumento de pelo menos ou cerca de 1% até cerca de 10% (por

exemplo, aumento de pelo menos ou cerca de 1%, pelo menos ou cerca de 2%, aumento de pelo menos ou cerca de 3%, aumento de pelo menos ou cerca de 4%, aumento de pelo menos ou cerca de 5%, aumento de pelo menos ou cerca de 6%, aumento de pelo menos ou cerca de 7%, aumento de pelo menos ou cerca de 8%, aumento de pelo menos ou cerca de 9%, aumento de pelo menos ou cerca de 9,5%, aumento de pelo menos ou cerca de 9,8%, aumento de pelo menos ou cerca de 10%) relativamente a uma cultura de células de controle. Em modalidades exemplificativas, o aumento proporcionado pelos métodos da revelação é superior a 100%, por exemplo, 200%, 300%, 400%, 500%, 600%, 700%, 800%, 900% ou mesmo 1000% relativamente a uma cultura de células de controle. Em modalidades exemplificativas, o nível de glicoformas TAF, HM, ou afuco da proteína aumenta em pelo menos cerca de 1,5 vezes relativamente a uma cultura de células de controle. Em modalidades exemplificativas, o nível de glicoformas TAF, HM, ou afuco da proteína aumenta em pelo menos cerca de 2 vezes relativamente a uma cultura de células de controle. Em modalidades exemplificativas, o nível de glicoformas TAF, HM, ou afuco da proteína aumenta em pelo menos cerca de 3 vezes relativamente a uma cultura de células de controle. Em modalidades exemplificativas, o nível de glicoformas TAF, HM, ou afuco da proteína aumenta em pelo menos cerca de 4 vezes ou cerca de 5 vezes relativamente a uma cultura de células de controle.

**[00114]** Em aspectos exemplificativos, o nível aumentado de glicoformas TAF da proteína glicosilada recombinante é observado ou observável ou detectado ou detectável logo no 1º dia após a concentração de fucose e/ou glicose ser

alterada. Em aspectos exemplificativos, o nível aumentado de glicoformas TAF da proteína glicosilada recombinante é observado ou observável ou detectado ou detectável logo no 2º dia pós-alteração. Em aspectos exemplificativos, o nível aumentado de glicoformas TAF da proteína glicosilada recombinante é observado ou observável ou detectado ou detectável logo no 3º dia pós-alteração. Em aspectos exemplificativos, o nível aumentado de glicoformas TAF da proteína glicosilada recombinante é observado ou observável ou detectado ou detectável logo cerca do 4º dia pós-alteração. Em aspectos exemplificativos, o nível aumentado de glicoformas TAF da proteína glicosilada recombinante é observado ou observável ou detectado ou detectável depois de cerca do 5º dia pós-alteração. Em aspectos exemplificativos, o nível aumentado de glicoformas TAF da proteína é observado ou observável ou detectado ou detectável no momento em que a proteína glicosilada recombinante é recolhida da cultura de células.

**[00115]** Em aspectos exemplificativos, o nível aumentado de glicoformas TAF da proteína glicosilada recombinante é observado durante mais do que cerca do 4º, 5º, ou 6º dia de cultura de células ou mais tarde. Em aspectos exemplificativos, o nível aumentado de glicoformas TAF da proteína glicosilada recombinante é observado durante 7, 8, 9, 10, 11 ou 12 dias de cultura de células (pós-inoculação), ou mais (por exemplo, cerca de 2 semanas, cerca de 3 semanas, cerca de 4 semanas, cerca de 1 mês, cerca de 2 meses, cerca de 3 meses, cerca de 6 meses ou cerca de 1 ano). Em aspectos exemplificativos, o nível aumentado de glicoformas TAF da proteína é observado no

momento em que a proteína é recolhida da cultura de células.

**[00116]** Em outros aspectos, os métodos da revelação se relacionam com decrescer os níveis de glicoformas TAF de uma proteína produzidas por células em uma cultura de células. Em aspectos exemplificativos, os níveis de glicoformas HM da proteína glicosilada recombinante são decrescidos, relativamente à cultura de células de controle. Em aspectos exemplificativos, os níveis de uma ou mais de Man5, Man6, Man7, Man8 e/ou Man9 da proteína glicosilada recombinante são decrescidos, relativamente à cultura de células de controle. Em aspectos exemplificativos, os níveis de glicoformas afucosiladas da proteína glicosilada recombinante são decrescidos, relativamente à cultura de células de controle. Em aspectos exemplificativos, os níveis de uma ou mais de A1G0, A2G0, A2G1a, A2G1b, A2G2 e A1G1M5 da proteína glicosilada recombinante são decrescidos, relativamente à cultura de células de controle. Em aspectos exemplificativos, os níveis de uma ou mais de A1G1a, G0[H3N4], G0[H4N4], G0[H5N4], e FO-N[H3N3] DA PROTEÍNA glicosilada recombinante são decrescidos, relativamente à cultura de células de controle. Em aspectos exemplificativos, o método é um método para decrescer o nível de glicoformas TAF em cerca de 1% até cerca de 4% e o método compreende manter as células competentes para glicosilação em um primeiro meio de cultura de células e aumentar a concentração de fucose para cerca de 0,1 g/L até cerca de 1,0 g/L. Em alguns aspectos, o decréscimo é um decréscimo relativamente à cultura de células de controle, determinado por HILIC. Em

alguns aspectos, o decréscimo é um decréscimo relativamente à cultura de células de controle determinado por métodos conhecidos do perito na técnica.

**[00117]** Em alguns aspectos, os métodos da revelação decrescem o(s) nível(eis) de glicoformas TAF, HM, ou afuco em qualquer grau ou nível relativamente a uma cultura de células de controle. Por exemplo, o decréscimo proporcionado pelos métodos da revelação é um decréscimo de pelo menos ou cerca de 0,1% até cerca de 1% (por exemplo, decréscimo de pelo menos ou cerca de 0,1%, decréscimo de pelo menos ou cerca de 0,2%, decréscimo de pelo menos ou cerca de 0,3%, decréscimo de pelo menos ou cerca de 0,4%, decréscimo de pelo menos ou cerca de 0,5%, decréscimo de pelo menos ou cerca de 0,6%, decréscimo de pelo menos ou cerca de 0,7%, decréscimo de pelo menos ou cerca de 0,8%, decréscimo de pelo menos ou cerca de 0,9%, decréscimo de pelo menos ou cerca de 0,95%, decréscimo de pelo menos ou cerca de 0,98%, decréscimo de pelo menos ou cerca de 1,0%) relativamente ao nível de uma cultura de células de controle. Em modalidades exemplificativas, o decréscimo proporcionado pelos métodos da revelação é superior a cerca de 100%, por exemplo, cerca de 200%, cerca de 300%, cerca de 400%, cerca de 500%, cerca de 600%, cerca de 700%, cerca de 800%, cerca de 900% ou mesmo cerca de 1000% relativamente ao nível de uma cultura de células de controle. Em modalidades exemplificativas, o nível de glicoformas TAF, HM, ou afuco da proteína decresce em pelo menos ou cerca de 1,5 vezes, relativamente a uma cultura de células de controle. Em modalidades exemplificativas, o nível de glicoformas TAF, HM, ou afuco da proteína decresce

em pelo menos cerca de 2 vezes, relativamente a uma cultura de células de controle. Em modalidades exemplificativas, o nível de glicoformas TAF, HM, ou afuco da proteína decresce em pelo menos cerca de 3 vezes, relativamente a uma cultura de células de controle. Em modalidades exemplificativas, o nível de glicoformas TAF, HM, ou afuco da proteína decresce em pelo menos cerca de 4 vezes ou em pelo menos cerca de 5 vezes, relativamente a uma cultura de células de controle.

**[00118]** Em aspectos exemplificativos, o nível decrescido de glicoformas TAF da proteína glicosilada recombinante é observado ou observável ou detectado ou detectável tão cedo quanto cerca do 1º dia pós-inoculação. Em aspectos exemplificativos, o nível decrescido de glicoformas TAF da proteína glicosilada recombinante é observado ou observável ou detectado ou detectável tão cedo quanto cerca do 2º dia pós-inoculação. Em aspectos exemplificativos, o nível decrescido de glicoformas TAF da proteína glicosilada recombinante é observado ou observável ou detectado ou detectável tão cedo quanto cerca do 3º dia pós-inoculação. Em aspectos exemplificativos, o nível decrescido de glicoformas TAF da proteína glicosilada recombinante é observado ou observável ou detectado ou detectável tão cedo quanto cerca do 4º dia pós-inoculação. Em aspectos exemplificativos, o nível decrescido de glicoformas TAF da proteína glicosilada recombinante é observado ou observável ou detectado ou detectável depois de cerca do 5º dia pós-inoculação. Em aspectos exemplificativos, o nível decrescido de glicoformas TAF da proteína glicosilada recombinante é observado ou observável

ou detectado ou detectável cerca do momento em que a proteína é recolhida da cultura de células.

**[00119]** Em aspectos exemplificativos, o nível decrescido de glicoformas TAF da proteína é observado durante mais do que cerca do 4º, cerca do 5º, ou cerca do 6º dia de cultura de células ou para além do período inicial da cultura de células. Em aspectos exemplificativos, o nível decrescido de glicoformas TAF da proteína é observado durante cerca de 7, cerca de 8, cerca de 9, cerca de 10, cerca de 11 ou cerca de 12 dias de cultura de células (pós-inoculação), ou mais (por exemplo, cerca de 2 semanas, cerca de 3 semanas, cerca de 4 semanas, cerca de 1 mês, cerca de 2 meses, cerca de 3 meses, cerca de 6 meses ou cerca de 1 ano). Em aspectos exemplificativos, o nível decrescido de glicoformas TAF da proteína é observado cerca do momento em que a proteína é recolhida da cultura de células.

**[00120]** No que se refere aos métodos da revelação, a modulação, aumento ou decréscimo efetivado por tais métodos é relativamente a um "controle" ou uma "cultura de células de controle". Em aspectos exemplificativos, o controle é o nível de glicoformas TAF da proteína quando os passos do método inventivo não são realizados. Em aspectos exemplificativos, o controle é o nível de glicoformas TAF da proteína quando um método conhecido de produção recombinante é implementado. Em aspectos exemplificativos, o controle é o nível de glicoformas TAF quando uma concentração conhecida de glicose ou fucose é mantida durante a produção recombinante. Como usado aqui, o termo

“cultura de células de controle” significa uma cultura de células mantida do mesmo modo da cultura de células onde são conduzidos os passos do método inventivo (por exemplo, cultura de células dos métodos revelados) excetuando a concentração de fucose/glicose. Em aspectos exemplificativos, a cultura de células de controle é uma cultura de células mantida em parâmetros operacionais ou padrão conhecidos, incluindo uma concentração de controle de fucose/glicose. Como usado aqui, o termo “concentração de fucose de controle” ou “concentração de glicose de controle” pode se referir a uma concentração de fucose/glicose operacional conhecida, por exemplo, uma concentração de fucose/glicose de uma cultura de células mantida em um primeiro momento ou em um momento antes de implementar os métodos da revelação. Em aspectos exemplificativos, uma concentração de fucose/glicose de controle é uma concentração de fucose/glicose de uma cultura de células para a qual os níveis de TAF são conhecidos ou determinados.

**[00121]** Em aspectos exemplificativos dos métodos de modulação da revelação, as células competentes para glicosilação não são geneticamente modificadas para alterar a atividade de uma enzima da via *de novo* ou da via de salvamento. Opcionalmente, as células competentes para glicosilação não são geneticamente modificadas para nocaute de um gene codificando GDP-ceto-6-desoximanose-3,5-epimerase, 4-redutase.

**[00122]** Em aspectos exemplificativos, depois de implementados os métodos da revelação, o nível de glicanas

TAF na composição de anticorpo é menor do que cerca de 10%, por exemplo, cerca de 2% até cerca de 6%, cerca de 2% até cerca de 5% ou cerca de 2% até cerca de 4%.

**[00123]** Em aspectos exemplificativos, depois de implementados os métodos da revelação, o nível de glicanas ricas em manose na composição de anticorpo é menor do que cerca de 3,5%, opcionalmente cerca de 0,7% até cerca de 3,0%.

**[00124]** Em aspectos exemplificativos, depois de implementados os métodos da revelação, o nível de glicanas afucosiladas na composição de anticorpo é menor do que cerca de 3,5%, opcionalmente cerca de 0,8% até cerca de 2,8%.

**[00125]** No que se refere aos métodos de modulação descritos aqui compreendendo adicionar fucose, a concentração final de fucose do meio de cultura de células, em vários aspectos, é cerca de 0,17 g/L até cerca de 1,0 g/L ou cerca de 0,2 g/L até cerca de 0,5 g/L. No entanto, são contempladas quaisquer das concentrações de fucose descritas aqui.

**[00126]** No que se refere aos métodos de modulação descritos aqui compreendendo adicionar glicose ao meio de cultura de células, em alguns aspectos, a glicose é adicionada de acordo com uma calendarização de alimentação com glicose que alcança uma concentração média de glicose de cerca de 10 g/L ou menos ou cerca de 9 g/L ou menos. Em alguns aspectos, a concentração média de glicose é menor do que cerca de 6,0 g/L, opcionalmente menor do que cerca de 4,0 g/L. Em alguns casos, a concentração média de glicose é

baseada na concentração de fucose do meio de cultura de células. Por exemplo, a concentração média de glicose pode ser calculada com base na Fórmula I:

$$T = 3,354 - 1,388F + 0,111G + [F - 0,4375] \times [1,9527(F - 0,4375)]$$

Fórmula I

em que T é a % de glicanas TAF visada e é cerca de 2,5% até cerca de 6%, cerca de 2,75% até cerca de 5,5% ou cerca de 3% até cerca de 5%, F é a concentração (g/L) de fucose no meio, e G é a concentração média de glicose (g/L).

**[00127]** A presente revelação proporciona adicionalmente métodos de modulação (redução ou aumento) do nível de glicanas afucosiladas de uma composição de proteína glicosilada recombinante (por exemplo, uma composição de anticorpo ou composição de proteína de ligação a anticorpos) produzidas por células competentes para glicosilação. Em modalidades exemplificativas, o método compreende reduzir o pH do meio de cultura de células em cerca de 0,03 até cerca de 1,2 (por exemplo, 0,05 até cerca de 1,0) para reduzir o nível de glicanas afucosiladas de uma composição de proteína glicosilada recombinante (por exemplo, uma composição de anticorpo ou composição de proteína de ligação a anticorpos) em cerca de 0,5% até cerca de 2% (por exemplo, 0,5% até cerca de 1,5%, 0,5% até cerca de 1,0%, 1,0% até cerca de 2%, 1,5% até cerca de 2,0%) ou aumentar o pH do meio de cultura de células em cerca de 0,03 até cerca de 1,2 (por exemplo, 0,05 até cerca de 1,0) para aumentar o nível de glicanas afucosiladas de uma composição de proteína glicosilada recombinante (por exemplo, uma composição de anticorpo ou composição de

proteína de ligação a anticorpos) em cerca de 0,5% até cerca de 2% (por exemplo, 0,5% até cerca de 1,5%, 0,5% até cerca de 1,0%, 1,0% até cerca de 2%, 1,5% até cerca de 2,0%). Em aspectos exemplificativos, o método compreende reduzir o pH do meio de cultura de células em cerca de 0,05 até cerca de 1,2 (por exemplo, 0,06, 0,07, 0,08, 0,09, 1,1, 1,11, 1,12, 1,13, 1,14, 1,15, 1,16, 1,17, 1,18, 1,19, 1,20), para reduzir o nível de glicanas afucosiladas da composição de proteína glicosilada recombinante (por exemplo, uma composição de anticorpo ou composição de proteína de ligação a anticorpos) em cerca de 1% até cerca de 2% (por exemplo, 1,0% até 1,5%, 1,5% até 2,0%) ou aumentar o pH do meio de cultura de células em cerca de 0,05 até cerca de 1,2 (por exemplo, 0,06, 0,07, 0,08, 0,09, 1,1, 1,11, 1,12, 1,13, 1,14, 1,15, 1,16, 1,17, 1,18, 1,19, 1,20), para aumentar o nível de glicanas afucosiladas da composição de proteína glicosilada recombinante (por exemplo, uma composição de anticorpo ou composição de proteína de ligação a anticorpos) em cerca de 1% até cerca de 2% (por exemplo, 1,0% até 1,5%, 1,5% até 2,0%). Em vários casos, o método compreende reduzir o pH do meio de cultura de células em cerca de 0,03 até cerca de 0,07 (por exemplo, 0,03, 0,04, 0,05, 0,06, 0,07) para reduzir o nível de glicanas afucosiladas da composição de proteína glicosilada recombinante (por exemplo, uma composição de anticorpo ou composição de proteína de ligação a anticorpos) em cerca de 0,5% até cerca de 1,1% (por exemplo, 0,05%, 0,06%, 0,07%, 0,08%, 0,09%, 1,0%, 1,01%, 1,02%, 1,03%, 1,04%, 1,05%, 1,06%, 1,07%, 1,08%, 1,09%, 1,10%) ou aumentar o pH do meio de cultura de células em

cerca de 0,03 até cerca de 0,07 (por exemplo, 0,03, 0,04, 0,05, 0,06, 0,07) para aumentar o nível de glicanas afucosiladas da composição de proteína glicosilada recombinante (por exemplo, uma composição de anticorpo ou composição de proteína de ligação a anticorpos) em cerca de 0,5% até cerca de 1,1% (por exemplo, 0,05%, 0,06%, 0,07%, 0,08%, 0,09%, 1,0%, 1,01%, 1,02%, 1,03%, 1,04%, 1,05%, 1,06%, 1,07%, 1,08%, 1,09%, 1,10%).

**[00128]** Métodos de redução do nível de glicanas afucosiladas de uma composição de proteína glicosilada recombinante (por exemplo, uma composição de anticorpo ou composição de proteína de ligação a anticorpos) produzidas por células competentes para glicosilação em cerca de 1% até cerca de 2% também são proporcionados aqui. Em modalidades exemplificativas, o método compreende reduzir o pH do meio de cultura de células em cerca de 0,05 até cerca de 1,2. Opcionalmente, o método compreende reduzir o pH em cerca de 0,05 até cerca de 0,07 para uma redução em glicanas afucosiladas de cerca de 1% ou reduzir o pH em cerca de 0,09 até cerca de 1,2 para uma redução em glicanas afucosiladas maior do que cerca de 1,5%. Em vários aspectos, o método compreende cultivar as células a um pH situado entre cerca de 7,10 até cerca de 7,20, opcionalmente cerca de 7,12 até cerca de 7,19.

**[00129]** Métodos de redução do nível de glicanas afucosiladas de uma composição de proteína glicosilada recombinante (por exemplo, uma composição de anticorpo ou composição de proteína de ligação a anticorpos) produzidas por células competentes para glicosilação em cerca de 0,5%

até cerca de 1,1% são adicionalmente proporcionados. Em modalidades exemplificativas, o método compreende reduzir o pH do meio de cultura de células em cerca de 0,03-0,07. Em vários aspectos, o método compreende reduzir o pH em cerca de 0,03 até cerca de 0,06 para uma redução em glicanas afucosiladas de cerca de 0,8%. Em alguns aspectos, o método compreende reduzir o pH em cerca de 0,05 até cerca de 0,07 para uma redução em glicanas afucosiladas de cerca de 1%. Em vários casos, o método compreende cultivar as células a um pH situado entre cerca de 7,05 e cerca de 7,15, opcionalmente cerca de 7,07 e cerca de 7,13.

**[00130]** Métodos para aumentar o nível de glicanas afucosiladas de uma composição de proteína glicosilada recombinante (por exemplo, uma composição de anticorpo ou composição de proteína de ligação a anticorpos) produzidas por células competentes para glicosilação em cerca de 1% até cerca de 2% são proporcionados pela presente revelação. Em modalidades exemplificativas, o método compreende aumentar o pH do meio de cultura de células em cerca de 0,05 até cerca de 1,2. Opcionalmente, o método compreende aumentar o pH em cerca de 0,05 até cerca de 0,07 para uma redução em glicanas afucosiladas de cerca de 1% ou aumentar o pH em cerca de 0,09 até cerca de 1,2 para uma redução em glicanas afucosiladas maior do que cerca de 1,5%. Em alguns aspectos, o método compreende cultivar as células a um pH situado entre cerca de 7,10 até cerca de 7,20, opcionalmente cerca de 7,12 até cerca de 7,19.

**[00131]** A presente revelação também proporciona métodos para aumentar o nível de glicanas afucosiladas de uma

composição de proteína glicosilada recombinante (por exemplo, uma composição de anticorpo ou composição de proteína de ligação a anticorpos) produzidas por células competentes para glicosilação em cerca de 0,5% até cerca de 1,1%. Em modalidades exemplificativas, o método compreende aumentar o pH do meio de cultura de células em cerca de 0,03-0,07 ou aumentar o pH em cerca de 0,03 até cerca de 0,06 para uma redução em glicanas afucosiladas de cerca de 0,8% ou aumentar o pH em cerca de 0,05 até cerca de 0,07 para uma redução em glicanas afucosiladas de cerca de 1%. Em vários casos, o método compreende cultivar as células a um pH situado entre cerca de 7,05 e cerca de 7,15, opcionalmente cerca de 7,07 e cerca de 7,13.

**[00132]** Em quaisquer dos métodos anteriores, o pH do meio de cultura de células ao longo da cultura é maior do que 7,0, opcionalmente maior do que 7,05 e menor do que 7,2. Em alguns aspectos, o nível de glicanas afucosiladas na composição de proteína glicosilada recombinante (por exemplo, uma composição de anticorpo ou composição de proteína de ligação a anticorpos) é menor do que cerca de 10%, por exemplo, cerca de 6,2% até cerca de 8,4%. Em quaisquer dos métodos anteriores, a temperatura é alterada em menos do que 2 graus C durante o período de cultura. Por exemplo, em alguns aspectos, a temperatura da cultura é alterada em não mais do que 1,5 ou 1,0 graus C. Em quaisquer dos métodos anteriores, o meio de cultura de células não compreende quaisquer quantidades detectáveis de manganês ou betaína. O meio de cultura de células, em alguns aspectos, compreende cerca de 0,10 g/L até cerca de 1,0 g/L de fucose, opcionalmente cerca de 0,17 até cerca de

1,0 g/L de fucose. Opcionalmente, fucose está presente no meio de cultura a uma concentração menor do que cerca de 0,75 g/L, menor do que cerca de 0,6 g/L ou cerca de 0,2 g/L até cerca de 0,5 g/L. A adição ou presença de fucose no meio de cultura pode estar de acordo com quaisquer dos ensinamentos proporcionados aqui. Em aspectos exemplificativos, as células competentes para glicosilação não são geneticamente modificadas para alterar a atividade de uma enzima da via *de novo* ou da via de salvamento. Em quaisquer dos métodos anteriores, glicose é adicionada ao meio de cultura de células de acordo com uma calendarização de alimentação com glicose que alcança uma concentração média de glicose de cerca de 10 g/L ou menos. A glicose pode ser adicionada de acordo com quaisquer dos ensinamentos proporcionados aqui.

**[00133]** Como discutido acima, glicanas TAF é a soma de glicanas HM e glicanas afucosiladas. Em conformidade, os métodos presentemente revelados de modulação de glicanas afucosiladas irão, em vários casos, modular o nível de glicanas TAF de uma composição de proteína glicosilada recombinante (por exemplo, uma composição de anticorpo ou composição de proteína de ligação a anticorpos). Em conformidade, métodos de modulação do nível de glicanas TAF de uma composição de proteína glicosilada recombinante (por exemplo, uma composição de anticorpo ou composição de proteína de ligação a anticorpos) produzidas por células competentes para glicosilação são proporcionados aqui. O método em aspectos exemplificativos compreende modular o nível de glicanas afucosiladas da composição de proteína glicosilada recombinante (por exemplo, uma composição de

anticorpo ou composição de proteína de ligação a anticorpos) de acordo com um método presentemente revelado de modulação do nível de glicanas afucosiladas. Em modalidades exemplificativas, o método de modulação de glicanas TAF compreende reduzir o nível de glicanas afucosiladas da composição de proteína glicosilada recombinante (por exemplo, uma composição de anticorpo ou composição de proteína de ligação a anticorpos) de acordo com um método presentemente revelado para reduzir o nível de glicanas afucosiladas ou aumentar o nível de glicanas afucosiladas da composição de proteína glicosilada recombinante (por exemplo, uma composição de anticorpo ou composição de proteína de ligação a anticorpos) de acordo com um método presentemente revelado para aumentar glicanas afucosiladas.

**[00134]** Um método de produção de uma composição de anticorpo, em que o nível de glicanas afucosiladas na composição de anticorpo é cerca de 6,2% até cerca de 8,4%, é adicionalmente proporcionado pela presente revelação. Em modalidades exemplificativas, o método compreende manter células competentes para glicosilação em um meio de cultura de células a um pH maior do que 7,05 e menor do que 7,2,

em que, opcionalmente:

(A) o pH do meio de cultura de células é alterado em menos do que 0,15 (opcionalmente em menos do que 0,10) durante o período de cultura ou

(B) a temperatura do meio de cultura de células é alterada em não mais do que 2 graus C ou

(C) o método não compreende cultivar as células em um meio de cultura de células compreendendo manganês ou betaína ou

(D) uma combinação de dois ou três de (A), (B) e (C).

**[00135]** Em vários aspectos, o pH é mantido a um pH de cerca de 7,07 até cerca de 7,19 (por exemplo, 7,08, 7,09, 7,10, 7,11, 7,12, 7,13, 7,14, 7,15, 7,16, 7,17, 7,18 ou 7,19) durante o período de cultura, opcionalmente em que o pH é mantido a cerca de 7,07 ou maior e menor do que 7,10, ou cerca de 7,10 ou maior e menor do que 7,15, ou cerca de 7,15 ou maior até cerca de 7,19. Em vários aspectos, o nível de glicanas afucosiladas na composição de anticorpo é menor do que cerca de 10%, opcionalmente cerca de 6,2% até cerca de 8,4%. Em vários casos, a temperatura é alterada em menos do que 2 graus C durante o período de cultura, opcionalmente a temperatura da cultura é alterada em não mais do que 1,5 ou 1,0 graus C. Em vários aspectos, o meio de cultura de células não compreende quaisquer quantidades detectáveis de manganês ou betaína. Em aspectos exemplificativos, o meio de cultura de células compreende cerca de 0,10 g/L até cerca de 1,0 g/L de fucose, opcionalmente cerca de 0,17 até cerca de 1,0 g/L de fucose, opcionalmente fucose está presente no meio de cultura a uma concentração menor do que cerca de 0,75 g/L, menor do que cerca de 0,6 g/L ou cerca de 0,2 g/L até cerca de 0,5 g/L. Em alguns aspectos, as células competentes para glicosilação não são geneticamente modificadas para alterar a atividade de uma enzima da via *de novo* ou da via de salvamento, e em alguns aspectos, glicose é adicionada ao

meio de cultura de células de acordo com uma calendarização de alimentação com glicose que alcança uma concentração média de glicose de cerca de 10 g/L ou menos.

**[00136]**      *Modalidades Exemplificativas*

**[00137]**      A revelação proporciona métodos de produção de uma composição de proteína glicosilada recombinante (por exemplo, uma composição de anticorpo ou composição de proteína de ligação a anticorpos). Em modalidades exemplificativas, o método compreende manter células competentes para glicosilação em um meio de cultura de células compreendendo fucose e/ou glicose a uma concentração específica como descrito aqui, dependendo do nível de glicoformas TAF desejado. Em modalidades exemplificativas, o nível de glicoformas TAF na composição de proteína glicosilada recombinante (por exemplo, composição de anticorpo ou composição de proteína de ligação a anticorpos) é menor do que ou cerca de 10% e, em aspectos exemplificativos, o método compreende manter células competentes para glicosilação em um meio de cultura de células compreendendo fucose, em que fucose está presente no meio de cultura a uma concentração situada entre cerca de 0,17 g/L e cerca de 1,0 g/L. Em modalidades exemplificativas, o nível de glicoformas TAF na composição de proteína glicosilada recombinante (por exemplo, composição de anticorpo ou composição de proteína de ligação a anticorpos) é menor do que ou cerca de 10% e, em aspectos exemplificativos, o método compreende manter células competentes para glicosilação em um meio de cultura de células compreendendo fucose, em que fucose está

presente no meio de cultura a uma concentração situada entre cerca de 0,1 g/L e cerca de 1,0 g/L, e em que as células competentes para glicosilação não são geneticamente modificadas para alterar a atividade de uma enzima da via *de novo* ou da via de salvamento. A revelação também proporciona métodos de produção de uma composição de proteína glicosilada recombinante (por exemplo, uma composição de anticorpo ou composição de proteína de ligação a anticorpos) compreendendo manter células competentes para glicosilação em um meio de cultura de células compreendendo fucose e glicose, em que fucose está presente no meio de cultura a uma concentração de cerca de 0,1 g/L até cerca de 1,0 g/L e adicionar glicose ao meio de cultura de células de acordo com uma calendarização de alimentação com glicose que alcança uma concentração média de glicose de cerca de 10 g/L ou menos. Em aspectos exemplificativos, fucose está presente no meio de cultura a uma concentração menor do que cerca de 0,75 g/L, opcionalmente menor do que cerca de 0,6 g/L. Em casos exemplificativos, fucose está presente no meio de cultura a uma concentração de cerca de 0,2 g/L até cerca de 0,5 g/L. Em alguns aspectos, fucose está presente no meio de cultura enquanto as células competentes para glicosilação são mantidas em cultura de células. Em casos exemplificativos, o método de produção de uma composição de proteína glicosilada recombinante (por exemplo, uma composição de anticorpo ou composição de proteína de ligação a anticorpos) compreende manter as células competentes para glicosilação em um primeiro meio de cultura de células durante um período de tempo inicial e subsequentemente

manter as células competentes para glicosilação em um segundo meio de cultura de células, em que o primeiro meio de cultura de células não compreende fucose a uma concentração de cerca de 0,1 g/L até cerca de 1,0 g/L e o segundo meio de cultura de células compreende fucose a uma concentração de cerca de 0,1 g/L até cerca de 1,0 g/L. Em alguns casos, o período de tempo inicial é cerca de 24 até cerca de 72 horas. Em aspectos alternativos, o período de tempo inicial é cerca de ou maior do que cerca de 72 horas, mas menor do que ou cerca de 156 horas. Em alguns aspectos, fucose é adicionada ao primeiro meio de cultura no 6º dia pós-inoculação da cultura de células para se obter o segundo meio de cultura de células. A concentração de fucose flutua em cerca de 0,2 g/L ou menos (por exemplo, 0,1 g/L ou menos) durante o período em que as células competentes para glicosilação são mantidas no meio de cultura de células compreendendo fucose. Em alguns aspectos, o meio de cultura de células compreende uma concentração de glicose inicial durante um período de tempo inicial. Opcionalmente, a concentração de glicose inicial é cerca de 1 g/L até cerca de 15 g/L, por exemplo, cerca de  $12 \text{ g/L} \pm 1 \text{ g/L}$ . Em aspectos exemplificativos, o método também compreende adicionar glicose ao meio de cultura de células de acordo com uma calendarização de alimentação com glicose. Em aspectos exemplificativos, a calendarização de alimentação com glicose é iniciada a cerca de 4 até cerca de 6 dias pós-inoculação da cultura de células. Por exemplo, a calendarização de alimentação com glicose pode ser iniciada a cerca de 6 dias pós-inoculação da cultura de células. Em casos exemplificativos, a calendarização de

alimentação com glicose alcança uma concentração média de glicose de cerca de 10 g/L ou menos (por exemplo, cerca de 9 g/L ou menos, cerca de 6 g/L ou menos) no meio de cultura de células, cerca de 0,5 g/L até cerca de 4 g/L). Em casos exemplificativos, a calendarização de alimentação com glicose alcança uma concentração média de glicose baseada na concentração de fucose no meio de cultura de células. Em aspectos exemplificativos, a concentração média de glicose é calculada com base na Fórmula I:

$$T = 3,354 - 1,388F + 0,111G + [F - 0,4375] \times [1,9527(F - 0,4375)]$$

(Fórmula I)

em que T é a % de glicanas afucosiladas totais (TAF) visada na composição de anticorpo e é cerca de 2,5% até cerca de 6%, cerca de 2,75% até cerca de 5,5% ou cerca de 3% até cerca de 5%, F é a concentração (g/L) de fucose no meio, e G é a concentração média de glicose (g/L) no meio. Em aspectos exemplificativos, (i) a concentração de fucose é cerca de  $0,2 \pm 0,1$  g/L e a concentração média de glicose é cerca de 2 até cerca de 4 g/L; (ii) a concentração de fucose é cerca de  $0,5 \pm 0,1$  g/L e a concentração média de glicose é cerca de 3 até cerca de 6 g/L; ou (iii) a concentração de fucose é cerca de  $0,75 \pm 0,1$  g/L e a concentração média de glicose é cerca de 4,5 até cerca de 9 g/L. Em aspectos exemplificativos, o pH do meio de cultura de células é cerca de 6,85 até cerca de 7,05 (por exemplo, cerca de 6,90 até cerca de 7,00). Em alguns aspectos, as células competentes para glicosilação não são geneticamente modificadas para alterar a atividade de uma enzima da via

*de novo* ou da via de salvamento. Por exemplo, as células competentes para glicosilação não são geneticamente modificadas para nocaute de um gene codificando GDP-ceto-6-desoximanose-3,5-epimerase, 4-redutase. Em casos exemplificativos, o nível de glicanas afucosiladas totais (TAF) na composição de anticorpo é menor do que cerca de 10% (por exemplo, cerca de 2% até cerca de 6%, cerca de 2% até cerca de 5%, cerca de 2% até cerca de 4%). Em casos exemplificativos, o nível de glicanas ricas em manose na composição de anticorpo é menor do que cerca de 3,5% (por exemplo, cerca de 0,7% até cerca de 3,0%). Em casos exemplificativos, o nível de glicanas afucosiladas na composição de anticorpo é menor do que cerca de 3,5% (por exemplo, cerca de 0,8% até cerca de 2,8%). Em alguns aspectos, as células competentes para glicosilação produzem anticorpos IgG, opcionalmente anticorpos IgG1. Em alguns aspectos, os anticorpos IgG1 são específicos para um antígeno associado a tumores (por exemplo, CD20). Em aspectos exemplificativos, o meio de cultura não compreende manose.

**[00138]** Um meio de cultura de células compreendendo: (a) células competentes para glicosilação compreendendo um ácido nucleico exógeno codificando um anticorpo; e (b) um meio de cultura compreendendo fucose a uma concentração de cerca de 0,1 g/L até cerca de 1,0 g/L ou cerca de 0,17 g/L até cerca de 1,0 g/L, é proporcionado. Em aspectos exemplificativos, as células competentes para glicosilação não são geneticamente modificadas para alterar a atividade de uma enzima da via *de novo* ou da via de salvamento, opcionalmente em que as células competentes para

glicosilação não são geneticamente modificadas para nocaute de um gene codificando GDP-ceto-6-desoximanose-3,5-epimerase, 4-redutase. Em aspectos exemplificativos, o meio de cultura compreende adicionalmente glicose a uma concentração menor do que cerca de 10 g/L, por exemplo, menor do que cerca de 9 g/L, menor do que cerca de 6 g/L ou cerca de 0,5 g/L até cerca de 4 g/L. Em aspectos exemplificativos, o pH do meio de cultura é cerca de 6,85 até cerca de 7,05, por exemplo, cerca de 6,9 até cerca de 7,0. Em alguns aspectos, o meio de cultura de células não compreende manose. Em aspectos exemplificativos, o anticorpo é um anticorpo IgG, por exemplo, um anticorpo IgG1. Em casos exemplificativos, o anticorpo IgG1 é específico para um antígeno associado a tumores, por exemplo, CD20.

**[00139]** Métodos de alteração ou modulação do nível de glicanas TAF de uma composição de proteína glicosilada recombinante (por exemplo, uma composição de anticorpo ou composição de proteína de ligação a anticorpos) produzidas por células competentes para glicosilação em um meio de cultura de células são adicionalmente proporcionados aqui. Em aspectos exemplificativos, o método compreende (A) adicionar fucose a um meio de cultura de células compreendendo as células competentes para glicosilação para alcançar uma concentração de fucose de cerca de 0,1 g/L até cerca de 1,0 g/L para decrescer o nível de glicanas TAF; (B) adicionar glicose a um meio de cultura de células compreendendo as células competentes para glicosilação para alcançar uma concentração de glicose menor do que cerca de 10 g/L para aumentar o nível de glicanas TAF; ou (C) ambos

de (A) e (B). Também são proporcionados métodos de modulação do nível de glicanas afucosiladas de uma composição de proteína glicosilada recombinante (por exemplo, uma composição de anticorpo ou composição de proteína de ligação a anticorpos) produzidas por células competentes para glicosilação. Em modalidades exemplificativas, o método compreende (A) adicionar fucose a um meio de cultura de células compreendendo as células competentes para glicosilação para alcançar uma concentração de fucose de cerca de 0,1 g/L até cerca de 1,0 g/L para decrescer o nível de glicanas afucosiladas; (B) adicionar glicose a um meio de cultura de células compreendendo as células competentes para glicosilação para alcançar uma concentração de glicose menor do que ou cerca de 10 g/L para aumentar o nível de glicanas afucosiladas; ou (C) ambos de (A) e (B). A presente revelação proporciona adicionalmente um método de modulação do nível de glicanas ricas em manose de uma composição de proteína glicosilada recombinante (por exemplo, uma composição de anticorpo ou composição de proteína de ligação a anticorpos) produzidas por células competentes para glicosilação. Em modalidades exemplificativas, o método compreende adicionar glicose a um meio de cultura de células compreendendo as células competentes para glicosilação para alcançar uma concentração de glicose menor do que cerca de 10 g/L para aumentar o nível de glicanas HM. Em aspectos exemplificativos dos métodos de modulação, as células competentes para glicosilação não são geneticamente modificadas para alterar a atividade de uma enzima da via *de novo* ou da via de salvamento. Por exemplo, as células

competentes para glicosilação não são, em alguns aspectos, geneticamente modificadas para nocaute de um gene codificando GDP-ceto-6-desoximanose-3,5-epimerase, 4-redutase. Em alguns aspectos, o nível de glicanas TAF na composição de anticorpo é menor do que ou cerca de 10% (por exemplo, cerca de 2% até cerca de 6%, cerca de 2% até cerca de 5%, cerca de 2% até cerca de 4%). Em alguns aspectos, o nível de glicanas ricas em manose na composição de anticorpo é menor do que ou cerca de 3,5% (por exemplo, cerca de 0,7% até cerca de 3,0%). Em alguns aspectos, o nível de glicanas afucosiladas na composição de anticorpo é menor do que ou cerca de 3,5% (por exemplo, cerca de 0,8% até cerca de 2,8%). Em aspectos exemplificativos, a concentração de fucose é cerca de 0,17 g/L até cerca de 1,0 g/L, opcionalmente cerca de 0,2 g/L até cerca de 0,5 g/L. Em alguns aspectos, o método também compreende adicionar glicose ao meio de cultura de células de acordo com uma calendarização de alimentação com glicose que alcança uma concentração média de glicose de cerca de 10 g/L (por exemplo, menor do que cerca de 9,0 g/L, menor do que cerca de 6,0 g/L, menor do que cerca de 4,0 g/L). Em alguns casos, a concentração média de glicose é baseada na concentração de fucose do meio de cultura de células. Por exemplo, em alguns aspectos, a concentração média de glicose é calculada com base na Fórmula I:

$$T = 3,354 - 1,388F + 0,111G + [F - 0,4375] \times [1,9527(F - 0,4375)]$$

Fórmula I

em que T é a % de glicanas afucosiladas totais (TAF) visada em uma composição de anticorpo e é cerca de 2,5% até cerca

de 6%, cerca de 2,75% até cerca de 5,5% ou cerca de 3% até cerca de 5%, F é a concentração (g/L) de fucose no meio, e G é a concentração média de glicose (g/L).

**[00140]** Os seguintes exemplos são apresentados meramente para ilustrar a presente divulgação e não, de modo algum, para limitar o seu escopo.

## EXEMPLOS

### EXEMPLO 1

**[00141]** Este exemplo descreve os métodos conduzidos e materiais usados nas experiências do Exemplo 2.

**[00142]** Linhagens de células, cultura de células e meios

**[00143]** Todas as experiências foram realizadas usando um clone expressando um anticorpo compreendendo uma cadeia leve compreendendo a SEQ ID NO. 1 e uma cadeia pesada compreendendo a SEQ ID NO: 2. Todas as experiências foram realizadas usando um frasco separado de células cultivadas durante 25 dias. Os seguintes parâmetros foram mantidos constantes: duração (12 dias), oxigênio dissolvido (48 mm Hg até 74 mm Hg), pH (6,85 até 7,05), agitação (350 RPM, 20 W/m<sup>3</sup>), temperatura (36,0 °C).

**[00144]** Mapa de Glicanas por Cromatografia Líquida de Interação Hidrofílica (HILIC)

**[00145]** O mapa de glicanas de glicanas N-ligadas enzimaticamente liberadas foi determinado usando HILIC. Em resumo, glicanas foram incubadas com uma solução

compreendendo PNGase F e um tampão de fosfato de sódio (pH 7,5) durante ~2 horas a ~37 °C. Uma solução de etiquetagem compreendendo ácido 2-aminobenzoico (2-AA) e cianoboro-hidreto de sódio foi então adicionada às glicanas tratadas com PNGase F e a mistura foi incubada durante ~80 °C durante cerca de 75 minutos. Após a incubação, as misturas foram centrifugadas para se obter um pélete de proteína precipitada. Sobrenadantes foram recolhidos e colocados em frascos.

**[00146]** As glicanas foram separadas por HILIC, em linha com um detector de fluorescência: Glicanas foram injetadas e ligadas à coluna em condições orgânicas ricas (a Fase Móvel A e Fase Móvel B foram formato de amônio e acetonitrila, respectivamente) e então eluíram com um gradiente crescente de um tampão aquoso de formato de amônio. Foi alcançada alta resolução usando um formato de coluna de partículas pequenas de 1,7 µm e comprimento da coluna de 150 mm. O tempo total de processamento, incluindo re-equilíbrio da coluna, foi 155 minutos.

## EXEMPLO 2

**[00147]** Este exemplo demonstra os efeitos do aumento dos níveis de glicose e fucose no meio de cultura na % de TAF.

**[00148]** Células expressando um anticorpo compreendendo uma cadeia leve da SEQ ID NO: 1 e uma cadeia pesada da SEQ ID NO: 2 foram adicionadas a um biorreator contendo um de três meios de cultura: um meio de cultura de controle, um primeiro meio de cultura de teste, e um segundo meio de cultura de teste. O primeiro meio de cultura de teste foi

idêntico ao meio de cultura de controle, com a exceção de que continha duas vezes a quantidade de glicose, e o segundo meio de cultura de teste foi o meio de cultura de controle com 0,5 g/L de fucose. Cada um dos meios de cultura não tinha manose. A cultura de células foi mantida durante 12 dias a um pH situado entre 6,85 e 7,05.

**[00149]** Amostras dos meios foram periodicamente recolhidas dos biorreatores para medição da concentração de glicose, níveis de TAF e níveis de ADCC. Níveis de glicanas TAF e/ou afucosiladas (Afuc) foram avaliados via um procedimento de mapeamento de N-glicanas por HILIC, e a capacidade para estimular ADCC foi testada usando um ensaio *in vitro*. Os resultados são mostrados na TABELA 1 abaixo.

TABELA 1

| <u>Meio de Cultura</u> | <u>Nível de TAF (%)</u> | <u>ADCC (%)</u> |
|------------------------|-------------------------|-----------------|
| Gama Visada            | 2,0-4,2%                | 69-97%          |
| Controle               | 4,00 ± 0,23%            | ~100%           |
| Primeiro Teste         | 5,87 ± 0,23%            | 152 ± 15%       |
| Segundo Teste          | ~3,4%                   | ~85%            |

Os níveis de ADCC são expressos como % relativamente ao nível de ADCC alcançado com o controle, que é um anticorpo comercialmente disponível tendo a mesma sequência de aminoácidos.

**[00150]** As concentrações de glicose foram determinadas ao longo do procedimento de cultura e estas medições foram representadas graficamente em função do tempo e em relação

a níveis de TAF dos anticorpos produzidos em cada tipo do meio de cultura de células. Os resultados são mostrados na Figura 3. Como mostrado nesta figura, os anticorpos produzidos por células cultivadas na primeira cultura de teste demonstraram um aumento de TAF, cujo aumento correspondeu ao aumento dos níveis de glicose na cultura de células. Estes resultados (e os resultados da TABELA 1) sugerem que glicose pode afetar níveis de TAF e ADCC.

**[00151]** Os anticorpos produzidos por células cultivadas no segundo meio de cultura de teste compreendendo 0,5 g/L de fucose exibiram um decréscimo de ~1% de TAF (Figura 3). Como mostrado na Figura 3, a concentração de fucose não se alterou muito ao longo da ronda de 12 dias, provavelmente porque a captação de fucose por células foi desprezável.

**[00152]** Foi realizada análise adicional das espécies de glicanas separadas dos anticorpos produzidos em cada um dos diferentes meios de cultura. É interessante notar que, como mostrado na Figura 4, a % de glicanas ricas em manose (HM) aumentou quando as células foram cultivadas no primeiro meio de teste que continha 2 vezes a quantidade de glicose em comparação com o meio de controle. Este aumento da % de glicanas HM não foi alcançado por células cultivadas no segundo meio de teste contendo fucose. Como mostrado na Figura 4, a % de glicanas HM de anticorpos produzidos por células cultivadas no segundo meio de teste contendo fucose foi aproximadamente igual à % de glicanas HM dos anticorpos produzidos por células cultivadas no meio de controle.

**[00153]** Os efeitos da cultura em meio contendo duas vezes a quantidade de glicose (primeiro meio de teste) ou

contendo fucose (segundo meio de teste) na % de glicanas afucosiladas foi similar a esses efeitos na % de glicanas TAF. Como mostrado na Figura 5, células cultivadas no primeiro meio de teste compreendendo a concentração mais elevada de glicose demonstraram um aumento em glicanas afucosiladas, ao passo que células cultivadas no segundo meio de teste compreendendo fucose produziram anticorpos com glicanas afucosiladas decrescidas.

**[00154]** Este exemplo demonstrou que glicose e fucose são alavancas que podem ser usadas para modular níveis de glicanas ricas em manose e afucosiladas bem como ter impacto na ADCC.

### EXEMPLO 3

**[00155]** Este exemplo apresenta estudos adicionais demonstrando glicose e fucose como alavancas para a modulação de níveis de TAF e ADCC.

**[00156]** Uma experiência fatorial completa multivariada de seguimento foi planejada para (1) elucidar os efeitos principais, de interação e quadráticos de variáveis de fucose e glicose e (2) encontrar quantidades para estas variáveis que conduzam a níveis modificados de glicanas TAF e ADCC. Fucose foi avaliada em meios de cultura a concentrações de 0 g/L, 0,5 g/L e 1 g/L. Glicose foi alimentada a taxas de 0X, 1X (controle) e 2X. 0X significou que não foi adicionada nenhuma solução de estoque de glicose às culturas e tal se traduziu em uma concentração de glicose residual de ~ 1g/L após o Dia 6 da cultura de células. Glicose foi fornecida somente através dos meios, que continham 12 g/L do açúcar. À alimentação de 1X,

glicose foi mantida a uma concentração média de  $3 \pm 1$  g/L após o início da alimentação de glicose. Na alimentação 2X, os níveis médios de glicose foram mantidos a  $6 \pm 1$  g/L. Os resultados indicam que concentrações de fucose podem ser alteradas para terem impacto nos níveis de TAF (Figura 6) e níveis de ADCC (Figura 7).

**[00157]** Nestas experiências, a concentração de glicose foi controlada a  $3 \pm 1$  g/L após o início da alimentação (isto é, após o Dia 6). Quando as concentrações de glicose excederam 4 g/L, não foi adicionada nenhuma glicose suplementar e as células tiveram de se basear na glicose residual presente no biorreator e glicose proveniente do meio de perfusão até o nível de glicose se situar na gama de controle. Com base nestas experiências, foram previstos valores de TAF para as diferentes concentrações de fucose e glicose, de acordo com um modelo mostrado na Figura 8. O modelo demonstra que o Perfil de Qualidade do Produto-Alvo (QTTP) pode ser alcançado por cultura das células em um meio de cultura compreendendo cerca de 0,1 g/L até cerca de 1,0 g/L de fucose e/ou cerca de 0,5 g/L até cerca de 4,0 g/L de glicose. Foram previstos valores de TAF para as seguintes concentrações de fucose e glicose diferentes utilizando este modelo: 0,2 g/L de fucose e 3 g/L de glicose, 0 g/L de fucose e 0,554 g/L de glicose; e 0,492 g/L de fucose e 6 g/L de glicose. Figuras 9A-9C. Estes resultados sugeriram que há vários modos de alcançar os níveis de TAF e níveis de ADCC desejados.

**[00158]** Para confirmar as previsões das Figuras 9A-9C, foram realizadas experiências adicionais. Um resumo das experiências é apresentado na TABELA 2.

TABELA 2

| <b>Condição</b> | <b>Fucose (g/L)</b> | <b>Glicose (g/L)</b> | <b>TAF (IC 95%)</b> | <b>TAF real</b> | <b>ADCC (IC 95%)</b> | <b>ADCC real</b> |
|-----------------|---------------------|----------------------|---------------------|-----------------|----------------------|------------------|
| 1               | 0                   | 0X                   | 3,50-4,06           | 3,50            | 75,7-90,9            | 80,13            |
| 2<br>(controle) | 0                   | 1X                   | 3,68-4,22           | 3,84            | 84,5-101,1           | 100,3            |
| 3               | 0,2                 | 1X                   | 3,30-3,73           | 3,35            | 78,3-90,4            | 85,9             |
| 4               | 0,5                 | 1X                   | 2,67-3,30           | 2,94            | 66,8-83,14           | 76,2             |

0X, a concentração de glicose foi medida a ~ 1 g/L após o Dia 6; 1X, a concentração de glicose foi medida a ~ 3±1 g/L; 2X, a concentração de glicose foi medida a ~ 6±1 g/L.

**[00159]** Este exemplo demonstrou que a concentração de glicose e concentração de fucose são variáveis que podem ser manipuladas para modificar os níveis de TAF e ADCC.

#### EXEMPLO 4

**[00160]** Este exemplo demonstra o impacto de fucose nas culturas de células.

**[00161]** Análises adicionais foram realizadas nas culturas de células descritas acima. Por exemplo, a osmolalidade das culturas de células foi medida e variou desde cerca de 175 mOsm/kg até cerca de 345 mOsm/kg. Foi observada ausência de correlação entre a osmolalidade das culturas de células e a concentração de fucose. Ver Figura 10. Como mostrado nesta figura, a adição de fucose ao meio de cultura não aparenta afetar a osmolalidade em nenhum modo particular. O fato de a osmolalidade ter variado muito na condição de controle (sem fucose) sugere que componentes no meio de cultura (diferentes de fucose) afetam ativamente a osmolalidade.

**[00162]** Em uma experiência deste estudo de fucose, células foram inoculadas em um de cinco biorreatores, dois dos quais continham meio de cultura sem qualquer fucose (ctrl\_a e ctrl\_b) e três dos quais continham meio de cultura com 0,5 g/L de fucose (fuc\_a, fuc\_b, e fuc\_c). Amostras dos meios das cinco culturas de células foram recolhidas ao longo do período de cultura de 12 dias no Dia 0, Dia 3, Dia 5, Dia 7, Dia 9, e Dia 12. As amostras foram medidas quanto à concentração de fucose. Como mostrado na Figura 11, a concentração de fucose não se alterou substancialmente ao longo do período de cultura, sugerindo o consumo pequeno e/ou lento de fucose durante este processo de cultura.

**[00163]** Em outra experiência deste estudo de fucose, células foram mantidas em cultura de células durante 12 dias em um meio de cultura não contendo fucose. Nesta experiência particular, o pH da cultura de células foi

perturbado relativamente ao valor 7,1, fazendo aumentar a % de TAF para cerca de 5,5% desde o Dia 5 até ~ Dia 8. A % de TAF foi medida diariamente a partir do Dia 5. Em uma tentativa de modular os níveis de TAF de novo para o alvo de 4,0%, fucose foi adicionada no 9º dia de cultura a uma taxa de alimentação de 0,9 g/L por dia. Como mostrado na Figura 12, a % de TAF decresceu de cerca de 5,5% por adição de fucose ao meio de cultura. A % de TAF continuou a decrescer até ~3,8% no Dia 12. Estes dados sugerem que a adição de fucose pode ocorrer tardiamente no período de cultura e ainda causar modulação da % de TAF.

**[00164]** Este exemplo demonstrou o impacto da concentração de fucose no meio de cultura nos níveis de TAF.

#### EXEMPLO 5

**[00165]** Este exemplo demonstra que a manutenção de glicose na gama-alvo pode ocorrer tardiamente no período de cultura.

**[00166]** Foram realizadas três experiências para monitorar o momento em que a gama de glicose visada foi alcançada durante um período de cultura de 12 dias. Para cada experiência, a concentração de glicose inicial de cada cultura de células variou desde cerca de 5,0 g/L até cerca de 6,0 g/L. As concentrações de glicose dos meios de cultura de células foram monitoradas em uma base diária. Como mostrado na Figura 13, cada uma das culturas de células alcançou a concentração visada de glicose (0,5 g/L – 4,0 g/L) em dias diferentes do período de cultura. Em uma experiência (linha com quadrados brancos), a gama visada

foi alcançada no Dia 2. Em uma segunda experiência (linha tracejada com losangos brancos), a gama visada foi alcançada no Dia 4, ao passo que em uma terceira experiência (linha tracejada com círculos brancos), a gama visada foi alcançada no Dia 6. Apesar destas diferenças, cada cultura de células alcançou a gama visada de % de TAF (~2,0% até ~4,3%) (ver gráfico da esquerda da Figura 13; terceira experiência representada por círculos brancos; segunda experiência representada por losangos brancos; primeira experiência representada por quadrados brancos). Estes dados sugerem que a manutenção de glicose pode ocorrer mais tarde no período de cultura para alcançar os mesmos níveis de TAF de culturas mantidos mais cedo durante o período de cultura.

**[00167]** Estes dados demonstram que o controle inicial e tardio de concentrações de glicose conduzem a níveis similares de TAF.

#### EXEMPLO 6

**[00168]** Este exemplo demonstra os efeitos da diminuição do pH de uma cultura de células no nível de afucosilação de um anticorpo com e sem a adição de fucose.

**[00169]** Uma amostra de uma cultura de células foi removida de um biorreator de 2000 L e usada para inocular biorreatores paralelos de 3 L. Os biorreatores de 2000 L e 3 L foram alimentados usando um processo contínuo com alimentação programada com Alimentação A e Alimentação B durante 12 dias. Dois dos biorreatores de 3 L foram alimentados com fucose para uma concentração final de 1,0 g/L no Dia 5. Os níveis de afucosilação foram medidos como

descrito no Exemplo 1 e os resultados são disponibilizados na Tabela 3.

TABELA 3

| <b>pH</b> | <b>Adição de<br/>Fucose</b> | <b>% de afucosilação</b> |
|-----------|-----------------------------|--------------------------|
| 7,09      | -                           | 6,29                     |
| 7,09      | -                           | 6,317                    |
| 7,07      | -                           | 6,559                    |
| 7,07      | +                           | 4,384                    |
| 7,12      | -                           | 7,13                     |
| 7,13      | -                           | 7,24                     |
| 7,18      | -                           | 8,365                    |
| 7,19      | -                           | 7,917                    |
| 7,18      | +                           | 6,183                    |

**[00170]** Como mostrado na Tabela 3, na ausência da adição de fucose, quando o pH foi menor do que 7,1, a % de afucosilação média foi 6,39, ao passo que quando o pH foi maior do que 7,10 mas menor do que 7,15, a % de afucosilação média foi mais elevada (% de afucosilação = 7,185). Quando o pH foi maior do que 7,15, a % de afucosilação média foi ainda mais elevada (% de afucosilação = 8,276). Assim, um pH menor foi associado a uma % de afucosilação menor.

**[00171]** Quando fucose foi adicionada ao meio de cultura (para alcançar uma concentração final de 1,0 g/L de

fucose), a % de afucosilação decresceu substancialmente a um pH menor (7,07) e a um pH maior (7,18). Para cada um destes níveis de pH, quando fucose foi adicionada, o decréscimo médio da % de afucosilação foi 2,18%.

**[00172]** Estes resultados sugerem que diminuir o pH do meio de cultura de células e/ou adicionar fucose ao meio de cultura de células conduzem a uma percentagem de afucosilação diminuída. Quando pH foi diminuído e fucose foi adicionada ao meio de cultura de células, foi observada uma redução maior da percentagem de afucosilação.

#### EXEMPLO 7

**[00173]** Este exemplo demonstra adicionalmente os efeitos da diminuição do pH de uma cultura de células no nível de afucosilação de um anticorpo com e sem a adição de fucose.

**[00174]** Uma amostra de uma cultura de células de um biorreator de 2000 L foi usada para inocular biorreatores paralelos de 3 L. Os biorreatores de 2000 L e 3 L foram alimentados usando um processo contínuo com alimentação programada usando Alimentação A e Alimentação B durante 12 dias. Alguns dos biorreatores (isto é, cultura de células) foram alimentados com fucose para uma concentração final de 0,25, 0,5 ou 1 g/L no Dia 5. Os níveis de afucosilação foram medidos como descrito no Exemplo 1 e os resultados são disponibilizados na Figura 14.

**[00175]** Como mostrado na Figura 14, o biorreator de 3 L de controle (Controle pH 7,1) exibiu um nível de afucosilação similar ao do biorreator de 2000 L original. Ambos exibiram % de afucosilação de cerca de 6,5% ou maior.

A adição de fucose a quaisquer dos níveis testados conduziu a um decréscimo substancial da % de afucosilação (5,5% ou menor). A percentagem de afucosilação foi a mais baixa com a adição de 0,25 g/L de fucose.

**[00176]** Além disso, como mostrado na Figura 14, a diminuição do pH de 7,1 para 7,0, sem adicionar fucose ao meio de cultura, também conduziu a um decréscimo da afucosilação de pelo menos cerca de 1,0%.

**[00177]** Todas as referências, incluindo publicações, pedidos de patentes e patentes, citadas aqui são deste modo incorporadas por referência na mesma medida como se cada referência fosse individualmente e especificamente indicada como estando incorporada por referência e fosse apresentada na sua totalidade aqui.

**[00178]** O uso dos termos “um” e “uma” e “o/a” e referentes similares no contexto da descrição da divulgação (especialmente no contexto das seguintes reivindicações) deve ser interpretado como abrangendo tanto o singular como o plural, a não ser que de outro modo indicado aqui ou claramente contradito pelo contexto. Os termos “compreendendo”, “tendo”, “incluindo” e “contendo” devem ser interpretados como termos abertos (isto é, significando “incluindo, mas sem limitação”), a não ser que de outro modo notado.

**[00179]** A indicação de gamas de valores aqui se destina meramente a servir como um método abreviado de referir individualmente cada valor separado caindo dentro da gama e cada ponto final, a não ser que de outro modo indicado

aqui, e cada valor e ponto final separados são incorporados no relatório descritivo tal como se fossem individualmente indicados aqui.

**[00180]** Todos os métodos descritos aqui podem ser realizados em qualquer ordem adequada a não ser que de outro modo indicado aqui ou de outro modo claramente contradito pelo contexto. O uso de quaisquer e todos os exemplos, ou linguagem exemplificativa (p.ex., "tal como") proporcionados aqui se destina meramente a esclarecer melhor a divulgação e não coloca uma limitação no escopo da divulgação a não ser que de outro modo reivindicado. Nenhuma linguagem no relatório descritivo deve ser interpretada como indicando qualquer elemento não reivindicado como essencial para a prática da divulgação.

**[00181]** Modalidades preferenciais desta divulgação são descritas aqui, incluindo o melhor modo conhecido pelos inventores para levar a cabo a divulgação. Variações dessas modalidades preferenciais podem se tornar claras aos habitualmente peritos na técnica após leitura da descrição anterior. Os inventores esperam que especialistas peritos empreguem tais variações consoante o apropriado, e os inventores pretendem que a divulgação seja praticada de outro modo que não especificamente descrito aqui. Conformemente, esta divulgação inclui todas as modificações e equivalentes do assunto indicado nas reivindicações anexas aqui como permitido pela lei aplicável. Além disso, qualquer combinação dos elementos acima descritos em todas suas variações possíveis é englobada pela divulgação a não

ser que de outro modo indicado aqui ou claramente  
contradito pelo contexto.

**REIVINDICAÇÕES**

1. Método de produção de uma composição de anticorpo em que o nível de glicanas afucosiladas totais (TAF) na composição de anticorpo é menor do que cerca de 10%, caracterizado pelo fato de que o método compreende manter células competentes para glicosilação em um meio de cultura de células compreendendo fucose, em que fucose está presente no meio de cultura a uma concentração de cerca de 0,17 g/L até cerca de 1,0 g/L.
2. Método de produção de uma composição de anticorpo em que o nível de glicanas afucosiladas totais (TAF) na composição de anticorpo é menor do que cerca de 10%, caracterizado pelo fato de que o método compreende manter células competentes para glicosilação em um meio de cultura de células compreendendo fucose, em que fucose está presente no meio de cultura a uma concentração de cerca de 0,1 g/L até cerca de 1,0 g/L, e em que as células competentes para glicosilação não são geneticamente modificadas para alterar a atividade de uma enzima da via *de novo* ou da via de salvamento.
3. Método de produção de uma composição de anticorpo, caracterizado pelo fato de que compreende manter células competentes para glicosilação em um meio de cultura de células compreendendo fucose e glicose, em que fucose está presente no meio de cultura a uma concentração de cerca de 0,1 g/L até cerca de 1,0

g/L e glicose é adicionada ao meio de cultura de células de acordo com uma calendarização de alimentação com glicose que alcança uma concentração média de glicose de cerca de 10 g/L ou menos.

4. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2 e 3, caracterizado pelo fato de que fucose está presente no meio de cultura a uma concentração menor do que cerca de 0,75 g/L.
5. Método, de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo fato de que fucose está presente no meio de cultura a uma concentração menor do que cerca de 0,6 g/L.
6. Método, de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo fato de que fucose está presente no meio de cultura a uma concentração de cerca de 0,2 g/L até cerca de 0,5 g/L.
7. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5 e 6, caracterizado pelo fato de que a fucose está presente no meio de cultura enquanto as células competentes para glicosilação são mantidas em cultura de células.
8. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5 e 6, caracterizado pelo fato de que compreende manter as células competentes para glicosilação em um primeiro meio de cultura de células durante um período de tempo inicial e subsequentemente manter as células competentes para glicosilação em um segundo meio de cultura de células, em que o primeiro meio de cultura de células não compreende fucose a uma concentração de

cerca de 0,1 g/L até cerca de 1,0 g/L e o segundo meio de cultura de células compreende fucose a uma concentração de cerca de 0,1 g/L até cerca de 1,0 g/L.

9. Método, de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelo fato de que o período de tempo inicial é cerca de 24 até cerca de 72 horas.
10. Método, de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelo fato de que o período de tempo inicial é cerca de ou maior do que cerca de 72 horas, mas menor do que ou cerca de 156 horas.
11. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 8, 9 e 10, caracterizado pelo fato de que fucose é adicionada ao primeiro meio de cultura no 6º dia pós-inoculação da cultura de células para se obter o segundo meio de cultura de células.
12. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 e 11, caracterizado pelo fato de que a concentração de fucose flutua em cerca de 0,2 g/L ou menos durante o período em que as células competentes para glicosilação são mantidas no meio de cultura de células compreendendo fucose.
13. Método, de acordo com a reivindicação 12, caracterizado pelo fato de que a concentração de fucose flutua em cerca de 0,1 g/L ou menos durante o período em que as células competentes para glicosilação são mantidas no meio de cultura de células compreendendo fucose.

14. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 e 13, caracterizado pelo fato de que o meio de cultura de células compreende uma concentração de glicose inicial durante um período de tempo inicial.
15. Método, de acordo com a reivindicação 14, caracterizado pelo fato de que a concentração de glicose inicial é cerca de 1 g/L até cerca de 15 g/L.
16. Método, de acordo com a reivindicação 15, caracterizado pelo fato de que a concentração de glicose inicial é cerca de  $12 \text{ g/L} \pm 1 \text{ g/L}$ .
17. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2 e 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 e 16, caracterizado pelo fato de que também compreende adicionar glicose ao meio de cultura de células de acordo com uma calendarização de alimentação com glicose.
18. Método, de acordo com a reivindicação 17, caracterizado pelo fato de que a calendarização de alimentação com glicose é iniciada a cerca de 4 até cerca de 6 dias pós-inoculação da cultura de células.
19. Método, de acordo com a reivindicação 18, caracterizado pelo fato de que a calendarização de alimentação com glicose é iniciada a cerca de 6 dias pós-inoculação da cultura de células.
20. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 17, 18 e 19, caracterizado pelo fato de que a calendarização de alimentação com glicose

alcança uma concentração média de glicose de cerca de 10 g/L ou menos no meio de cultura de células.

21. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 3 e 17, 18, 19 e 20, caracterizado pelo fato de que a calendarização de alimentação com glicose alcança uma concentração média de glicose de cerca de 9 g/L ou menos no meio de cultura de células.
22. Método, de acordo com a reivindicação 21, caracterizado pelo fato de que a calendarização de alimentação com glicose alcança uma concentração média de glicose de cerca de 6 g/L ou menos no meio de cultura de células.
23. Método, de acordo com a reivindicação 22, caracterizado pelo fato de que a calendarização de alimentação com glicose alcança uma concentração média de glicose de cerca de 0,5 g/L até cerca de 4 g/L no meio de cultura de células.
24. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 17, 18, 19, 20, 21, 22 e 23, caracterizado pelo fato de que a calendarização de alimentação com glicose alcança uma concentração média de glicose baseada na concentração de fucose no meio de cultura de células.
25. Método, de acordo com a reivindicação 24, caracterizado pelo fato de que a concentração média de glicose é calculada com base na Fórmula I:

$$T = 3,354 - 1,388F + 0,111G + [F - 0,4375] \times [1,9527(F - 0,4375)]$$

## (Fórmula I)

em que T é a % de glicanas afucosiladas totais (TAF) visada na composição de anticorpo e é cerca de 2,5% até cerca de 6%, cerca de 2,75% até cerca de 5,5% ou cerca de 3% até cerca de 5%, F é a concentração (g/L) de fucose no meio, e G é a concentração média de glicose (g/L) no meio.

26. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 24 e 25, caracterizado pelo fato de que (i) a concentração de fucose é cerca de  $0,2 \pm 0,1$  g/L e a concentração média de glicose é cerca de 2 até cerca de 4 g/L; (ii) a concentração de fucose é cerca de  $0,5 \pm 0,1$  g/L e a concentração média de glicose é cerca de 3 até cerca de 6 g/L; ou (iii) a concentração de fucose é cerca de  $0,75 \pm 0,1$  g/L e a concentração média de glicose é cerca de 4,5 até cerca de 9 g/L.
27. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 e 26, caracterizado pelo fato de que o pH do meio de cultura de células é cerca de 6,85 até cerca de 7,05.
28. Método, de acordo com a reivindicação 27, caracterizado pelo fato de que o pH do meio de cultura de células é cerca de 6,90 até cerca de 7,00.
29. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 e 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25,

26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33 e 34, caracterizado pelo fato de que as células competentes para glicosilação não são geneticamente modificadas para alterar a atividade de uma enzima da via *de novo* ou da via de salvamento.

30. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 2 e 29, caracterizado pelo fato de que as células competentes para glicosilação não são geneticamente modificadas para nocaute de um gene codificando GDP-ceto-6-desoximanose-3,5-epimerase, 4-redutase.
31. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 e 30, caracterizado pelo fato de que o nível de glicanas afucosiladas totais (TAF) na composição de anticorpo é menor do que cerca de 10%.
32. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 e 31, caracterizado pelo fato de que o nível de glicanas TAF é cerca de 2% até cerca de 6%.
33. Método, de acordo com a reivindicação 32, caracterizado pelo fato de que o nível de glicanas TAF é cerca de 2% até cerca de 5%.
34. Método, de acordo com a reivindicação 33, caracterizado pelo fato de que o nível de glicanas TAF na composição de anticorpo é cerca de 2% até cerca de 4%.

35. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33 e 34, caracterizado pelo fato de que o nível de glicanas ricas em manose na composição de anticorpo é menor do que cerca de 3,5%.
36. Método, de acordo com a reivindicação 35, caracterizado pelo fato de que o nível de glicanas ricas em manose na composição de anticorpo é cerca de 0,7% até cerca de 3,0%.
37. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 e 36, caracterizado pelo fato de que o nível de glicanas afucosiladas na composição de anticorpo é menor do que cerca de 3,5%.
38. Método, de acordo com a reivindicação 37, caracterizado pelo fato de que o nível de glicanas afucosiladas na composição de anticorpo é cerca de 0,8% até cerca de 2,8%.
39. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37 e 38, caracterizado pelo fato de que as células competentes para glicosilação produzem anticorpos IgG.

40. Método, de acordo com a reivindicação 39, caracterizado pelo fato de que as células competentes para glicosilação produzem anticorpos IgG1.
41. Método, de acordo com a reivindicação 40, caracterizado pelo fato de que os anticorpos IgG1 são específicos para um antígeno associado a tumores.
42. Método, de acordo com a reivindicação 41, caracterizado pelo fato de que o antígeno associado a tumores compreende a SEQ ID NO. 3.
43. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41 e 42, caracterizado pelo fato de que o meio de cultura não compreende manose.
44. Composição de anticorpo caracterizada pelo fato de que é produzida pelo método, conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42 e 43.
45. Composição farmacêutica caracterizada pelo fato de que compreende a composição de anticorpo, conforme definida na reivindicação 44, e um transportador, diluente ou excipiente farmacêuticamente aceitável.
46. Meio de cultura de células caracterizado pelo fato de que compreende:

- a. células competentes para glicosilação compreendendo um ácido nucleico exógeno codificando um anticorpo; e
- b. um meio de cultura compreendendo fucose a uma concentração de cerca de 0,1 g/L até cerca de 1,0 g/L ou cerca de 0,17 g/L até cerca de 1,0 g/L.

47. Meio de cultura de células, de acordo com a reivindicação 46, caracterizado pelo fato de que as células competentes para glicosilação não são geneticamente modificadas para alterar a atividade de uma enzima da via *de novo* ou da via de salvamento, opcionalmente em que as células competentes para glicosilação não são geneticamente modificadas para nocaute de um gene codificando GDP-ceto-6-desoximanose-3,5-epimerase, 4-redutase.
48. Meio de cultura de células, de acordo com qualquer uma das reivindicações 46 e 47, caracterizado pelo fato de que o meio de cultura compreende adicionalmente glicose a uma concentração menor do que cerca de 10 g/L, opcionalmente menor do que cerca de 9 g/L.
49. Meio de cultura de células, de acordo com a reivindicação 48, caracterizado pelo fato de que a concentração de glicose é cerca de 6 g/L ou menos.
50. Meio de cultura de células, de acordo com a reivindicação 49, caracterizado pelo fato de que a concentração de glicose é cerca de 0,5 g/L até cerca de 4 g/L.

51. Meio de cultura de células, de acordo com qualquer uma das reivindicações 46, 47, 48, 49 e 50, caracterizado pelo fato de que o pH do meio de cultura é cerca de 6,85 até cerca de 7,05.
52. Meio de cultura de células, de acordo com a reivindicação 51, caracterizado pelo fato de que o pH do meio de cultura de células é cerca de 6,90 até cerca de 7,00.
53. Meio de cultura de células, de acordo com qualquer uma das reivindicações 46, 47, 48, 49, 50, 51 e 52, caracterizado pelo fato de que o meio de cultura de células não compreende manose.
54. Meio de cultura de células, de acordo com qualquer uma das reivindicações 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52 e 53, caracterizado pelo fato de que o anticorpo é um anticorpo IgG.
55. Meio de cultura de células, de acordo com a reivindicação 54, caracterizado pelo fato de que o anticorpo IgG é um anticorpo IgG1.
56. Meio de cultura de células, de acordo com a reivindicação 55, caracterizado pelo fato de que o anticorpo IgG1 é específico para um antígeno associado a tumores.
57. Meio de cultura de células, de acordo com a reivindicação 56, caracterizado pelo fato de que o antígeno associado a tumores compreende a SEQ ID NO: 3.
58. Método de modulação do nível de glicanas TAF de uma composição de anticorpo produzidas por células competentes para glicosilação, caracterizado pelo

fato de que compreende (A) adicionar fucose a um meio de cultura de células compreendendo as células competentes para glicosilação para alcançar uma concentração de fucose de cerca de 0,1 g/L até cerca de 1,0 g/L para decrescer o nível de glicanas TAF; ou (B) adicionar glicose a um meio de cultura de células compreendendo as células competentes para glicosilação para alcançar uma concentração de glicose menor do que cerca de 10 g/L para aumentar o nível de glicanas TAF; ou (C) ambos de (A) e (B).

59. Método de modulação do nível de glicanas afucosiladas de uma composição de anticorpo produzidas por células competentes para glicosilação, caracterizado pelo fato de que compreende (A) adicionar fucose a um meio de cultura de células compreendendo as células competentes para glicosilação para alcançar uma concentração de fucose de cerca de 0,1 g/L até cerca de 1,0 g/L para decrescer o nível de glicanas afucosiladas; ou (B) adicionar glicose a um meio de cultura de células compreendendo as células competentes para glicosilação para alcançar uma concentração de glicose menor do que ou cerca de 10 g/L para aumentar o nível de glicanas afucosiladas; ou (C) ambos de (A) e (B).

60. Método de modulação do nível de glicanas ricas em manose de uma composição de anticorpo produzidas por células competentes para glicosilação, caracterizado pelo fato de que compreende adicionar glicose a um meio de cultura de células compreendendo as células

competentes para glicosilação para alcançar uma concentração de glicose menor do que ou cerca de 10 g/L para aumentar o nível de glicanas ricas em manose.

61. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 58, 59 e 60, caracterizado pelo fato de que as células competentes para glicosilação não são geneticamente modificadas para alterar a atividade de uma enzima da via *de novo* ou da via de salvamento.
62. Método, de acordo com a reivindicação 61, caracterizado pelo fato de que as células competentes para glicosilação não são geneticamente modificadas para nocaute de um gene codificando GDP-ceto-6-desoximanose-3,5-epimerase, 4-redutase.
63. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 58, 59, 60, 61 e 62, caracterizado pelo fato de que o nível de glicanas TAF na composição de anticorpo é menor do que ou cerca de 10%.
64. Método, de acordo com a reivindicação 63, caracterizado pelo fato de que o nível de glicanas TAF é cerca de 2% até cerca de 6%.
65. Método, de acordo com a reivindicação 64, caracterizado pelo fato de que o nível de glicanas TAF é cerca de 2% até cerca de 5%.
66. Método, de acordo com a reivindicação 65, caracterizado pelo fato de que o nível de glicanas TAF na composição de anticorpo é cerca de 2% até cerca de 4%.

67. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65 e 66, caracterizado pelo fato de que o nível de glicanas ricas em manose na composição de anticorpo é menor do que ou cerca de 3,5%.
68. Método, de acordo com a reivindicação 67, caracterizado pelo fato de que o nível de glicanas ricas em manose na composição de anticorpo é cerca de 0,7% até cerca de 3,0%.
69. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67 e 68, caracterizado pelo fato de que o nível de glicanas afucosiladas na composição de anticorpo é menor do que ou cerca de 3,5%.
70. Método, de acordo com a reivindicação 69, caracterizado pelo fato de que o nível de glicanas afucosiladas na composição de anticorpo é cerca de 0,8% até cerca de 2,8%.
71. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69 e 70, caracterizado pelo fato de que a concentração de fucose é cerca de 0,17 g/L até cerca de 1,0 g/L.
72. Método, de acordo com a reivindicação 71, caracterizado pelo fato de que a concentração de fucose é cerca de 0,2 g/L até cerca de 0,5 g/L.
73. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71 e 72, caracterizado pelo fato de que também compreende adicionar glicose ao meio de

cultura de células de acordo com uma calendarização de alimentação com glicose que alcança uma concentração média de glicose de cerca de 10 g/L, opcionalmente menos.

74. Método, de acordo com a reivindicação 73, caracterizado pelo fato de que a concentração média de glicose é menor do que cerca de 6,0 g/L, opcionalmente menor do que cerca de 4,0 g/L.

75. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 73 ou 74, caracterizado pelo fato de que a concentração média de glicose é baseada na concentração de fucose do meio de cultura de células.

76. Método, de acordo com a reivindicação 75, caracterizado pelo fato de que a concentração média de glicose é calculada com base na Fórmula I:

$$T = 3,354 - 1,388F + 0,111G + [F - 0,4375] \times [1,9527(F - 0,4375)]$$

Fórmula I

em que T é a % de glicanas afucosiladas totais (TAF) visada em uma composição de anticorpo e é cerca de 3% até cerca de 5%, F é a concentração (g/L) de fucose no meio, e G é a concentração média de glicose (g/L).

77. Método de modulação do nível de glicanas afucosiladas de uma composição de anticorpo produzidas por células competentes para glicosilação, caracterizado pelo fato de que compreende reduzir o pH do meio de cultura de células em cerca de 0,03 até cerca de 1,2 para

reduzir o nível de glicanas afucosiladas de uma composição de anticorpo em cerca de 0,5% até cerca de 2% ou aumentar o pH do meio de cultura de células em cerca de 0,03 até cerca de 1,2 para aumentar o nível de glicanas afucosiladas de uma composição de anticorpo em cerca de 0,5% até cerca de 2%.

78. Método, de acordo com a reivindicação 77, caracterizado pelo fato de que compreende reduzir o pH do meio de cultura de células em cerca de 0,05 até cerca de 1,2 para reduzir o nível de glicanas afucosiladas da composição de anticorpo em cerca de 1% até cerca de 2% ou aumentar o pH do meio de cultura de células em cerca de 0,05 até cerca de 1,2 para aumentar o nível de glicanas afucosiladas da composição de anticorpo em cerca de 1% até cerca de 2%.

79. Método, de acordo com a reivindicação 77, caracterizado pelo fato de que compreende reduzir o pH do meio de cultura de células em cerca de 0,03 até cerca de 0,07 para reduzir o nível de glicanas afucosiladas da composição de anticorpo em cerca de 0,5% até cerca de 1,1% ou aumentar o pH do meio de cultura de células em cerca de 0,03 até cerca de 0,07 para aumentar o nível de glicanas afucosiladas da composição de anticorpo em cerca de 0,5% até cerca de 1,1%.

80. Método de redução do nível de glicanas afucosiladas de uma composição de anticorpo produzidas por células competentes para glicosilação em cerca de 1% até cerca de 2%, caracterizado pelo

fato de que compreende reduzir o pH do meio de cultura de células em cerca de 0,05 até cerca de 1,2.

81. Método, de acordo com a reivindicação 80, caracterizado pelo fato de que compreende reduzir o pH em cerca de 0,05 até cerca de 0,07 para uma redução em glicanas afucosiladas de cerca de 1%.
82. Método, de acordo com a reivindicação 80, caracterizado pelo fato de que compreende reduzir o pH em cerca de 0,09 até cerca de 1,2 para uma redução em glicanas afucosiladas maior do que cerca de 1,5%.
83. Método, de acordo com a reivindicação 80, caracterizado pelo fato de que compreende cultivar as células a um pH situado entre cerca de 7,10 até cerca de 7,20, opcionalmente cerca de 7,12 até cerca de 7,19.
84. Método de redução do nível de glicanas afucosiladas de uma composição de anticorpo produzidas por células competentes para glicosilação em cerca de 0,5% até cerca de 1,1%, caracterizado pelo fato de que compreende reduzir o pH do meio de cultura de células em cerca de 0,03-0,07.
85. Método, de acordo com a reivindicação 84, caracterizado pelo fato de que compreende reduzir o pH em cerca de 0,03 até cerca de 0,06 para uma redução em glicanas afucosiladas de cerca de 0,8%.
86. Método, de acordo com a reivindicação 84, caracterizado pelo fato de que compreende reduzir o

pH em cerca de 0,05 até cerca de 0,07 para uma redução em glicanas afucosiladas de cerca de 1%.

87. Método, de acordo com a reivindicação 84, caracterizado pelo fato de que compreende cultivar as células a um pH maior do que 7,05 e menor do que ou cerca de 7,15, opcionalmente cerca de 7,07 até cerca de 7,13.
88. Método para aumentar o nível de glicanas afucosiladas de uma composição de anticorpo produzidas por células competentes para glicosilação em cerca de 1% até cerca de 2%, caracterizado pelo fato de que compreende aumentar o pH do meio de cultura de células em cerca de 0,05 até cerca de 1,2.
89. Método, de acordo com a reivindicação 88, caracterizado pelo fato de que compreende aumentar o pH em cerca de 0,05 até cerca de 0,07 para uma redução em glicanas afucosiladas de cerca de 1%.
90. Método, de acordo com a reivindicação 88, caracterizado pelo fato de que compreende aumentar o pH em cerca de 0,09 até cerca de 1,2 para uma redução em glicanas afucosiladas maior do que cerca de 1,5%.
91. Método, de acordo com a reivindicação 88, caracterizado pelo fato de que compreende cultivar as células a um pH situado entre cerca de 7,10 até cerca de 7,20, opcionalmente cerca de 7,12 até cerca de 7,19.
92. Método para aumentar o nível de glicanas afucosiladas de uma composição de anticorpo

produzidas por células competentes para glicosilação em cerca de 0,5% até cerca de 1,1%, caracterizado pelo fato de que compreende aumentar o pH do meio de cultura de células em cerca de 0,03-0,07.

93. Método, de acordo com a reivindicação 92, caracterizado pelo fato de que compreende aumentar o pH em cerca de 0,03 até cerca de 0,06 para uma redução em glicanas afucosiladas de cerca de 0,8%.
94. Método, de acordo com a reivindicação 92, caracterizado pelo fato de que compreende aumentar o pH em cerca de 0,05 até cerca de 0,07 para uma redução em glicanas afucosiladas de cerca de 1%.
95. Método, de acordo com a reivindicação 92, caracterizado pelo fato de que compreende cultivar as células a um pH maior do que 7,05 e menor do que ou cerca de 7,15, opcionalmente cerca de 7,07 até cerca de 7,13.
96. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94 e 95, caracterizado pelo fato de que o pH do meio de cultura de células ao longo da cultura é maior do que 7,0, opcionalmente maior do que 7,05 e menor do que 7,2.

97. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95 e 96, caracterizado pelo fato de que o nível de glicanas afucosiladas na composição de anticorpo é menor do que cerca de 10%.
98. Método, de acordo com a reivindicação 97, caracterizado pelo fato de que o nível de glicanas afucosiladas na composição de anticorpo é cerca de 6,2% até cerca de 8,4%.
99. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97 e 98, caracterizado pelo fato de que a temperatura é alterada em menos do que 2 graus C durante o período de cultura.
100. Método, de acordo com a reivindicação 99, caracterizado pelo fato de que a temperatura da cultura é alterada em não mais do que 1,5 ou 1,0 graus C.

101. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 e 100, caracterizado pelo fato de que o meio de cultura de células não compreende quaisquer quantidades detectáveis de manganês ou betaína.
102. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100 e 101, caracterizado pelo fato de que o meio de cultura de células compreende cerca de 0,10 g/L até cerca de 1,0 g/L de fucose, opcionalmente cerca de 0,17 até cerca de 1,0 g/L de fucose.
103. Método, de acordo com a reivindicação 102, caracterizado pelo fato de que fucose está presente no meio de cultura a uma concentração menor do que cerca de 0,75 g/L, menor do que cerca de 0,6 g/L, ou cerca de 0,2 g/L até cerca de 0,5 g/L.

104. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102 e 103, caracterizado pelo fato de que as células competentes para glicosilação não são geneticamente modificadas para alterar a atividade de uma enzima da via *de novo* ou da via de salvamento.

105. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103 e 104, caracterizado pelo fato de que glicose é adicionada ao meio de cultura de células de acordo com uma calendarização de alimentação com glicose que alcança uma concentração média de glicose de cerca de 10 g/L ou menos.

106. Método de modulação do nível de glicanas TAF de uma composição de anticorpo produzidas por células competentes para glicosilação, caracterizado pelo

fato de que compreende modular o nível de glicanas afucosiladas da composição de anticorpo de acordo com um método, conforme definido em qualquer uma das reivindicações 77, 78 e 79, reduzir o nível de glicanas afucosiladas da composição de anticorpo de acordo com um método, conforme definido em qualquer uma das reivindicações 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86 e 87, ou aumentar o nível de glicanas afucosiladas da composição de anticorpo de acordo com um método, conforme definido em qualquer uma das reivindicações 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104 e 105.

107. Método de produção de uma composição de anticorpo, caracterizado pelo fato de que o nível de glicanas afucosiladas na composição de anticorpo é cerca de 6,2% até cerca de 8,4%, o método compreendendo manter células competentes para glicosilação em um meio de cultura de células a um pH maior do que 7,05 e menor do que 7,2,

em que:

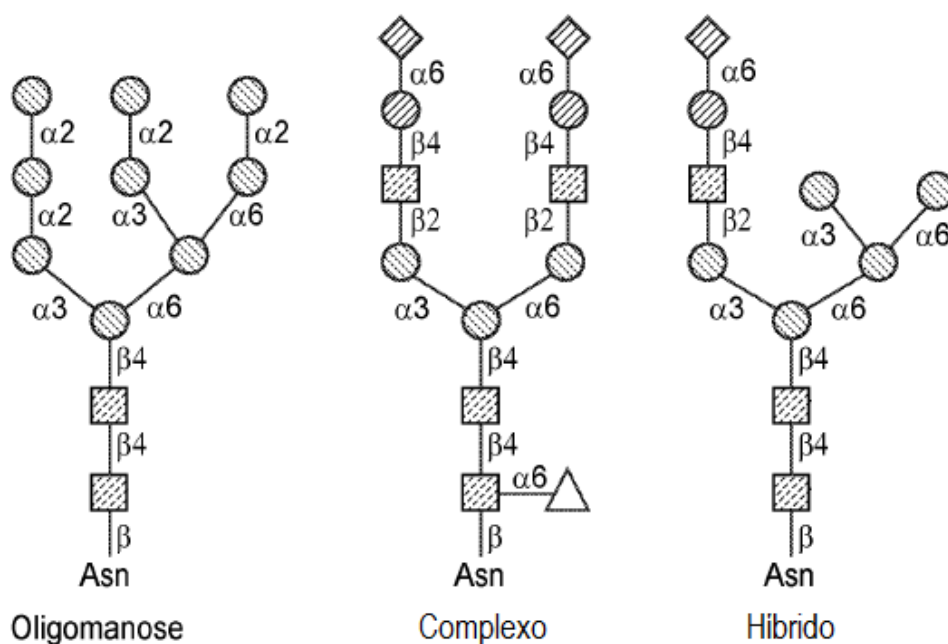
(A) o pH do meio de cultura de células é alterado em menos do que 0,15 (opcionalmente em menos do que 0,10) durante o período de cultura ou

(B) a temperatura do meio de cultura de células é alterada em não mais do que 2 graus C ou

(C) o método não compreende cultivar as células em um meio de cultura de células compreendendo manganês ou betaína ou

(D) uma combinação de dois ou três de (A), (B) e (C).

108. Método, de acordo com a reivindicação 107, caracterizado pelo fato de que o pH é mantido a um pH de cerca de 7,07 até cerca de 7,19 durante o período de cultura, opcionalmente em que o pH é mantido a cerca de 7,07 ou maior e menor do que 7,10, ou cerca de 7,10 ou maior e menor do que 7,15, ou cerca de 7,15 ou maior até cerca de 7,19.



### Representações Simbólicas de Monossacarídeos e Ligações Comuns

|                                  |                                        |
|----------------------------------|----------------------------------------|
| ● Galactose (Gal)                | ☆ Xilose (Xyl)                         |
| ▨ N-Acetilgalactosamina (GalNAc) | ◆ N-Acetilneuraminico (Neu5Ac)         |
| ▨ Galactosamina (GalN)           | ◆ Ácido N-alicililneuraminico (Neu5Gc) |
| ● Glicose (Glc)                  | ◆ Ácido 2-ceto-3-desoxinonônico (Kdn)  |
| ▨ N-Acetilglucosamina (GlcNAc)   | △ Fucose (Fuc)                         |
| ▨ Glucosamina (GlcN)             | ◆ Ácido alucurônico (GlcA)             |
| ● Manose (Man)                   | ◆ Ácido idurônico (IdoA)               |
| ▨ N-Acetilmanosamina (ManNAc)    | ◆ Ácido galacturônico (GalA)           |
| ▨ Manosamina (ManN)              | ◆ Ácido manurônico (ManA)              |

### Outros Monossacarídeos

Usar designação de letra dentro de símbolo para especificar, se necessário



**FIGURA 1A**

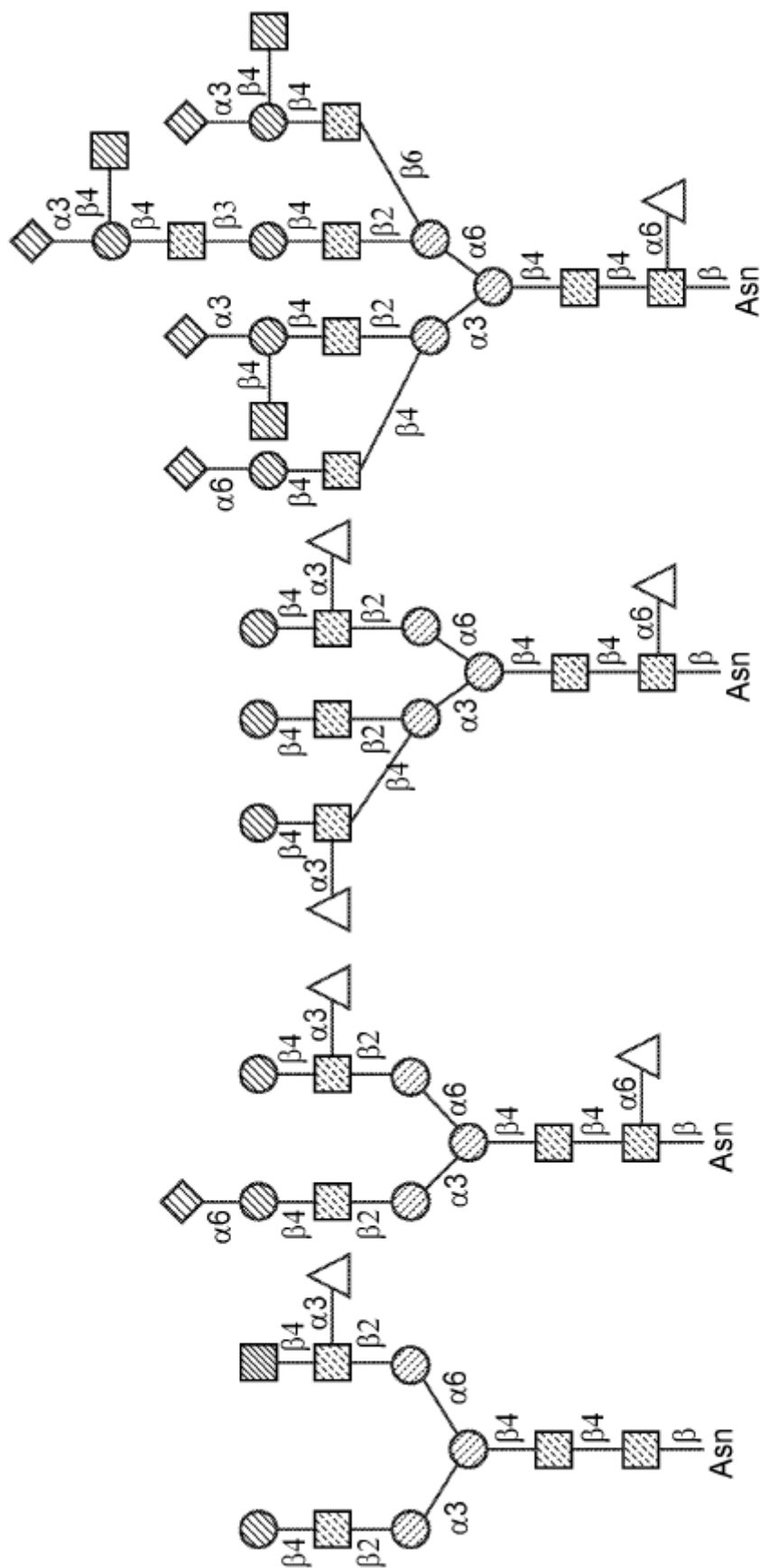
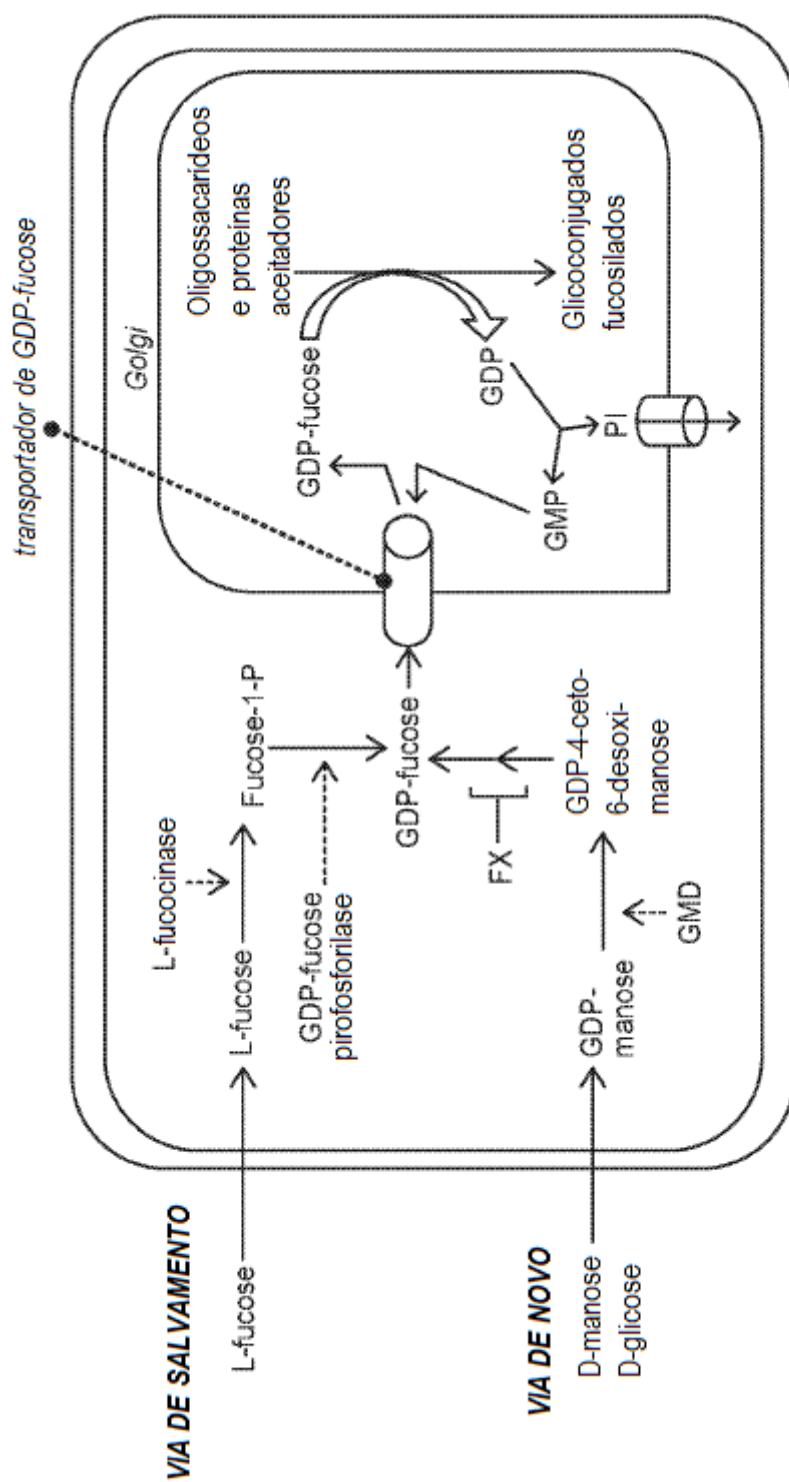


FIGURA 1B

**FIGURA 2**

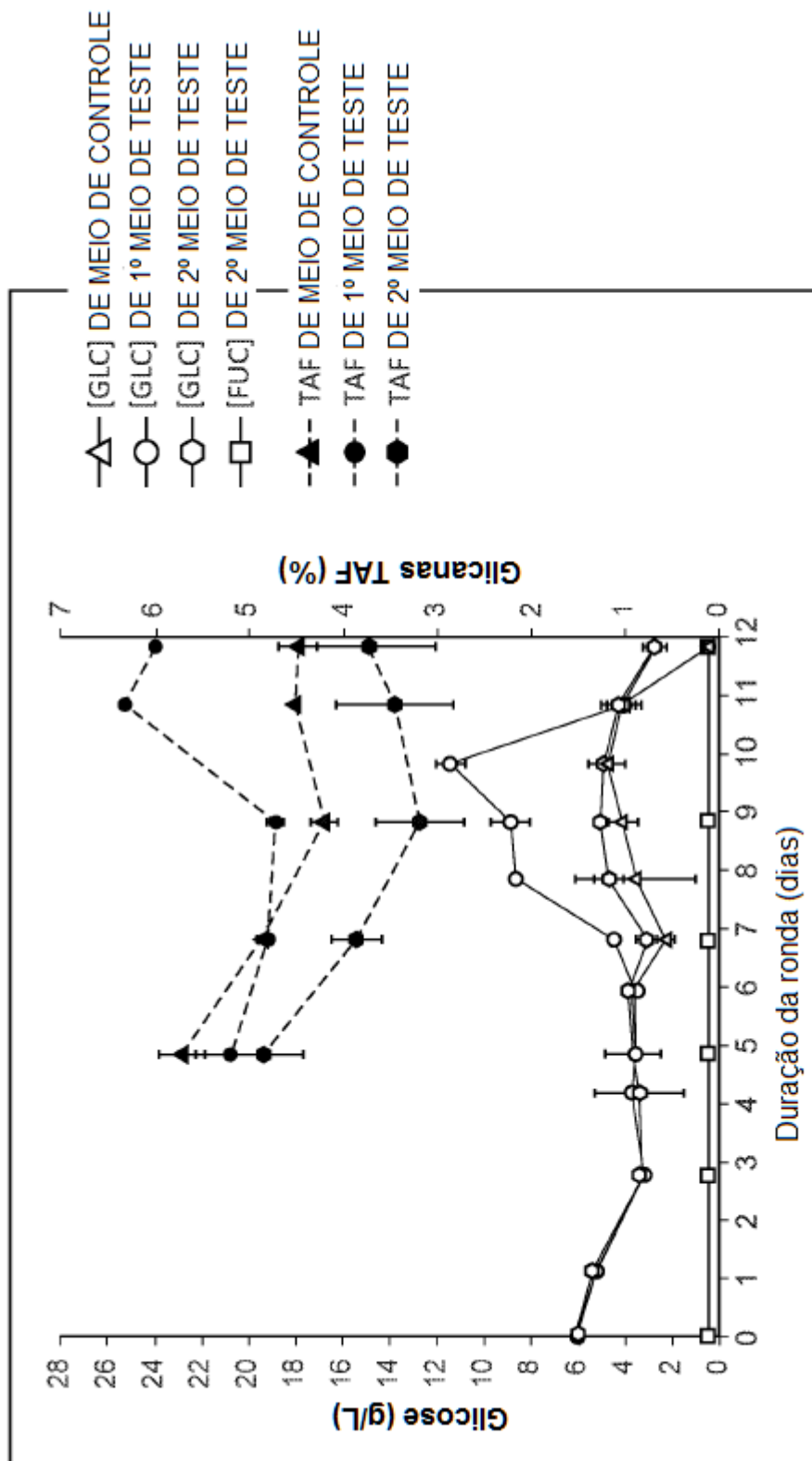


FIGURA 3

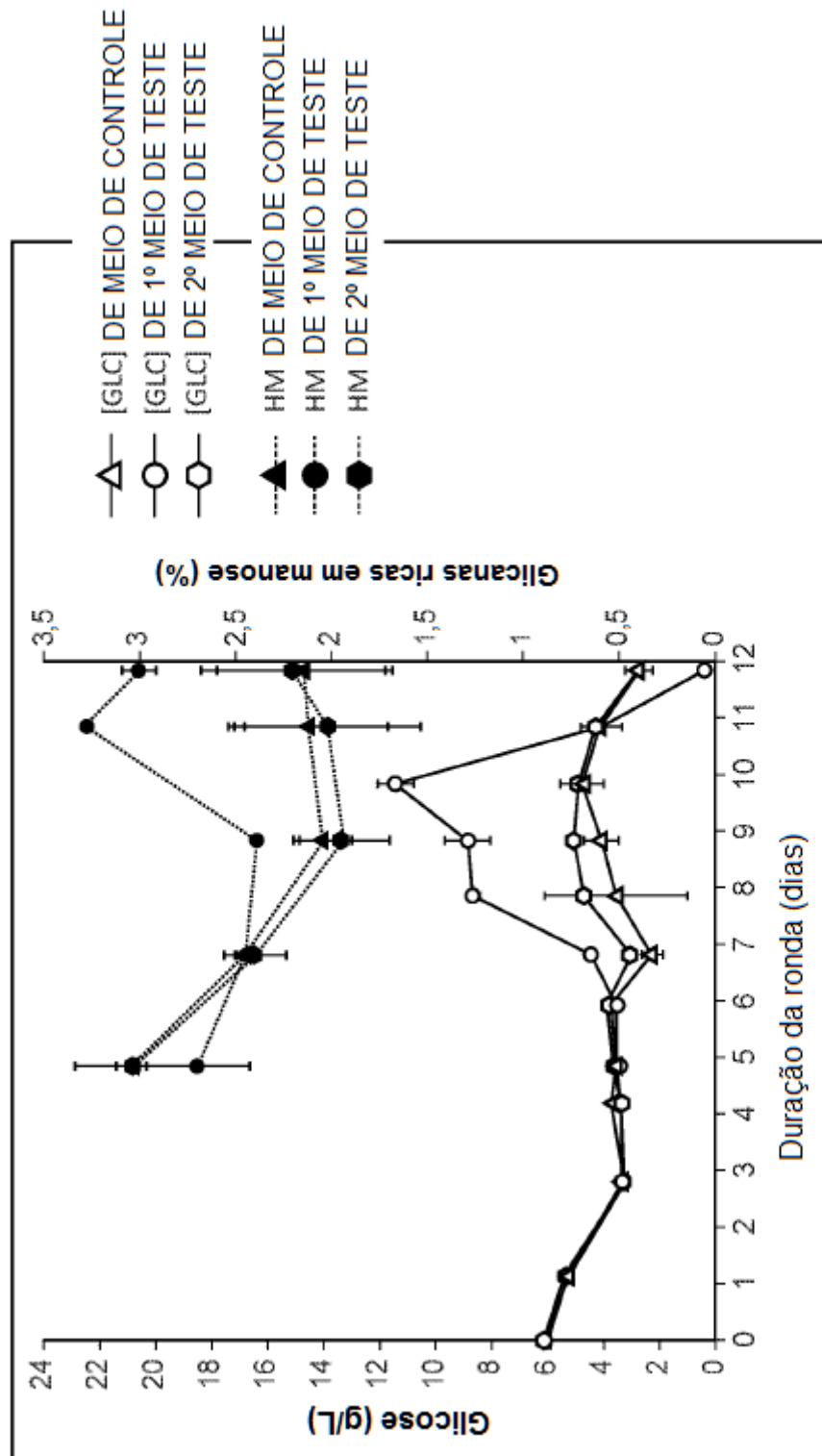


FIGURA 4

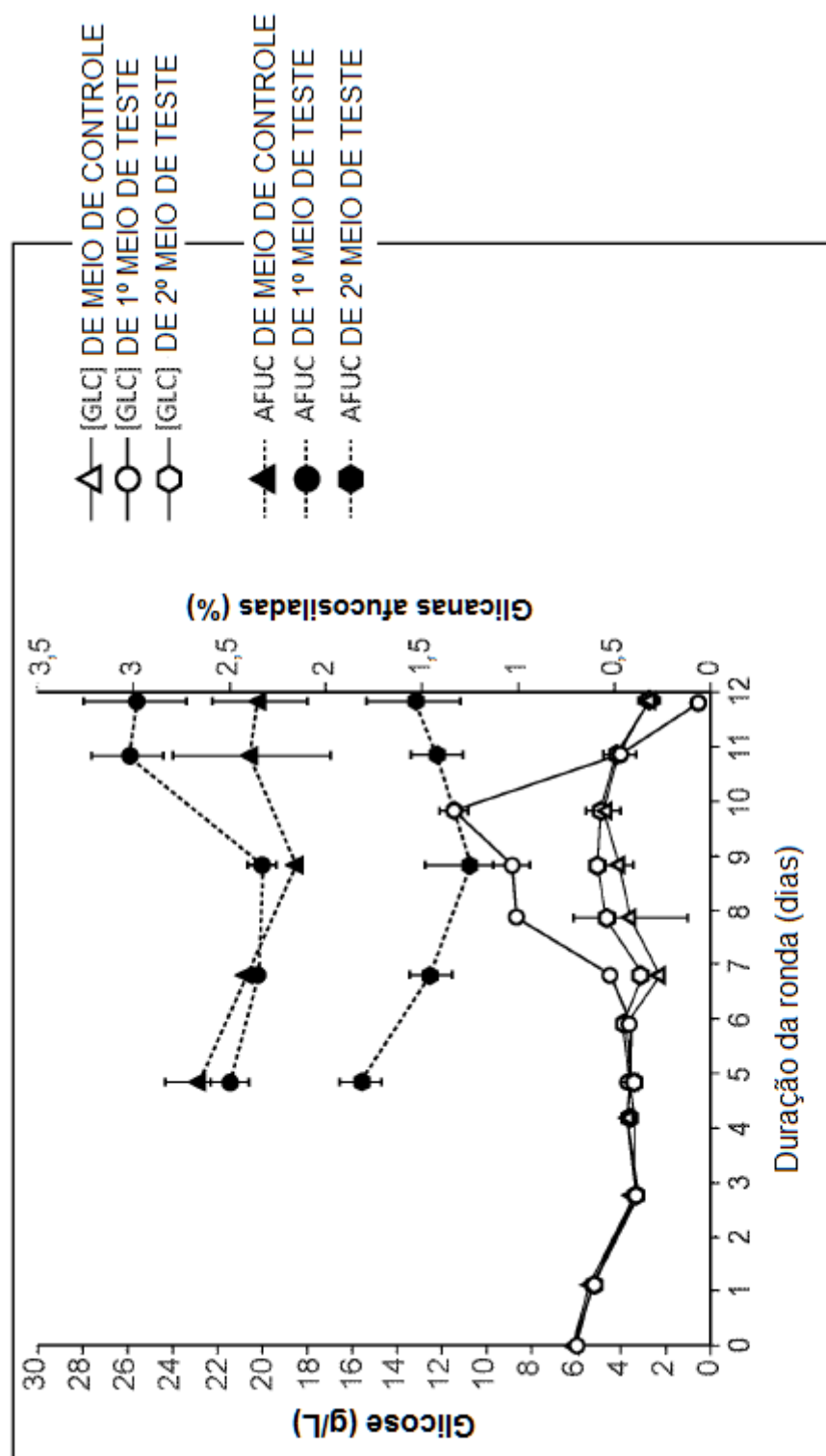


FIGURA 5

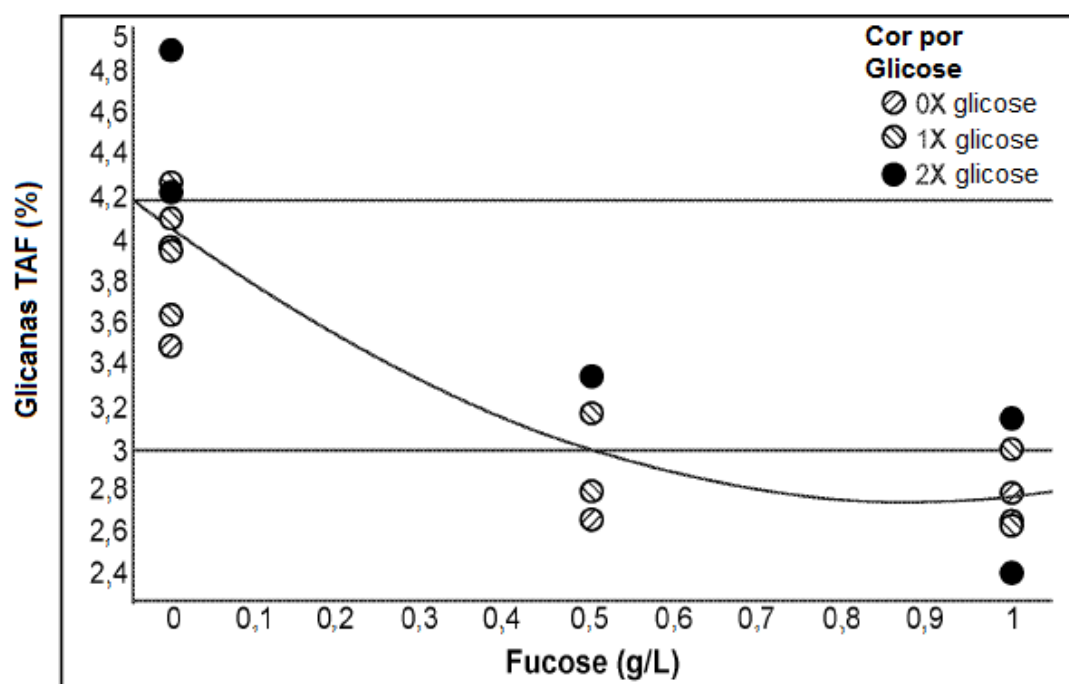


FIGURA 6

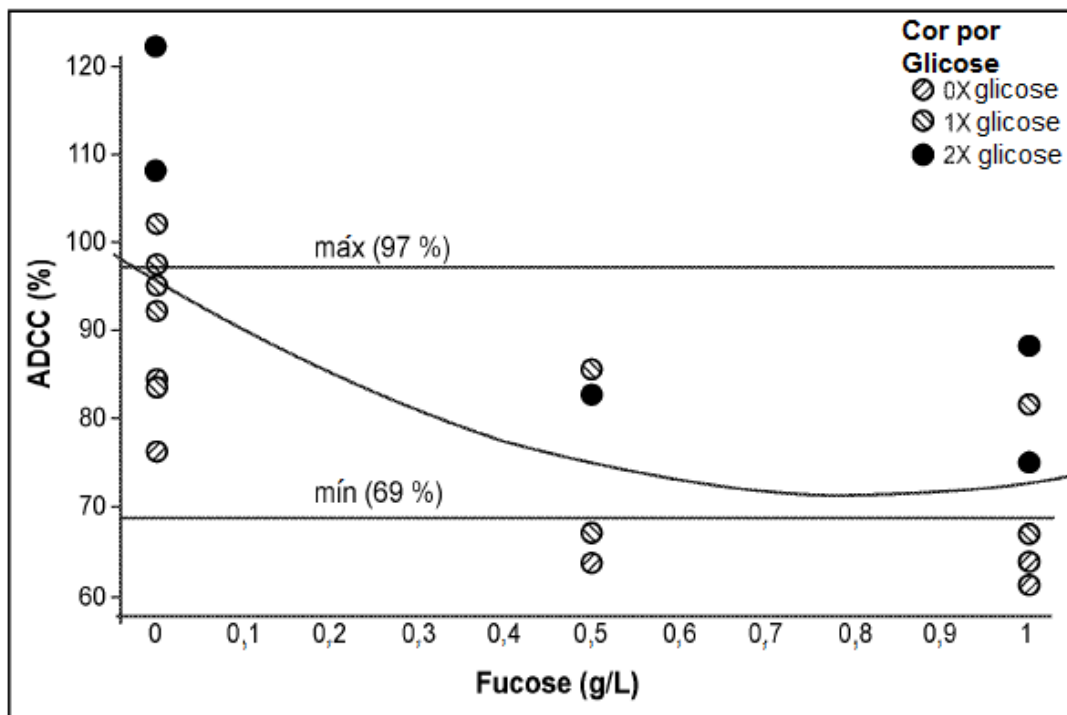
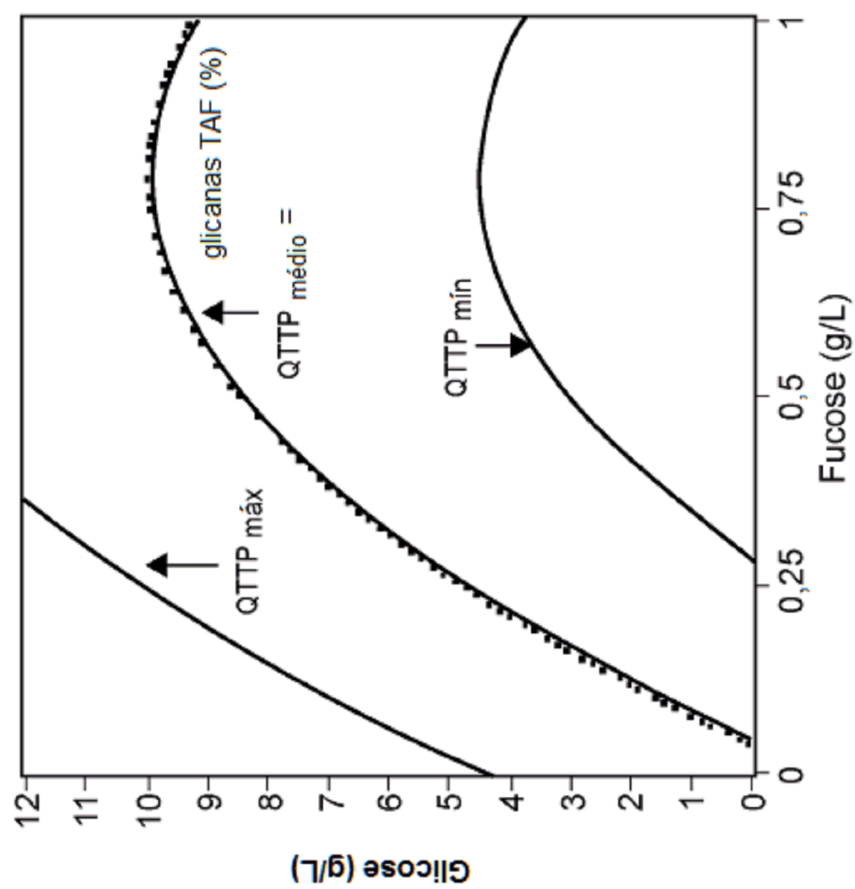


FIGURA 7



$$\text{glicanas TAF (\%)} = 3,354 - 1,388 * \text{fucose} \left(\frac{g}{L}\right) + 0,111 * \text{glucose} \left(\frac{g}{L}\right) + [\text{fucose} \left(\frac{g}{L}\right) - 0,4375] * [[\text{fucose} \left(\frac{g}{L}\right) - 0,4375] * 1,9527]$$

**FIGURA 8**

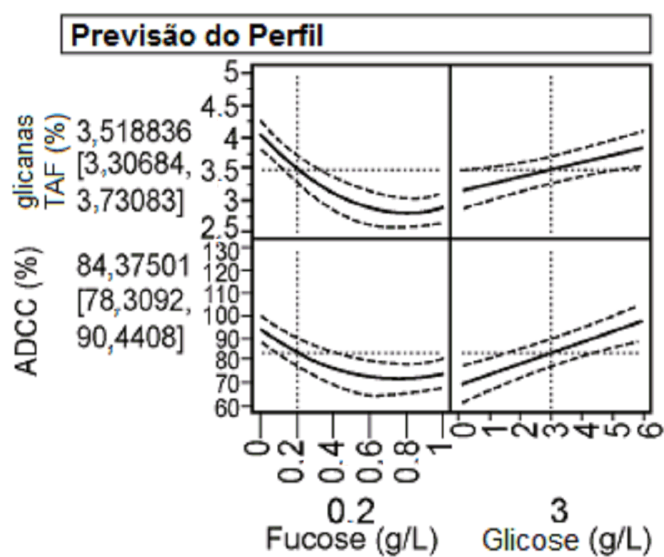


FIGURA 9A

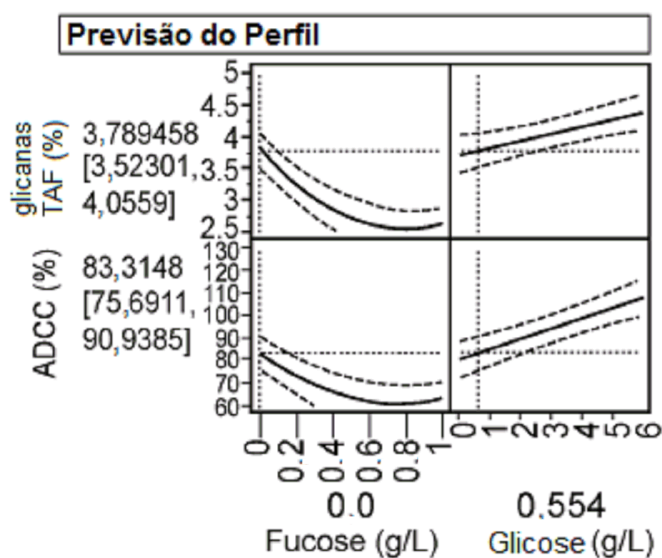


FIGURA 9B

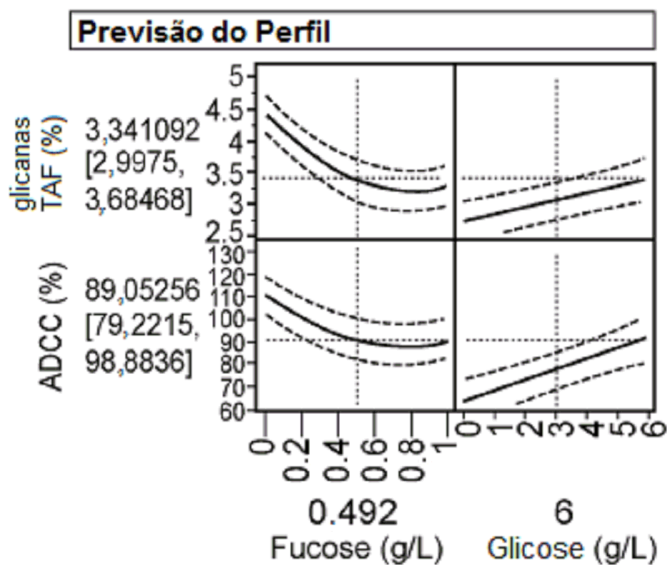
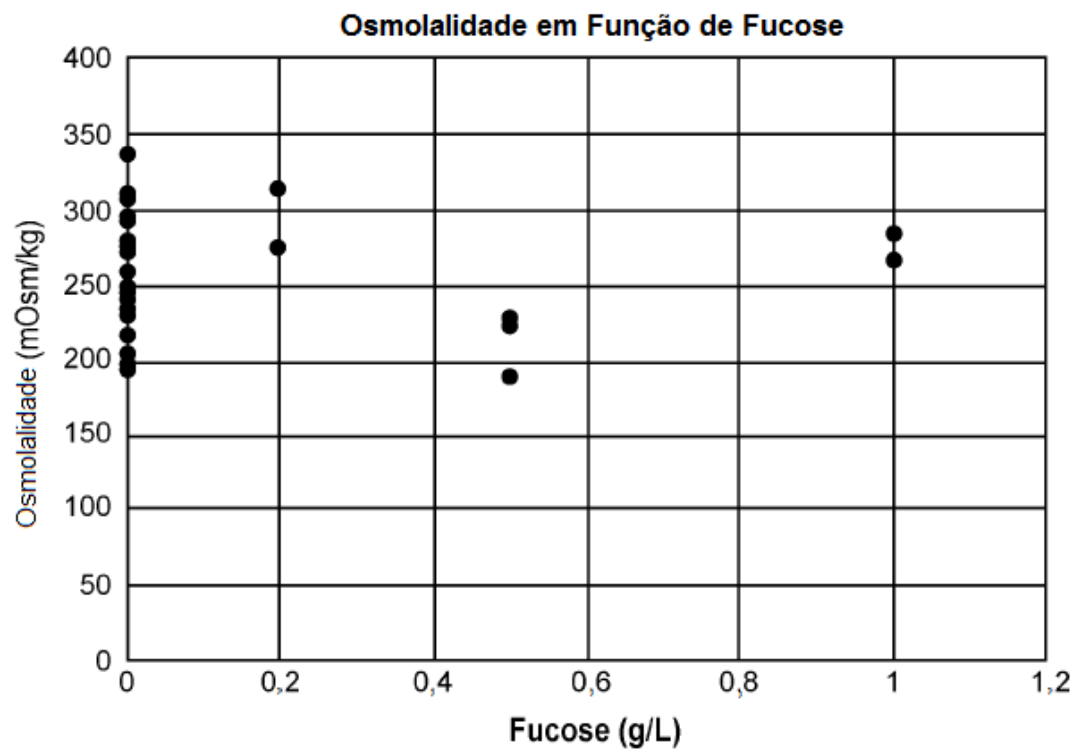


FIGURA 9C

**FIGURA 10**

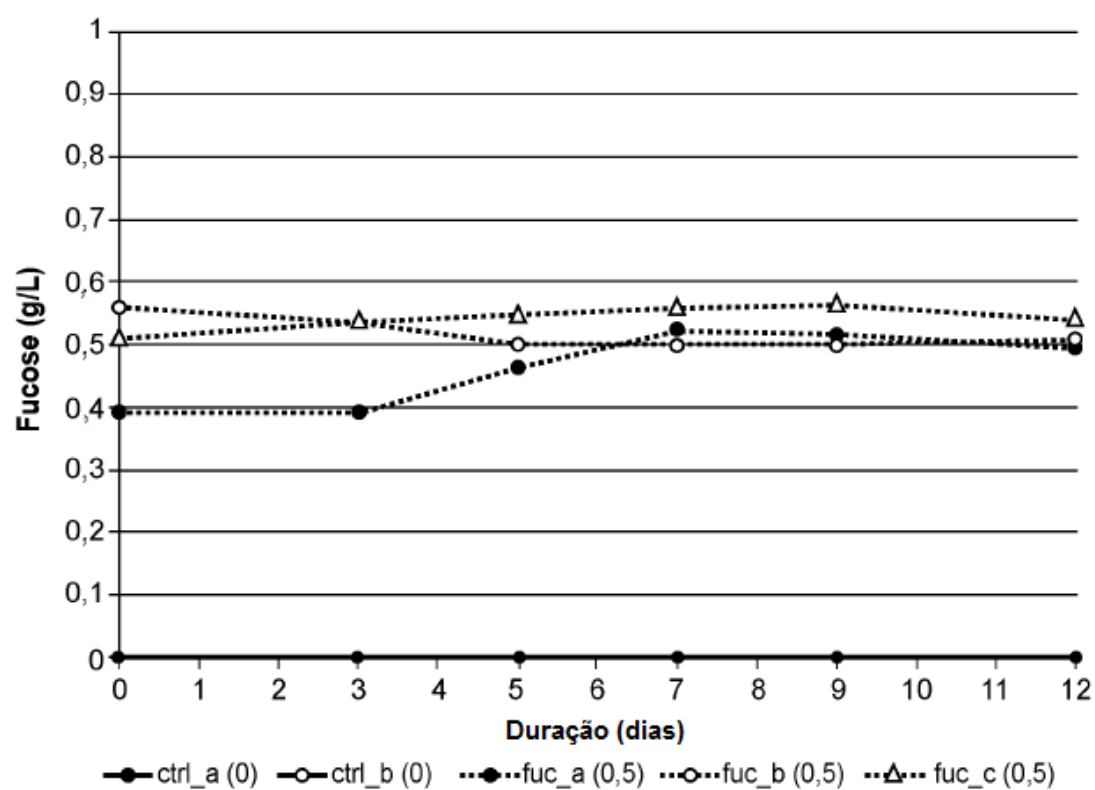
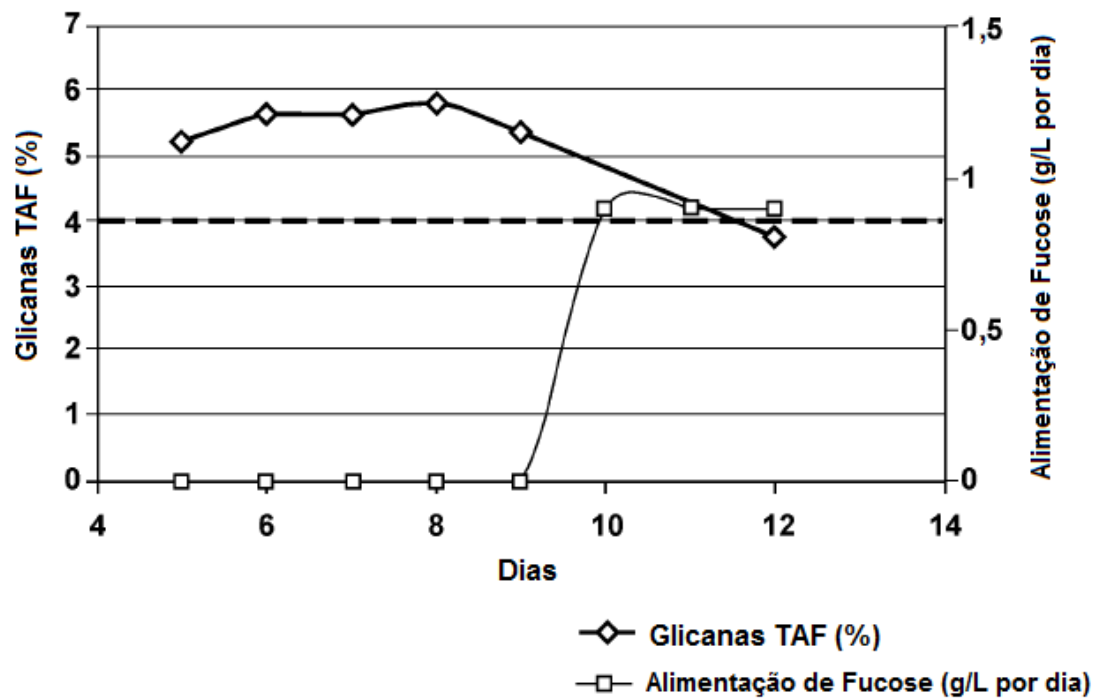


FIGURA 11

**FIGURA 12**

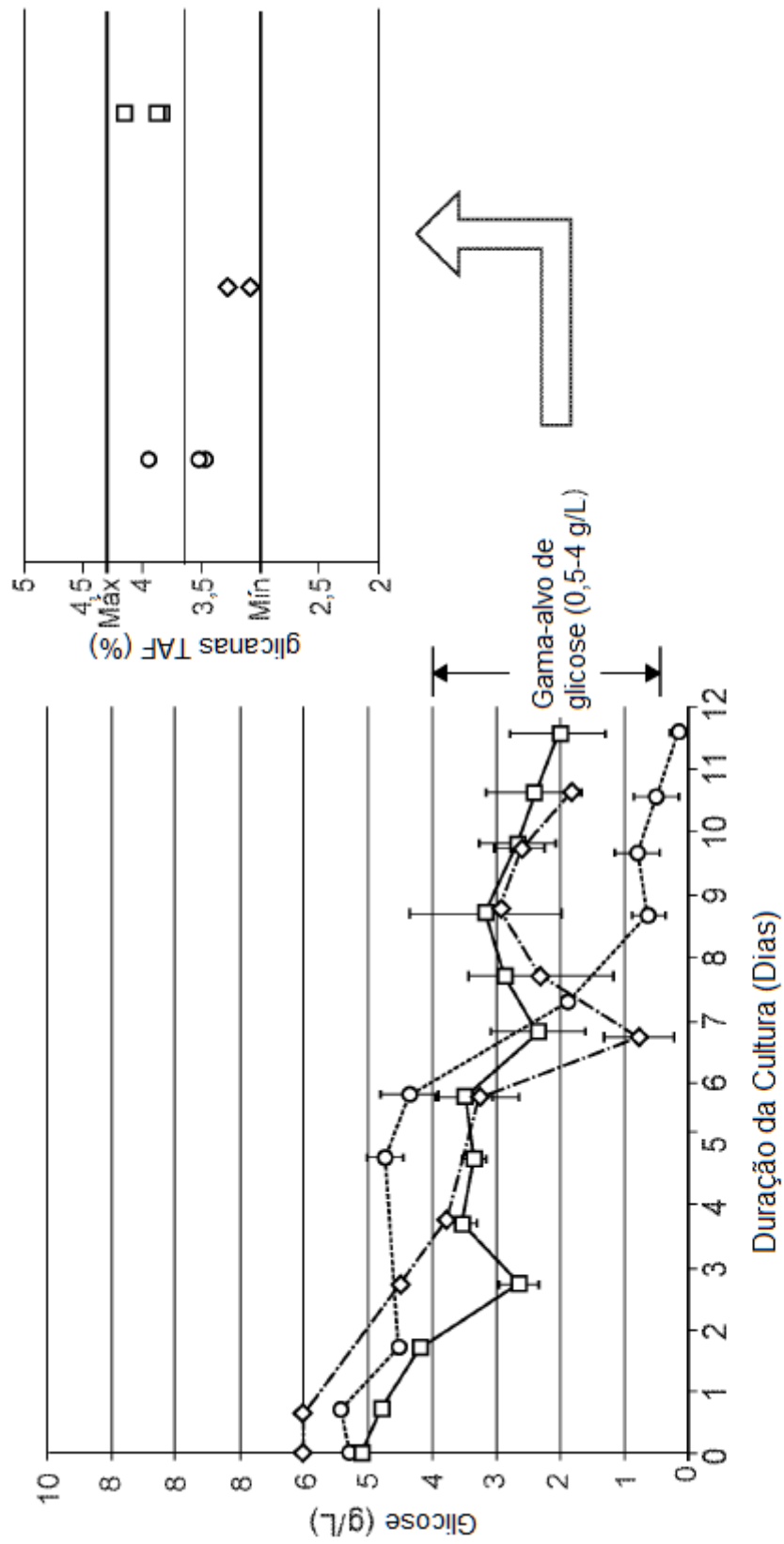


FIGURA 13

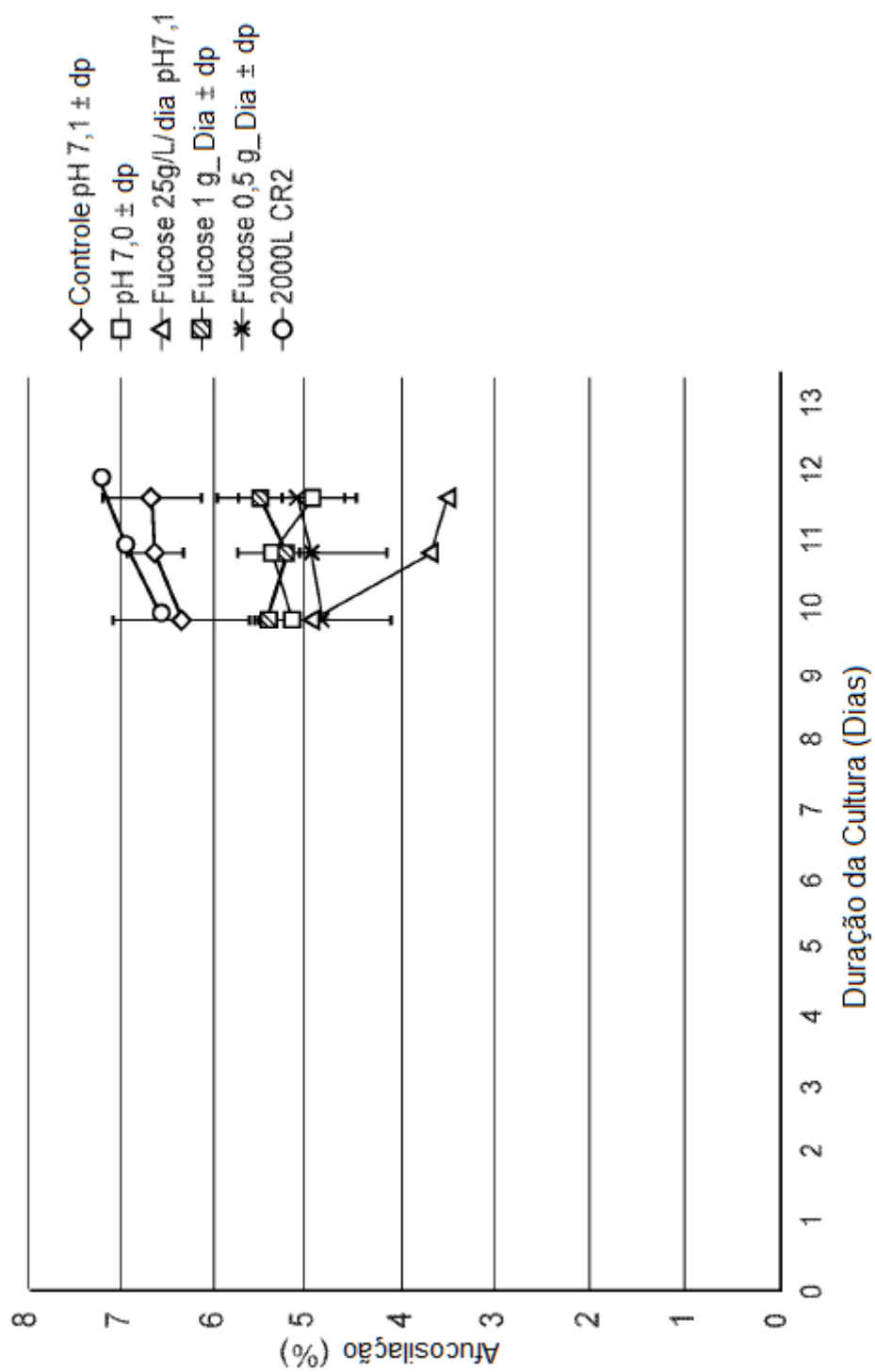


**FIGURA 14**

**RESUMO "GLICOFORMAS AFUCOSILADAS TOTAIS DE ANTICORPOS  
PRODUZIDOS EM CULTURA DE CÉLULAS"**

São proporcionados aqui métodos de produção de uma composição de anticorpo compreendendo um nível desejado ou predeterminado ou pré-selecionado de glicoformas afucosiladas totais (TAF). Em modalidades exemplificativas, o método compreende manter células competentes para glicosilação em um meio de cultura de células compreendendo fucose e/ou glicose a uma concentração específica como descrito aqui, dependendo do nível de glicoformas TAF desejado. Composições relacionadas compreendendo proteínas glicosiladas e suas glicoformas TAF também são proporcionadas aqui. Também são proporcionados meios de cultura de células.

Este anexo apresenta o código de controle da listagem de sequências biológicas.

### **Código de Controle**

Campo 1



Campo 2



### **Outras Informações:**

- Nome do Arquivo: 202001090 LISTAGEM.txt
- Data de Geração do Código: 25/09/2020
- Hora de Geração do Código: 15:19:18
- Código de Controle:
  - Campo 1: DC6EB8E639418146
  - Campo 2: EA01D0E1B92E2C93