

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

(21) **PI0620178-4 A2**



(22) Data de Depósito: 19/12/2006
(43) Data da Publicação: 29/06/2010
(RPI 2060)

(51) *Int.Cl.:*
C07K 14/705
C07K 1/16
A61K 38/17

(54) Título: **COMPOSIÇÃO E MÉTODOS PARA PRODUÇÃO DE UMA COMPOSIÇÃO**

(30) Prioridade Unionista: 20/12/2005 US 60/752,150, 20/12/2005 US 60/752,267, 05/10/2006 US 60/849,543, 05/10/2006 US 60/849,543, 05/10/2006 US 60/849,543, 20/12/2005 US 60/752,150, 20/12/2005 US 60/752,267

(73) Titular(es): Bristol-Myers Squibb Company

(72) Inventor(es): Ajoy Velayudhan, Alan R, Flesher, David E. Smolin, David H. Kirkley, David M. Didio, Dean Brownell, Elizabeth A. Bramhall, Eugene J. Schaefer, Helen G. Haggerty, Jeffrey Schrimsher, John M. Tabor, Joyce Whitehead, Kirk J. Leister, Lee K. Tay, Pallaiah Thammanna, Reb J. Russell, Robert Donaldson, Ronald Bates, Thomas Vanden Boom

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

(86) Pedido Internacional: PCT US2006049074 de 19/12/2006

(87) Publicação Internacional: WO 2007/076032 de 05/07/2007

(57) Resumo: A presente invenção proporciona células de mamífero capazes de produzir CTLA4-Ig recombinante e variantes da mesma. A invenção também proporciona composições compreendendo CTLA4-Ig e formulações da mesma. A invenção ainda proporciona métodos para produção em massa de CTLA4-Ig a partir de células de mamífero capazes de produzir essa proteína recombinante e purificação da CTLA4-Ig.

```

587 CCT GAG GTC ACA TGC CTG GTG GTG GAC GTG AGC CAC GAA
    P E V T C V V V D V S H R
626 GAC CCT GAG GTC AAG TTC AAC TGG TAC GTG GAC GGC GTG
    D F E V K F N W Y V D G V
665 GAG GTG CAT AAT GCC AAG ACA AAG CCG GAG GAG CAG
    E V H N A K T K P R E E Q
704 TAC AAC AGC ACG TAC CGT GTG GTC AGC GTC CTC ACC GTC
    Y N S T Y R V V S V L T V
743 CTG CAC CAG GAC TGG CTG AAT GGC AAG GAG TAC AAG TCC
    L H Q D N L N G K E Y K C
782 AAG GTC TCC AAC AAA GGC CTC CCA GGC CCC ATC GAG AAA
    K V S N K A L P R P I E K
821 ACC ATC TCC AAA GCC AAA GGG CAG CCC CGA GAA CCA CAG
    T I S K A K G Q P R E P Q
    ↳ Domínio C2 do IgG humano →
860 GTG TAC ACC CTG CCC CCA TCC CGG GAT GAG CTG ACC AAG
    V Y T L P P S R D B L T K
889 AAC CAG GTC AGC CTG ACC TGC CTG CTC AAA GGC GTC TAT
    N Q V S L T C L V X G F Y
938 CCC AGC GAC ATC CCC CTG GAG TGG GAG AGC AAT GGG CAG
    P S D I A V E W E S N G Q
977 CCG GAG AAC AAC TAC AAG ACC AGC CCT CCC GFG CTG GAC
    F E N N Y K T T F P V L D
1016 TCC GAC GGC TCC TTC TTC CTC TAC AGC AAG CTC ACC GTG
    S D G S F F L Y S K L T V
1055 GAC AAG AGC AGG TGG CAG CAG GGG AAC GTC TTC TCA TCC
    D K S R W Q Q G N V F S C
1094 TCC CTG ATG CAG GAG GCT CTG CAC AAC CAC TAC ACG CAG
    S V M H S A L H N H Y T Q
1133 AAG AGC CTC TCC CTG TCT CCG GGT AAA TGA GTCCGAGC
    K S L S L S F G K -
1172 GCCGGCAAGC CCCGCTCCCC GGGCTCTCGG GGTGGAC GAGGATGCTT
1222 CTAGA
  
```

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "**COMPOSIÇÕES E MÉTODOS PARA PRODUÇÃO DE UMA COMPOSIÇÃO**".

O presente pedido de patente reivindica prioridade do No. de Série U.S. 60/752.267, depositado em 20 de Dezembro de 2005, No. de Série U.S. 60/849.543, depositado em 5 de Outubro de 2006 e No. de Série U.S. 60/752.150, depositado em 20 de Dezembro de 2005, todos os quais são aqui incorporados por referência em suas totalidades. O presente pedido também incorpora, por referência e em sua totalidade, o pedido de patente intitulado "Stable Protein Formulations" com o Número de Documento do Procurador 10739 PCT depositado em 19 de Dezembro de 2006.

Todas as patentes, pedidos de patente e publicações mencionados aqui, são aqui incorporados por referência em sua totalidade.

A presente divulgação contém material que está sujeito à proteção de copyright. O proprietário de copyright não tem objeção à reprodução por fac-símile por qualquer um do documento de patente ou divulgação de patente uma vez que ele aparece no arquivo ou registro de patentes do U.S. Patent and Trademark Office mas, de outro modo, se reserva a qualquer e todos os direitos de copyright.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

Antígeno 4 de linfócito T citotóxico (CTLA4), um membro da superfamília de imunoglobulina, é uma molécula expressa por células T ativadas. O CTLA4 é similar à molécula co-estimulatória de células T CD28 e ambas as moléculas se ligam B7-1 (CD80) e B7-2 (CD86) sobre células que apresentam antígeno (APCs). Contudo, o CTLA4 transmite um sinal inibitório à células T, enquanto que CD28 transmite um sinal estimulatório.

Moléculas de CTLA4-Ig são proteínas de fusão do domínio de ligação a ligante do antígeno 4 de linfócito T citotóxico (CTLA4) e uma região constante de cadeia pesada de imunoglobulina (Ig). Essa molécula solúvel exerce seus efeitos fisiológicos através de ligação a antígenos B7 (CD80 e CD86) sobre a superfície de várias células apresentando antígeno (APC), assim, bloqueando a interação funcional de B7-1 e B7-2 com CD28 sobre a superfície de células T. Esse bloqueio resulta na supressão de ativação e,

conseqüentemente, na supressão da resposta imune. Moléculas de CTLA4-Ig podem, portanto, proporcionar um método para inibição de rejeições a transplante de órgão sólido e/ou tecidual, bem como um uso terapêutico para doenças ou distúrbios que se relacionam à respostas imunes desreguladas em geral, incluindo auto-imunidade. Por exemplo, moléculas de CTLA4-Ig podem suprimir a produção de anticorpos anti-dsDNA e diminuir a nefrite em camundongos propensos a lupus; pode reduzir a proteinúria e prolongar a sobrevivência em camundongos com nefrite avançada e podem melhorar os resultados clínicos para psoríase e artrite reumatóide. Para melhorar a utilidade terapêutica de moléculas de CTLA4-Ig, é importante determinar alterações moleculares que podem ser feitas para intensificar a eficácia das moléculas como um inibidor de estimulação de células T, por exemplo, através de aumento da avidéz e potência da molécula por antígenos B7. Um aumento na avidéz e potência de moléculas de CTLA4-Ig pode permitir a administração de uma quantidade diminuída de moléculas de CTLA4-Ig a um paciente para obter um efeito terapêutico desejado (isto é, administração de uma menor dose). Um aumento na avidéz e potência de moléculas de CTLA4-Ig também pode diminuir o número de doses ou a freqüência de doses que são administradas a um paciente para obter um efeito terapêutico desejado.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

A presente invenção se refere à composições e métodos para a produção de composições de CTLA4-Ig. A invenção é dirigida à moléculas de CTLA4-Ig, composições aperfeiçoadas compreendendo moléculas de CTLA4-Ig e métodos aperfeiçoados para a produção (incluindo produção em massa) de moléculas de CTLA4-Ig e outras proteínas recombinantes.

A invenção inclui quaisquer permutações e/ou combinações de qualquer um dos elementos e características descritos aqui, quer descritos unicamente ou em determinadas combinações ou permutações.

Células: A invenção proporciona um população de células de Ovário de Hâmster Chinês capaz de produzir CTLA4-Ig. A invenção proporciona uma população de células de Ovário de Hâmster Chinês capaz de

produzir CTLA4-Ig, cada célula compreendendo 30 ou mais cópias de um cassete de expressão de CTLA4-Ig. A invenção também proporciona uma população de células de Ovário de Hâms-ter Chinês capaz de produzir CTLA4-Ig, cada célula compreendendo 30 ou mais cópias de um cassete de expressão de CTLA4-Ig, em que as 30 ou mais cópias são integradas em um único sítio no genoma de cada célula. A invenção proporciona uma população de células de Ovário de Hâms-ter Chinês clonais capaz de produzir CTLA4-Ig, em que um cassete de expressão de CTLA4-Ig é estável durante cerca de 105 passagens. Em uma modalidade, a CTLA4-Ig é codificada por um cassete de expressão compreendendo uma seqüência de ácido nucleico descrita por Koduri R., e colaboradores (Gene, 2001, 280: 87-95) e Patentes U.S. Nos. 6.800.457 e 6.521.419, os quais são aqui incorporados por referência em suas totalidades. Em outra modalidade, a CTLA4-Ig é codificada por um cassete de expressão integrado em um genoma celular da população de células em um *locus* específico descrito por Koduri R., e colaboradores (Gene, 2001, 280: 87-95) nas Patentes U.S. Nos. 6.800.457 e 6.521.419, os quais são aqui incorporados por referência em suas totalidades. Em uma modalidade, a população compreende uma sub-população de células compreendendo 33 ou mais cópias do cassete de expressão de CTLA4-Ig, em que as peptídeo de objetivação ou mais cópias são integradas em um único sítio no genoma de cada célula da sub-população.

A invenção proporciona uma população de células de Ovário de Hâms-ter Chinês clonal capaz de produzir CTLA4-Ig em que pelo menos 75% da população de células tem 30 ou mais cópias de um cassete de expressão de CTLA4-Ig, em que as 30 ou mais cópias são integradas em um único sítio no genoma de cada célula dos 75% da população. A invenção proporciona uma população de células de Ovário de Hâms-ter Chinês clonal capaz de produzir CTLA4-Ig em que pelo menos 85% da população de células tem 30 ou mais cópias de um cassete de expressão de CTLA4-Ig, em que as 30 ou mais cópias são integradas em um único sítio no genoma de cada célula dos 85% da população. A invenção proporciona uma população de células de Ovário de Hâms-ter Chinês clonal capaz de produzir CTLA4-Ig em que pelo

menos 95% da população de células tem 30 ou mais cópias de um cassete de expressão de CTLA4-Ig, em que as 30 ou mais cópias são integradas em um único sítio no genoma de cada célula dos 95% da população. Em uma modalidade, a população de célula é capaz de produzir mais de 0,5 ou mais gramas de proteína CTLA4-Ig por litro de cultura líquida e em que a CTLA4-Ig 5 exibe características de carboidrato aceitáveis, onde a proporção molar de ácido siálico para CTLA4-Ig é de cerca de 6 a cerca de 14 em uma escala de cultura de 1.000 L ou mais. Em outra modalidade, a população de células foi adaptada a um meio isento de soro quimicamente definido. Em outra modalidade, CTLA4-Ig produzida a partir da cultura da população de células tem 10 uma coeficiente de extinção de $1,00 \pm 0,05 \text{ AU mL cm}^{-1} \text{ mg}^{-1}$. Em outra modalidade, a população de célula, quando crescida em cultura, é capaz de produzir polipeptídeos de CTLA4-Ig, em que: (a) cerca de 90% dos polipeptídeos de CTLA4-Ig compreendem uma seqüência de aminoácido de SEQ ID 15 NO: 2 começando com a metionina no resíduo 27; (b) cerca de 10% dos polipeptídeos de CTLA4-Ig compreendem a seqüência de aminoácido de SEQ ID NO: 2 começando com a alanina no resíduo número 26; (c) cerca de 4% dos polipeptídeos de CTLA4-Ig compreendem a seqüência de aminoácido de SEQ ID NO: 2 terminando com a lisina no resíduo número 383, (d) cerca 20 de 96% dos polipeptídeos de CTLA4-Ig compreendem a seqüência de aminoácido de SEQ ID NO: 2 terminando com a glicina no resíduo número 382; e, opcionalmente, (e) cerca de menos de 1% dos polipeptídeos de CTLA4-Ig compreende a seqüência de aminoácido de SEQ ID NO: 2 começando com a metionina no resíduo número 25.

25 A invenção proporciona uma célula de prole da célula clonal, em que a célula de prole produz CTLA4-Ig. Em uma modalidade, a célula de prole é obtida a partir de cultura da célula precursora clonal durante pelo menos 5 gerações. Em outra modalidade, a célula de prole é obtida a partir de cultura de uma célula durante pelo menos 10 gerações, durante pelo menos 20 gerações, durante pelo menos 40 gerações, durante pelo menos 50 30 gerações, durante pelo menos 75 gerações ou durante pelo menos 100 gerações. A invenção proporciona uma linhagem de célula produzida a partir

da célula clonal. Em uma modalidade, a linhagem de célula é clonal. A invenção proporciona uma linhagem de célula capaz de produzir: (a) uma proteína de fusão de CTLA4-Ig tendo uma seqüência de aminoácido de SEQ ID NO: 10 (metionina na posição de aminoácido 27 e glicina na posição de aminoácido 382; Figuras 1A e 1B); (b) uma proteína de fusão de CTLA4-Ig tendo uma seqüência de aminoácido de SEQ ID NO: 7 (metionina na posição de aminoácido 27 e lisina na posição de aminoácido 383; Figuras 1A e 1B); (c) uma proteína de fusão de CTLA4-Ig tendo uma seqüência de aminoácido de SEQ ID NO: 9 (alanina na posição de aminoácido 26 e glicina na posição de aminoácido 382; Figuras 1A e 1B); (d) uma proteína de fusão de CTLA4-Ig tendo uma seqüência de aminoácido de SEQ ID NO: 6 (alanina na posição de aminoácido 26 e lisina na posição de aminoácido 383; Figuras 1A e 1B); (e) uma proteína de fusão de CTLA4-Ig tendo uma seqüência de aminoácido de SEQ ID NO: 8 (metionina na posição de aminoácido 25 e glicina na posição de aminoácido 382; Figuras 1A e 1B); ou (f) uma proteína de fusão de CTLA4-Ig tendo uma seqüência de aminoácido de SEQ ID NO: 5 (metionina na posição de aminoácido 25 e lisina na posição de aminoácido 383; Figuras 1A e 1B). Em outra modalidade, a linhagem de célula é capaz de produzir proteínas de fusão de CTLA4-Ig, em que: (a) cerca de 90% dos polipeptídeos de CTLA4-Ig compreendem uma seqüência de aminoácido de SEQ ID NO: 2 começando com a metionina no resíduo 27; (b) cerca de 10% dos polipeptídeos de CTLA4-Ig compreendem a seqüência de aminoácido de SEQ ID NO: 2 começando com a alanina no resíduo número 26; (c) cerca de 4% dos polipeptídeos de CTLA4-Ig compreendem a seqüência de aminoácido de SEQ ID NO: 2 terminando com a lisina no resíduo número 383, (d) cerca de 96% dos polipeptídeos de CTLA4-Ig compreendem a seqüência de aminoácido de SEQ ID NO: 2 terminando com a glicina no resíduo número 382; e opcionalmente (e) cerca de menos de 1% dos polipeptídeos de CTLA4-Ig compreende a seqüência de aminoácido de SEQ ID NO: 2 começando com a metionina no resíduo número 25.

Em uma modalidade, as proteínas de fusão de CTLA4-Ig, as quais são produzidas a partir de cultura a linhagem de célula, têm um coefi-

ciente de extinção de $1,00 \pm 0,05$ AU mL cm⁻¹ mg⁻¹. A invenção proporciona uma população de célula derivada da linhagem de célula clonal. Em uma modalidade, a população de célula consiste de pelo menos uma alteração genética adicional quando comparado com a linhagem de célula clonal original e em que a população de célula derivada é capaz de produzir CTLA4-Ig. Em outra modalidade, a população de célula consiste de pelo menos 2, pelo menos 3, pelo menos 4, pelo menos 5, pelo menos 6, pelo menos 7, pelo menos 8, pelo menos 10, pelo menos 15 ou pelo menos 20 alterações genéticas adicionais quando comparado com a célula precursora e em que a população de célula derivada é capaz de produzir CTLA4-Ig. Em uma modalidade, a alteração genética compreende pelo menos uma mutação não conservativa no genoma celular ou no cassete de expressão recombinante que codifica CTLA4-Ig. Em outra modalidade, a alteração genética compreende pelo menos um ácido nucleico recombinante adicional dentro da célula. Em uma outra modalidade, a alteração compreende uma mutação do genoma celular. Em outra modalidade, a alteração compreende a adição de um ácido nucleico ao genoma celular ou como um ácido transnucleico, o qual codifica um polipeptídeo anti-apoptótico. Em outra modalidade, o polipeptídeo anti-apoptótico se refere à glicosilação. Em outra modalidade, a alteração genética compreende pelo menos uma mutação do genoma celular ou do cassete de expressão recombinante que codifica CTLA4-Ig.

Composições: A invenção proporciona uma população de moléculas de CTLA4-Ig tendo uma proporção molar média de grupos ácido siálico para dímero ou molécula de CTLA4-Ig de cerca de 6 a cerca de 18, A invenção proporciona uma população de moléculas de CTLA4-Ig tendo uma proporção molar média de grupos ácido siálico para dímero ou molécula de CTLA4-Ig de cerca de 8 a cerca de 18, A invenção proporciona uma população de moléculas de CTLA4-Ig tendo uma proporção molar média de grupos ácido siálico para dímero ou molécula de CTLA4-Ig de cerca de 11 a cerca de 18, A invenção proporciona uma população de moléculas de CTLA4-Ig tendo uma proporção molar média de grupos ácido siálico para dímero ou molécula de CTLA4-Ig de cerca de 12 a cerca de 18, A invenção proporciona

uma população de moléculas de CTLA4-Ig tendo uma proporção molar média de grupos ácido siálico para dímero ou molécula de CTLA4-Ig de cerca de 13 a cerca de 18, A invenção proporciona uma população de moléculas de CTLA4-Ig tendo uma proporção molar média de grupos ácido siálico para dímero ou molécula de CTLA4-Ig de cerca de 14 a cerca de 18, A invenção proporciona uma população de moléculas de CTLA4-Ig tendo uma proporção molar média de grupos ácido siálico para dímero ou molécula de CTLA4-Ig de cerca de 15 a cerca de 17. A invenção proporciona uma população de moléculas de CTLA4-Ig tendo uma proporção molar média de grupos ácido siálico para dímero ou molécula de CTLA4-Ig de cerca de 16. A invenção proporciona uma população de moléculas de CTLA4-Ig, em que mais de 95% das moléculas são dímeros de CTLA4-Ig. Em uma modalidade, mais de 98% das moléculas são dímeros de CTLA4-Ig. Em outra modalidade, mais de 99% das moléculas são dímeros de CTLA4-Ig. Em outra modalidade, mais de 99,5% das moléculas são dímeros de CTLA4-Ig. Em outra modalidade, de cerca de 95% a cerca de 99,5% das moléculas são dímeros de CTLA4-Ig e cerca de 0,5% a cerca de 5% das moléculas são tetrâmeros de CTLA4-Ig ou espécies de elevado peso molecular. Em outra modalidade, cerca de 98,6% das moléculas são dímeros de CTLA4-Ig e cerca de 1,2% das moléculas são tetrâmeros de CTLA4-Ig ou espécies de elevado peso molecular e cerca de menos de 0,7 % das moléculas são monômeros de CTLA4-Ig. A invenção proporciona uma população consistindo de dímeros de CTLA4-Ig. A invenção proporciona uma população de moléculas de CTLA4-Ig, em que a população é substancialmente isenta de monômero de CTLA4-Ig. A invenção proporciona uma população de moléculas de CTLA4-Ig, em que a população é substancialmente isenta de tetrâmero de CTLA4-Ig. A invenção proporciona uma população de monômeros de moléculas de CTLA4-Ig substancialmente isenta de dímero e tetrâmero de CTLA4-Ig. Em uma modalidade, cada monômero de cada dímero de CTLA4-Ig tem pelo menos 3 grupos ácido siálico. Em outra modalidade, cada monômero de cada dímero de CTLA4-Ig tem de pelo menos 3 grupos ácido siálico a pelo menos 8 grupos ácido siálico. A invenção proporciona uma população purifi-

cada de tetrâmeros de moléculas de CTLA4-Ig, a população sendo substancialmente isenta de dímero de CTLA4-Ig e opcionalmente em que a população compreende uma quantidade que é mais de cerca de 100 gramas. A invenção proporciona uma população purificada de tetrâmeros de moléculas de CTLA4-Ig, a população sendo substancialmente isenta de monômero de CTLA4-Ig e opcionalmente em que a população compreende uma quantidade que é mais de cerca de 100 gramas. Em uma modalidade, cada molécula tetramérica compreende dois pares de polipeptídeos de CTLA4-Ig, em que cada polipeptídeo tem uma seqüência de aminoácido selecionada do grupo consistindo de SEQ ID NOS: 5-10 e em que cada membro do par de polipeptídeos é covalentemente ligado ao outro membro e em que os dois pares de polipeptídeos são não covalentemente associados um ao outro. Em outra modalidade, cada molécula tetramérica é capaz de ligação a um CD80 ou CD86. Em uma outra modalidade, cada molécula tetramérica tem pelo menos uma avidéz 2 vezes maior pelo CD80 ou CD86 quando comparado com um dímero de molécula de CTLA4-Ig. Em outra modalidade, cada molécula tetramérica tem pelo menos uma inibição 2 vezes maior de proliferação ou ativação de células T quando comparado com um dímero de molécula de CTLA4-Ig. A invenção proporciona uma composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig, em que a composição compreende isoformas dominantes visualizáveis sobre um gel de focalização isoeletrica de CTLA4-Ig o qual tem um ponto isoeletrico, pI, menos de ou igual a 5,1 conforme determinado através de focalização isoeletrica. Em uma modalidade, a invenção proporciona uma composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig, em que a composição compreende isoformas dominantes visualizáveis sobre um gel de focalização isoeletrica de CTLA4-Ig o qual tem um ponto isoeletrico, pI, menos de ou igual a 5,8 conforme determinado através de focalização isoeletrica. Em uma modalidade, o pI aumenta após tratamento com neuraminidase. Em uma modalidade, a composição compreende isoformas dominantes visualizáveis sobre um gel de focalização isoeletrica de CTLA4-Ig o qual tem um ponto isoeletrico, pI, menos de ou igual a 5,7, 5,6, 5,5, 5,4, 5,3, 5,2, 5,1, 5,0, 4,9, 4,8, 4,7, 4,6 ou 4,5 conforme determinado através de focaliza-

ção isoelétrica. Em outra modalidade, pelo menos 40% das moléculas de CTLA4-Ig exibem um ponto isoelétrico de menos de ou igual a cerca de 5,1 conforme determinado através de focalização isoelétrica. Em outra modalidade, pelo menos 70% das moléculas de CTLA4-Ig exibem um ponto isoelétrico de menos de ou igual a cerca de 5,1 conforme determinado através de focalização isoelétrica. Em outra modalidade, pelo menos 90% das moléculas de CTLA4-Ig exibem um ponto isoelétrico de menos de ou igual a cerca de 2,5 conforme determinado através de focalização isoelétrica. A invenção proporciona uma população de moléculas de CTLA4-Ig tendo um pI de cerca de $2,0 \pm 0,2$ a cerca de $5,0 \pm 0,2$. A invenção proporciona uma população de moléculas de CTLA4-Ig tendo um pI de cerca de $4,0 \pm 0,2$ a cerca de $5,0 \pm 0,2$. A invenção proporciona uma população de moléculas de CTLA4-Ig tendo um pI de cerca de $4,3 \pm 0,2$ a cerca de $5,0 \pm 0,2$. A invenção proporciona uma população de moléculas de CTLA4-Ig tendo um pI de cerca de $3,3 \pm 0,2$ a cerca de $4,7 \pm 0,2$. A invenção proporciona um método para preparo de uma composição, a composição compreendendo uma molécula de CTLA4-Ig com um pI de cerca de $2,0 \pm 0,2$ a cerca de $5,0 \pm 0,2$, o método compreendendo: (a) sujeição de uma mistura de moléculas de CTLA4-Ig à eletroforese em gel de focalização isoelétrica, em que uma única banda sobre o gel representa uma população de moléculas de CTLA4-Ig com um pI em particular e (b) isolamento da população de moléculas de CTLA4-Ig tendo um pI de cerca de $2,0 \pm 0,2$ a cerca de $5,0 \pm 0,2$ de modo a preparar a composição.

A invenção proporciona uma composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig, em que as moléculas de CTLA4-Ig são caracterizadas por uma proporção molar média de GlcNAc por mol de dímero de CTLA4-Ig ou para molécula de CTLA4-Ig de cerca de 15 a cerca de 35. A invenção proporciona uma composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig, em que as moléculas de CTLA4-Ig são caracterizadas por uma proporção molar média de GalNAc por mol de dímero de CTLA4-Ig ou para molécula de CTLA4-Ig de cerca de 1,7 a cerca de 3,6. A invenção proporciona uma composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig, em que as moléculas de CTLA4-Ig são caracterizadas por uma proporção molar média de galactose

por mol de dímero de CTLA4-Ig ou para molécula de CTLA4-Ig de cerca de 8 a cerca de 17. A invenção proporciona uma composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig, em que as moléculas de CTLA4-Ig são caracterizadas por uma proporção molar média de fucose por mol de dímero de CTLA4-Ig ou para molécula de CTLA4-Ig de cerca de 3,5 a cerca de 8,3. A invenção proporciona uma composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig, em que as moléculas de CTLA4-Ig são caracterizadas por uma proporção molar média de manose por mol de dímero de CTLA4-Ig ou para molécula de CTLA4-Ig de cerca de 7,2 a cerca de 22. A invenção proporciona uma composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig, em que as moléculas de CTLA4-Ig são caracterizadas por uma proporção molar média de ácido siálico por mol de dímero de CTLA4-Ig ou para molécula de CTLA4-Ig de cerca de 6 a cerca de 12.

A invenção proporciona uma composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig caracterizada por: (a) uma proporção molar média de GlcNAc por mol de dímero de CTLA4-Ig ou molécula de CTLA4-Ig de cerca de 15 a cerca de 35; e (b) uma proporção molar média de ácido siálico por mol de dímero de CTLA4-Ig ou molécula de CTLA4-Ig de cerca de 6 a cerca de 12. A invenção proporciona uma composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig caracterizada por: (a) uma proporção molar média de GlcNAc por mol de dímero de CTLA4-Ig ou molécula de CTLA4-Ig de cerca de 15 a cerca de 35; (b) uma proporção molar média de GalNAc por mol de dímero de CTLA4-Ig ou molécula de CTLA4-Ig de cerca de 1,7 a cerca de 3,6; e (c) uma proporção molar média de ácido siálico por mol de dímero de CTLA4-Ig ou molécula de CTLA4-Ig de cerca de 6 a cerca de 12. A invenção proporciona uma composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig caracterizada por: (a) uma proporção molar média de GlcNAc por mol de dímero de CTLA4-Ig ou molécula de CTLA4-Ig de cerca de 15 a cerca de 35; (b) uma proporção molar média de GalNAc por mol de dímero de CTLA4-Ig ou molécula de CTLA4-Ig de cerca de 1,7 a cerca de 3,6; (c) uma proporção molar média de galactose por mol de dímero de CTLA4-Ig ou molécula de CTLA4-Ig de cerca de 8 a cerca de 17; e (d) uma proporção molar média de ácido

siálico por mol de dímero de CTLA4-Ig ou molécula de CTLA4-Ig de cerca de 6 a cerca de 12. A invenção proporciona uma composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig caracterizada por: (a) uma proporção molar média de GlcNAc por mol de dímero de CTLA4-Ig ou molécula de CTLA4-Ig de
5 cerca de 15 a cerca de 35; (b) uma proporção molar média de GalNAc por mol de dímero de CTLA4-Ig ou molécula de CTLA4-Ig de cerca de 1,7 a cerca de 3,6; (c) uma proporção molar média de galactose por mol de dímero de CTLA4-Ig ou molécula de CTLA4-Ig de cerca de 8 a cerca de 17; (d) uma
10 proporção molar média de fucose por mol de dímero de CTLA4-Ig ou molécula de CTLA4-Ig de cerca de 3,5 a cerca de 8,3; e (e) uma proporção molar média de ácido siálico por mol de dímero de CTLA4-Ig ou molécula de CTLA4-Ig de cerca de 6 a cerca de 12. A invenção proporciona uma composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig caracterizada por: (a) uma proporção molar média de GlcNAc por mol de dímero de CTLA4-Ig ou molécula
15 de CTLA4-Ig de cerca de 15 a cerca de 35; (b) uma proporção molar média de GalNAc por mol de dímero ou molécula de CTLA4-Ig de cerca de 1,7 a cerca de 3,6; (c) uma proporção molar média de galactose por mol de dímero ou molécula de CTLA4-Ig de cerca de 8 a cerca de 17; (d) uma proporção molar média de fucose por mol de dímero ou molécula de CTLA4-Ig de cerca
20 de 3,5 a cerca de 8,3; (e) uma proporção molar média de manose por mol de dímero ou molécula de CTLA4-Ig de cerca de 7,2 a cerca de 22; e (f) uma proporção molar média de ácido siálico por mol de dímero de CTLA4-Ig ou molécula de CTLA4-Ig de cerca de 6 a cerca de 12. A invenção proporciona uma composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig, em que a composição
25 posição exibe um pico por cromatograma de NGNA de cerca de $9,589 \pm 0,3$ e um pico por cromatograma de NANA de cerca de $10,543 \pm 0,3$. A invenção proporciona uma composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig, em que as moléculas de CTLA-Ig exibem um perfil de carboidrato conforme mostrado na Figura 68. A invenção proporciona uma composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig, em que as moléculas de CTLA4-Ig exibem
30 um perfil de carboidrato dos Domínios I – V (por exemplo, I-IV), em que o Domínio I compreende picos os quais representam oligossacarídeos a-

sialilados, o Domínio II compreende picos os quais representam oligossacarídeos mono-sialilados, o Domínio III compreende picos os quais representam oligossacarídeos di-sialilados e o Domínio IV compreende picos os quais representam oligossacarídeos tri-sialilados. O Domínio V compreende picos que representam oligossacarídeo tetra-sialilados. Em uma modalidade, a diferença nos tempos de retenção de oligossacarídeos N-ligados entre um primeiro pico no Domínio I e um pico principal no Domínio II é de cerca de 22 a cerca de 28 minutos. A invenção proporciona uma composição compreendendo dímeros de moléculas de CTLA4-Ig, em que pelo menos 0,5 % dos dímeros de moléculas de CTLA4-Ig são cisteinilados. Em uma modalidade, pelo menos 1,0% dos dímeros de moléculas de CTLA4-Ig são cisteinilados. A invenção proporciona uma população de moléculas de CTLA4-Ig, em que a população exibe um perfil de espectrometria de massa conforme mostrado nas Figuras 8 e 10. A invenção proporciona uma população de moléculas de CTLA4-Ig, em que a população exibe um perfil de eletroforese capilar conforme mostrado nas Figuras 20 e 21. A invenção proporciona uma composição de moléculas de CTLA4-Ig tendo uma proporção molar média de grupos ácido siálico para dímero de CTLA4-Ig de cerca de 6 a cerca de 18. A invenção proporciona uma composição de CTLA4-Ig obtida através de qualquer um dos métodos descritos aqui. A invenção proporciona uma população de moléculas de CTLA4-Ig, em que as moléculas são glicosiladas em um resíduo de aminoácido asparagina na posição 102 de SEQ ID NO: 2, um resíduo de aminoácido asparagina na posição 134 de SEQ ID NO: 2, um resíduo de aminoácido asparagina na posição 233 de SEQ ID NO: 2, um resíduo de aminoácido serina na posição 155 de SEQ ID NO: 2 ou um resíduo de aminoácido serina na posição 165 de SEQ ID NO: 2.

A invenção proporciona uma população de moléculas de CTLA4-Ig, em que a população de moléculas é caracterizada por: (a) uma proporção molar média de GlcNAc por mol de dímero de CTLA4-Ig ou molécula de CTLA4-Ig de cerca de 15 a cerca de 35; (b) uma proporção molar média de GalNAc por mol de dímero ou molécula de CTLA4-Ig de cerca de 1,7 a cerca de 3,6; (c) uma proporção molar média de galactose por mol de

dímero ou molécula de CTLA4-Ig de cerca de 8 a cerca de 17; (d) uma proporção molar média de fucose por mol de dímero ou molécula de CTLA4-Ig de cerca de 3,5 a cerca de 8,3; (e) uma proporção molar média de manose por mol de dímero ou molécula de CTLA4-Ig de cerca de 7,2 a cerca de 22; 5 (f) uma proporção molar média de ácido siálico por mol de dímero ou molécula de CTLA4-Ig de cerca de 6 a cerca de 12; (g) um pI, conforme determinado a partir de visualização sobre um gel de focalização isoeletrica, em uma faixa de cerca de $2,4 \pm 0,2$ a cerca de $5,0 \pm 0,2$; (h) MCP-1 de menos de ou igual a 5 ppm; (i) menos de 3,0 % de tetrâmero (por exemplo, 2,5% de espécies de elevado peso molecular ou tetrâmero, 2,0% de espécies de elevado peso molecular ou tetrâmero; (j) menos de 0,5% de monômero; (k) polipeptídeos de CTLA4-Ig da população tendo uma seqüência de aminoácido pelo menos 95% idêntica a qualquer uma de SEQ ID NOS: 2-8; (l) em que moléculas de CTLA4-Ig dentro da população são capazes de ligação a CD80 e CD86. 10 15

Composições: A invenção proporciona uma composição compreendendo uma quantidade eficaz das moléculas de CTLA4-Ig da invenção e um veículo farmacologicamente aceitável. A invenção proporciona uma composição compreendendo excipientes conforme descrito no Pedido U.S. 20 No. 60/752,150, depositado em 20 de Dezembro de 2005. Em uma modalidade, a composição inclui CTLA4-Ig. Em uma modalidade, a composição ainda compreende um diluente, adjuvante ou veículo farmacologicamente aceitável. Em outra modalidade, a composição ainda compreende maltose, monohidrato monobásico de fosfato de sódio, cloreto de sódio, hidróxido de sódio e água estéril. Em outra modalidade, a composição compreende saca- 25 rose, poloxâmico, monohidrato monobásico de fosfato de sódio, fosfato de sódio anídrico dibásico, cloreto de sódio, hidróxido de sódio e água estéril.

Formulações e Kits: A invenção proporciona uma mistura liofilizada de CTLA4-Ig compreendendo pelo menos 95% de dímero de CTLA4-Ig e não mais do que 5% de tetrâmero de CTLA4-Ig. Em uma modalidade, a mistura compreende pelo menos 98% de dímero de CTLA4-Ig e não mais do que 2% de espécies de elevado peso molecular ou tetrâmero de CTLA4-Ig. 30

Em outra modalidade, a mistura compreende pelo menos 99% de dímero de CTLA4-Ig e não mais do que 1% de espécies de elevado peso molecular ou tetrâmero de CTLA4-Ig. Em outra modalidade, a mistura compreende pelo menos 8,0 moles de ácido siálico por mol de dímero ou molécula de CTLA4-Ig. Em outra modalidade, a mistura compreende cerca de 15,7 a cerca de 31 moles de GlcNAc por mol de dímero ou molécula de CTLA4-Ig. Em outra modalidade, a mistura compreende cerca de 1,6 a cerca de 3,2 moles de GalNAc por mol de dímero ou molécula de CTLA4-Ig. Em outra modalidade, a mistura compreende cerca de 9,3 a cerca de 15,5 moles de galactose por mol de dímero ou molécula de CTLA4-Ig. Em uma modalidade, a mistura compreende cerca de 3,6 a cerca de 7,9 moles de fucose por mol de dímero ou molécula de CTLA4-Ig. Em uma modalidade, a mistura compreende cerca de 9,7 moles de manose por mol de dímero ou molécula de CTLA4-Ig. A invenção também proporciona um kit farmacêutico compreendendo: (a) um recipiente contendo uma mistura liofilizada de CTLA4-Ig da invenção; e (b) instruções para reconstituição da mistura liofilizada de CTLA4-Ig em solução para injeção.

Métodos ilustrativos de Tratamento: A invenção proporciona um método para inibição de proliferação de células T (ou ativação), o método compreendendo contato de uma célula T com uma quantidade eficaz de uma composição de CTLA4-Ig da invenção. A invenção proporciona um método para inibição de uma resposta imune em um indivíduo, o método compreendendo administração, a um indivíduo que precisa do mesmo, de uma quantidade eficaz de uma composição de CTLA4-Ig da invenção. A invenção proporciona um método para indução de tolerância imune a um antígeno em um indivíduo, o método compreendendo administração, a um indivíduo que precisa do mesmo, de uma quantidade eficaz de uma composição de CTLA4-Ig da invenção. A invenção proporciona um método para tratamento de inflamação em um indivíduo, o método compreendendo administração, a um indivíduo que precisa do mesmo, de uma quantidade eficaz de uma composição de CTLA4-Ig da invenção. A invenção proporciona um método para tratamento de artrite reumatóide compreendendo administração, a um

indivíduo que precisa do mesmo, de uma quantidade eficaz de uma composição de CTLA4-Ig da invenção. A invenção proporciona um método para tratamento de psoríase em um indivíduo, o método compreendendo administração, a um indivíduo que precisa do mesmo, de uma quantidade eficaz de uma composição de CTLA4-Ig da invenção. A invenção proporciona um método para tratamento de lupus em um indivíduo, o método compreendendo administração, a um indivíduo que precisa do mesmo, de uma quantidade eficaz de uma composição de CTLA4-Ig da invenção. A invenção proporciona um método para tratamento de ou prevenção de uma alergia em um indivíduo, o método compreendendo administração, a um indivíduo que precisa do mesmo, de uma quantidade eficaz de uma composição de CTLA4-Ig da invenção. A invenção proporciona um método para tratamento de ou prevenção de doença enxerto vs hospedeiro em um indivíduo, o método compreendendo administração, a um indivíduo que precisa do mesmo, de uma quantidade eficaz de uma composição de CTLA4-Ig da invenção. A invenção proporciona um método para tratamento de ou prevenção de rejeição de um órgão transplantado em um indivíduo, o método compreendendo administração, a um indivíduo que precisa do mesmo, de uma quantidade eficaz de uma composição de CTLA4-Ig da invenção. A invenção proporciona um método para tratamento de esclerose múltipla em um indivíduo, o método compreendendo administração, a um indivíduo que precisa do mesmo, de uma quantidade eficaz de uma composição de CTLA4-Ig da invenção. A invenção proporciona um método para tratamento de Doença de Crohn em um indivíduo, o método compreendendo administração, a um indivíduo que precisa do mesmo, de uma quantidade eficaz de uma composição de CTLA4-Ig da invenção. A invenção proporciona um método para tratamento de diabetes do tipo I em um indivíduo, o método compreendendo administração, a um indivíduo que precisa do mesmo, de uma quantidade eficaz de uma composição de CTLA4-Ig da invenção. A invenção proporciona um método para tratamento de doença inflamatória do intestino em um indivíduo, o método compreendendo administração, a um indivíduo que precisa do mesmo, de uma quantidade eficaz de uma composição de CTLA4-Ig da invenção. A in-

venção proporciona um método para tratamento de ooforite em um indivíduo, o método compreendendo administração, a um indivíduo que precisa do mesmo, de uma quantidade eficaz de uma composição de CTLA4-Ig da invenção. A invenção proporciona um método para tratamento de glomerulonefrite em um indivíduo, o método compreendendo administração, a um indivíduo que precisa do mesmo, de uma quantidade eficaz de uma composição de CTLA4-Ig da invenção. A invenção proporciona um método para tratamento de encefalomielite alérgica em um indivíduo, o método compreendendo administração, a um indivíduo que precisa do mesmo, de uma quantidade eficaz de uma composição de CTLA4-Ig da invenção. A invenção proporciona um método para tratamento de miastenia gravis em um indivíduo, o método compreendendo administração, a um indivíduo que precisa do mesmo, de uma quantidade eficaz de uma composição de CTLA4-Ig da invenção.

15 A invenção proporciona o uso de uma população de moléculas de CTLA4-Ig tendo uma proporção molar média de grupos ácido siálico para dímero ou molécula de CTLA4-Ig de cerca de 6 a cerca de 18 na fabricação de um medicamento para o tratamento terapêutico e/ou profilático de um distúrbio imune. A invenção proporciona o uso de uma população de moléculas de CTLA4-Ig tendo uma proporção molar média de grupos ácido siálico para dímero ou molécula de CTLA4-Ig de cerca de 6 a cerca de 18 na fabricação de um agente anti-artrite reumatóide em uma embalagem junto com instruções para seu uso no tratamento de artrite reumatóide.

Terapias combinadas ilustrativas: A invenção proporciona um método para inibição de proliferação de células T (ou ativação), o método compreendendo contato de uma célula T com uma quantidade eficaz de uma composição de CTLA4-Ig da invenção em combinação com metotrexato. A invenção proporciona um método para inibição de uma resposta imune em um indivíduo, o método compreendendo administração, a um indivíduo que precisa do mesmo, de uma quantidade eficaz de uma composição de CTLA4-Ig da invenção em combinação com metotrexato. A invenção proporciona um método para indução de tolerância imune a um antígeno em um

indivíduo, o método compreendendo administração, a um indivíduo que precisa do mesmo, de uma quantidade eficaz de uma composição de CTLA4-Ig da invenção em combinação com metotrexato.

Métodos para produção de CTLA4-Ig: A invenção proporciona

5 um método para produção de uma proteína recombinante, o método compreendendo: (a) expansão de células de mamífero que secretam uma proteína recombinante, em que a expansão é de uma cultura originária para uma cultura líquida, em que a concentração de proteína recombinante é de pelo menos 0,5 gramas / L de cultura líquida; e (b) isolamento da proteína recom-

10 binante da cultura líquida. A cultura líquida pode ser de pelo menos 1.000 L, pelo menos 5.000 L, pelo menos 10.000 L, pelo menos 15.000 L, pelo menos 20.000 L, pelo menos 25.000 L, pelo menos 30.000 L, pelo menos 40.000 L. Em uma modalidade, a expansão da etapa (a) compreende: (i)

15 cultura das células em um meio isento de soro quimicamente definido com pelo menos quatro passagens, de modo a obter uma densidade celular de pelo menos cerca de $1,0 \times 10^5$ células viáveis por mL, em que cada estágio de semente começa em cerca de 2×10^5 por mL e vai até 1-2 mil células por mL; (ii) manutenção das células em cultura durante um tempo suficiente para produzir, a partir da cultura, pelo menos cerca de 0,5 g / L. Em uma modali-

20 dade, a proteína é uma glicoproteína. Em uma modalidade, a proteína é uma proteína de CTLA4-Ig. Em uma modalidade, as células de mamífero são a prole de uma linhagem de célula clonal CHO capaz de produzir proteínas de fusão de CTLA4-Ig, em que as células CHO têm, estavelmente integradas em seu genoma, pelo menos 30 cópias de um cassete de expressão de C-

25 TLA4-Ig. Em uma modalidade, o tempo suficiente é um tempo pelo qual a viabilidade das células não cai abaixo de 30%. Em outra modalidade, o tempo suficiente é um tempo pelo qual a viabilidade das células não cai abaixo de 40%. Em outra modalidade, o tempo suficiente é um tempo pelo qual a viabilidade das células não cai abaixo de 50%. Em outra modalidade, o tem-

30 po suficiente é um tempo pelo qual a viabilidade das células não cai abaixo de 60%. Em outra modalidade, o tempo suficiente é um tempo pelo qual a viabilidade das células não cai abaixo de 70% ou 80% ou 90% ou 95%.

Em uma outra modalidade, as pelo menos quatro passagens compreendem: (i) crescimento das células em um volume de cultura de pelo menos 50 mL até uma densidade celular de cerca de 1 milhão a cerca de 2,5 mil células por mL ser atingida, (ii) crescimento das células em um volume de cultura de pelo menos 10 L até uma densidade celular de cerca de 1 milhão a cerca de 2,5 milhão de células por mL ser atingida; (iii) crescimento das células em um volume de cultura de pelo menos 100 L até uma densidade celular de cerca de 1 milhão a cerca de 2,5 milhão de células por mL ser atingida; e (iv) crescimento das células em um volume de cultura de 200 L até uma densidade celular de cerca de 1 milhão a cerca de 2,5 milhão de células por mL ser atingida. Em uma modalidade, galactose é adicionada ao meio isento de soro quimicamente definido. Em uma modalidade, a manutenção de compreende (i) diminuição da temperatura da cultura de $37\pm 2^{\circ}\text{C}$ para $34\pm 2^{\circ}\text{C}$; e (ii) diminuição da temperatura da cultura de $34\pm 2^{\circ}\text{C}$ para $32\pm 2^{\circ}\text{C}$. Em outra modalidade, a temperatura é mantida dentro da faixa de $32\pm 2^{\circ}\text{C}$ durante pelo menos 5 dias. Em outra modalidade, a temperatura é mantida dentro da faixa de $32\pm 2^{\circ}\text{C}$ durante pelo menos 6 dias. Em outra modalidade, a temperatura é mantida dentro da faixa de $32\pm 2^{\circ}\text{C}$ durante pelo menos 7 dias. Em outra modalidade, a temperatura é mantida dentro da faixa de $32\pm 2^{\circ}\text{C}$ durante pelo menos 8 dias. Em outra modalidade, a temperatura é mantida dentro da faixa de $32\pm 2^{\circ}\text{C}$ durante pelo menos 9 dias. Em outra modalidade, a temperatura é mantida dentro da faixa de $32\pm 2^{\circ}\text{C}$ durante pelo menos 10 dias. Em outra modalidade, a temperatura é mantida dentro da faixa de $32\pm 2^{\circ}\text{C}$ durante pelo menos 11 dias. Em outra modalidade, a temperatura é mantida dentro da faixa de $32\pm 2^{\circ}\text{C}$ durante pelo menos 12 dias. Em outra modalidade, a temperatura é mantida dentro da faixa de $32\pm 2^{\circ}\text{C}$ durante pelo menos 13 dias. Em outra modalidade, a temperatura é mantida dentro da faixa de $32\pm 2^{\circ}\text{C}$ durante pelo menos 14 dias. Em outra modalidade, a temperatura é mantida dentro da faixa de $32\pm 2^{\circ}\text{C}$ durante pelo menos 15 dias. Em outra modalidade, a temperatura é mantida dentro da faixa de $32\pm 2^{\circ}\text{C}$ durante pelo menos 16 dias. Em outra modalidade, a temperatura é mantida dentro da faixa de $32\pm 2^{\circ}\text{C}$ durante pelo menos 17 dias.

Em outra modalidade, a temperatura é mantida dentro da faixa de $32\pm 2^{\circ}\text{C}$ durante pelo menos 18 dias. Em outra modalidade, a temperatura é mantida dentro da faixa de $32\pm 2^{\circ}\text{C}$ durante até 18 dias. Em outra modalidade, a temperatura é mantida dentro da faixa de $32\pm 2^{\circ}\text{C}$ até a densidade celular da cultura ser de cerca de 30×10^5 a cerca de 79×10^5 células por mL de cultura líquida.

A invenção proporciona um método para produção de uma proteína recombinante, o método compreendendo: (a) expansão de células de mamífero que secretam uma proteína recombinante de uma cultura originária para uma cultura líquida, de modo que a concentração de proteína recombinante seja de pelo menos 0,5 gramas / L de cultura líquida; e (b) isolamento da proteína recombinante da cultura líquida, em que o isolamento ocorre apenas quando a cultura líquida contém mais de ou igual a cerca de 6,0 moles de NANA por mol de proteína ou dímero de CTLA4-Ig.

A invenção proporciona um método para produção de uma proteína recombinante, o método compreendendo: (a) expansão de células de mamífero que secretam uma proteína recombinante de uma cultura originária para uma cultura líquida, de modo que a concentração de proteína recombinante é pelo menos 0,5 gramas / L de cultura líquida; e (b) isolamento da proteína recombinante da cultura líquida, em que o isolamento ocorre apenas quando a cultura líquida tem uma densidade celular de cerca de 33×10^5 a cerca de 79×10^5 células por mL.

A invenção proporciona um método para produção de uma proteína recombinante, o método compreendendo: (a) expansão de células de mamífero que secretam uma proteína recombinante de uma cultura originária para uma cultura líquida, de modo que a concentração de proteína recombinante seja de pelo menos 0,5 gramas / L de cultura líquida; e (b) isolamento da proteína recombinante da cultura líquida, em que o isolamento ocorre quando a viabilidade celular na cultura líquida não caiu para abaixo de cerca de 20% ou cerca de 30% ou cerca de 38%.

A invenção proporciona um método para produção de uma proteína recombinante, o método compreendendo: (a) expansão de células de mamífero que secretam uma proteína recombinante de uma cultura originária para uma cultura líquida de pelo menos

10.000 L, de modo que a concentração de proteína recombinante é pelo menos 0,5 gramas / L de cultura líquida; e (b) isolamento da proteína recombinante da cultura líquida, em que o isolamento ocorre apenas quando a endotoxina é menos de ou igual a cerca de 76,8 EU por mL de cultura líquida.

- 5 A invenção proporciona um método para produção de uma proteína recombinante, o método compreendendo: (a) expansão de células de mamífero que secretam uma proteína recombinante de uma cultura originária para uma cultura líquida de pelo menos 10.000 L, de modo que a concentração de proteína recombinante é pelo menos 0,5 gramas / L de cultura líquida; e
- 10 (b) isolamento da proteína recombinante de uma cultura líquida de pelo menos 10.000 L, em que o isolamento ocorre apenas quando a biocarga é menos de 1 unidade de formação de colônia por mL de cultura líquida. A cultura líquida da invenção pode ser de um volume de pelo menos 5.000 L, pelo menos 10.000 L, pelo menos 15.000 L, pelo menos 20.000 L, pelo menos
- 15 25.000 L, pelo menos 30.000 L, pelo menos 40.000 L, pelo menos 50.000 L, pelo menos 60.000 L.

- A invenção proporciona um método para produção de uma proteína recombinante, o método compreendendo: (a) expansão de células de mamífero que secretam uma proteína recombinante de uma cultura originária para uma cultura líquida, de modo que a concentração de proteína recombinante seja de pelo menos 0,5 gramas / L de cultura líquida; e (b) isolamento da proteína recombinante da cultura líquida, em que o isolamento ocorre apenas se pelo menos duas das seguintes condições são reunidas:
- 20 (i) a cultura líquida contém mais de ou igual a cerca de 6,0 moles de NANA por mol de proteína, (ii) a cultura líquida tem uma densidade celular de cerca de 33×10^5 a cerca de 79×10^5 células por mL, (iii) a viabilidade celular na cultura líquida não caiu para abaixo de cerca de 20% ou cerca de 38% ou
- 25 (iv) a quantidade de CTLA4-Ig na cultura é mais de 0,5 g / L. Em uma modalidade, o isolamento compreende: (i) obtenção de um sobrenadante de cultura de célula; (ii) sujeição do sobrenadante à cromatografia de troca de ânions para obter um produto de proteína eluído; (iii) sujeição do produto de proteína eluído da etapa (ii) à cromatografia de interação hidrofóbica, de
- 30

modo a obter um produto de proteína enriquecido; (iv) sujeição do produto de proteína enriquecido à cromatografia por afinidade para obter um produto de proteína enriquecido eluído; e (v) sujeição do produto de proteína enriquecido eluído de (iv) à cromatografia de troca de ânions. Em outra modalidade, o produto de proteína enriquecido obtido na etapa (iii) é caracterizado pelo fato de que um percentual de qualquer contaminante de elevado peso molecular é menos de 25% em peso. Em outra modalidade, a cromatografia de troca de ânions da etapa (ii) é realizada usando um tampão de lavagem compreendendo HEPES a cerca de 75 mM e NaCl a cerca de 360 mM e tendo um pH de cerca de 8,0. Em outra modalidade, a cromatografia de troca de ânions da etapa (ii) é realizada usando um tampão de eluição compreendendo HEPES a cerca de 25 mM e NaCl a cerca de 325 mM e tendo um pH de cerca de 7,0. Em outra modalidade, a cromatografia de interação hidrofóbica da etapa (iii) é realizada usando um único tampão de lavagem compreendendo HEPES a cerca de 25 mM e NaCl a cerca de 850 mM e tendo um pH de cerca de 7,0. Em outra modalidade, a cromatografia por afinidade da etapa (iv) é realizada usando um tampão de lavagem compreendendo Tris a cerca de 25 mM e NaCl a cerca de 250 mM e tendo um pH de cerca de 8,0. Em outra modalidade, a cromatografia por afinidade da etapa (iv) é realizada usando um tampão de eluição compreendendo Glicina a cerca de 100 mM e tendo um pH de cerca de 3,5. Em outra modalidade, a cromatografia de troca de ânions da etapa (v) é realizada usando um tampão de lavagem compreendendo HEPES a cerca de 25 mM e NaCl de cerca de 120 mM a NaCl a cerca de 130 mM e tendo um pH de cerca de 8,0. Em outra modalidade, a cromatografia de troca de ânions da etapa (v) é realizada usando um tampão de eluição compreendendo HEPES a cerca de 25 mM e NaCl a cerca de 200 mM e tendo um pH de cerca de 8,0. Em outra modalidade, a cromatografia de troca de ânions da etapa (ii) é realizada usando uma coluna tendo uma resina de troca de ânions tendo um grupo amina primária, secundária, terciária ou quaternária. Em outra modalidade, a resina tem um grupo funcional amina quaternária. Em outra modalidade, a cromatografia de interação hidrofóbica da etapa (iii) é realizada usando uma resina

de interação hidrofóbica tendo um grupo funcional fenila, um octila, um propila, um alcóxi, um butila ou um isoamila. Em outra modalidade, o grupo funcional é um grupo funcional fenila. Em outra modalidade, a cromatografia por afinidade da etapa (iv) é realizada usando uma coluna contendo Proteína A.

5 A invenção proporciona um método para preparo de CTLA4-Ig, o método compreendendo purificação de CTLA4-Ig de uma cultura de célula líquida, de modo que a CTLA4-Ig purificada (a) tem cerca de 38 ng de MCP-1 por mg de dímero de CTLA4-Ig e (b) compreende menos de 2,5% de espécies de elevado peso molecular de CTLA4-Ig (por exemplo, tetrâmero) em peso. A invenção proporciona um método para produção de CTLA4-Ig, o método compreendendo: (a) expansão de células de prole ou células CHO que são capazes de produzir CTLA4-Ig, em que a expansão é de uma cultura originária para uma cultura líquida de pelo menos 10.000 L, em que a concentração de CTLA4-Ig é pelo menos 0,5 gramas / L de cultura líquida; e
10 (b) isolamento de CTLA4-Ig de uma cultura líquida de pelo menos 10.000 L, em que a cromatografia é sobre uma coluna com resina de interação hidrofóbica com pelo menos um grupo funcional fenila, em que o isolamento compreende uma etapa de cromatografia de interação hidrofóbica realizada usando um único tampão de lavagem compreendendo HEPES a cerca de 25
15 mM e NaCl a cerca de 850 mM e tendo um pH de cerca de 7,0.
20

Moléculas de CTLA4-Ig incluem moléculas de beta polipeptídeo. CTLA4^{A29YL104E}-Ig é uma molécula de beta polipeptídeo. A presente invenção se refere a métodos para produção de (incluindo produção em massa) composições de beta polipeptídeo ou composições de molécula de beta polipeptídeo e composições aperfeiçoadas. A invenção é dirigida à moléculas de beta polipeptídeo, composições aperfeiçoadas compreendendo moléculas de beta polipeptídeo e métodos aperfeiçoados para produção de (incluindo produção em massa) moléculas de beta polipeptídeo e outras glicoproteínas recombinantes.

30 **Métodos para produção de beta polipeptídeos e outras glicoproteínas:** A invenção proporciona um método para produção de uma glicoproteína recombinante, o método compreendendo: (a) expansão de cé-

lulas de mamífero que secretam uma glicoproteína recombinante, em que a expansão é de uma cultura originária para uma cultura líquida de pelo menos cerca de 10.000 L, em que a concentração de proteína recombinante é pelo menos cerca de 0,5 g/L de cultura líquida, em que a expansão compreende: (i) cultura das células em um meio isento de soro quimicamente definido com pelo menos quatro passagens, de modo a obter uma densidade celular de pelo menos cerca de $1,0 \times 10^5$ células viáveis por mL, em que cada estágio de semente começa em cerca de 2×10^5 por mL e vai até cerca de 1-2 milhão células por mL, em que a cultura compreende: (1) cultura das células em um meio de inóculo isento de soro quimicamente definido durante de cerca de 15 dias a cerca de 25 dias; então, (2) cultura das células em um meio basal isento de soro quimicamente definido até uma densidade celular de cerca de pelo menos 4 milhão células por mL ser atingida; e (ii) manutenção das células em cultura durante um tempo suficiente para produzir a proteína recombinante da cultura de pelo menos cerca de 0,5 g/L; e (b) isolamento da proteína recombinante da cultura líquida de pelo menos cerca de 10.000 L.

A invenção proporciona um método para produção de uma glicoproteína recombinante, o método compreendendo: (a) expansão de células de mamífero que secretam uma glicoproteína recombinante, em que a expansão é de uma cultura originária para uma cultura líquida de pelo menos cerca de 10.000 L, em que a concentração de proteína recombinante é pelo menos cerca de 0,5 g/L de cultura líquida, em que a expansão compreende: (i) cultura das células em um meio isento de soro quimicamente definido com pelo menos quatro passagens, de modo a obter uma densidade celular de pelo menos cerca de $1,0 \times 10^5$ células viáveis por mL, em que cada estágio de semente começa em cerca de 2×10^5 por mL e vai até cerca de 1-2 milhão células por mL; e (ii) manutenção das células em cultura durante um tempo suficiente para produzir a proteína recombinante da cultura de pelo menos cerca de 0,5 g/L, em que a manutenção compreende: (1) diminuição da temperatura da cultura de $37 \pm 2^\circ\text{C}$ para $34 \pm 2^\circ\text{C}$; e (2) adição de um composto polianiónico à cultura; e (b) isolamento da proteína re-

combinante da cultura líquida de pelo menos cerca de 10.000 L.

A invenção proporciona um método para produção de uma glicoproteína recombinante, o método compreendendo: (a) expansão de células de mamífero que secretam uma glicoproteína recombinante, em que a
5 expansão é de uma cultura originária para uma cultura líquida de pelo menos cerca de 10.000 L, em que a concentração de proteína recombinante é pelo menos cerca de 0,5 g/L de cultura líquida; e (b) isolamento da proteína recombinante da cultura líquida de pelo menos cerca de 10.000 L, em que o
10 isolamento compreende: (i) obtenção de uma fração solúvel da cultura da etapa (a); (ii) sujeição da fração solúvel à cromatografia por afinidade para obter um produto de proteína eluído; (iii) sujeição do produto de proteína eluído da etapa (ii) à cromatografia de troca de ânions de modo a obter um produto de proteína enriquecido eluído; e (iv) sujeição do produto de proteína enriquecido à cromatografia de interação hidrofóbica para obter um produto
15 de proteína enriquecido.

Em uma modalidade da invenção, a proteína compreende uma CTLA4-Ig. Em outra modalidade, a proteína compreende um beta polipeptídeo ou moléculas de beta polipeptídeo. Em outra modalidade, a proteína compreende beta polipeptídeos tendo SEQ ID NO: 11, 12, 13, 14, 15 ou 16.

20 Em uma modalidade da invenção, as pelo menos quatro passagens compreendem: (i) crescimento das células em um volume de cultura de pelo menos 50 mL até uma densidade celular de cerca de 1 milhão a cerca de 2,5 milhão células por mL ser atingida; (ii) crescimento das células em um volume de cultura de pelo menos 10 L até uma densidade celular de cerca
25 de 1 milhão a cerca de 2,5 milhão células por mL ser atingida; (iii) crescimento das células em um volume de cultura de pelo menos 100 L até uma densidade celular de cerca de 1 milhão a cerca de 2,5 milhão células por mL ser atingida; e (iv) crescimento das células em um volume de cultura de 200 L até uma densidade celular de cerca de 1 milhão a cerca de 2,5 milhão cé-
30 lulas por mL ser atingida.

Em uma modalidade da invenção, o isolamento compreende: (i) obtenção de uma fração solúvel da cultura da etapa (a); (ii) sujeição da fra-

ção solúvel à cromatografia por afinidade para obter um produto de proteína eluído; (iii) sujeição do produto de proteína eluído da etapa (ii) à cromatografia de troca de ânions de modo a obter um produto de proteína enriquecido eluído; e (iv) sujeição do produto de proteína enriquecido à cromatografia de interação hidrofóbica para obter um produto de proteína enriquecido.

Em uma modalidade, o produto de proteína enriquecido obtido na etapa (iv) é caracterizado pelo fato de que um percentual de qualquer multímero de elevado peso molecular é menos de 25% em peso. Em outra modalidade, a cromatografia de troca de ânions da etapa (iii) é realizada usando um tampão de lavagem compreendendo HEPES a cerca de 50 mM e NaCl a cerca de 135 mM e tendo um pH de cerca de 7. Em outra modalidade, a cromatografia de troca de ânions da etapa (iii) é realizada usando um tampão de eluição compreendendo HEPES a cerca de 50 mM e NaCl a cerca de 200 mM e tendo um pH de cerca de 7. Em outra modalidade, a cromatografia de interação hidrofóbica da etapa (iv) é realizada usando um tampão de lavagem compreendendo HEPES a cerca de 50 mM e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a cerca de 1,2 M e tendo um pH de cerca de 7. Em outra modalidade, a cromatografia por afinidade da etapa (ii) é realizada usando um tampão de lavagem compreendendo NaH_2PO_4 a cerca de 25 mM e NaCl a cerca de 150 mM e tendo um pH de cerca de 7,5. Em outra modalidade, a cromatografia por afinidade da etapa (ii) é realizada usando um tampão de eluição compreendendo Glicina a cerca de 250 mM e tendo um pH de cerca de 3. Em outra modalidade, a cromatografia de troca de ânions da etapa (iii) é realizada usando uma coluna tendo uma resina de troca de ânions tendo um grupo amina primária, secundária, terciária ou quaternária. Em outra modalidade, a resina tem um grupo funcional amina quaternária. Em outra modalidade, a cromatografia de interação hidrofóbica da etapa (iii) é realizada usando uma resina de interação hidrofóbica tendo um grupo funcional fenila, um octila, um propila, um alcóxi, um butila ou um isoamila. Em outra modalidade, o grupo funcional é um grupo funcional fenila. Em outra modalidade, a cromatografia por afinidade da etapa (ii) é realizada usando uma coluna contendo Proteína A.

Em outra modalidade, a expansão de compreende: (i) cultura das células em um meio isento de soro quimicamente definido com pelo menos quatro passagens, de modo a obter uma densidade celular de pelo menos cerca de $1,0 \times 10^5$ células viáveis por mL, em que cada estágio de se-
5 mente começa em cerca de 2×10^5 por mL e vai até cerca de 1-2 milhão células por mL; e (ii) manutenção das células em cultura durante um tempo suficiente para produzir a proteína recombinante da cultura de pelo menos cerca de 0,5 g/L. Em outra modalidade, a cultura compreende: (i) cultura das células em um meio de inóculo isento de soro quimicamente definido durante
10 de cerca de 15 dias a cerca de 25 dias; então, (ii) cultura das células em um meio basal isento de soro quimicamente definido até uma densidade celular de cerca de pelo menos 4 milhão células por mL ser atingida.

Em outra modalidade, a manutenção de compreende (i) diminuição da temperatura da cultura de $37 \pm 2^\circ\text{C}$ para $34 \pm 2^\circ\text{C}$; e (ii) adição de um
15 composto polianiônico à cultura. Em uma modalidade, o composto polianiônico é sulfato de dextrana e em que o sulfato de dextrana é adicionado à cultura em uma concentração final de cerca de 50 mg/ml. Em outra modalidade, a temperatura é mantida dentro da faixa de $34 \pm 2^\circ\text{C}$ durante pelo menos 5 dias. Em outra modalidade, a temperatura é mantida dentro da faixa
20 de $34 \pm 2^\circ\text{C}$ durante pelo menos 6 dias. Em outra modalidade, a temperatura é mantida dentro da faixa de $34 \pm 2^\circ\text{C}$ durante pelo menos 7 dias. Em outra modalidade, a temperatura é mantida dentro da faixa de $34 \pm 2^\circ\text{C}$ durante pelo menos 8 dias. Em outra modalidade, a temperatura é mantida dentro da faixa de $34 \pm 2^\circ\text{C}$ durante pelo menos 9 dias. Em outra modalidade, a temperatura é mantida dentro da faixa de $34 \pm 2^\circ\text{C}$ durante pelo menos 10 dias. Em
25 outra modalidade, a temperatura é mantida dentro da faixa de $34 \pm 2^\circ\text{C}$ durante pelo menos 11 dias. Em outra modalidade, a temperatura é mantida dentro da faixa de $34 \pm 2^\circ\text{C}$ durante pelo menos 12 dias. Em outra modalidade, a temperatura é mantida dentro da faixa de $34 \pm 2^\circ\text{C}$ durante pelo menos
30 13 dias. Em outra modalidade, a temperatura é mantida dentro da faixa de $34 \pm 2^\circ\text{C}$ durante pelo menos 14 dias. Em outra modalidade, a temperatura é mantida dentro da faixa de $34 \pm 2^\circ\text{C}$ durante pelo menos 15 dias. Em outra

modalidade, a temperatura é mantida dentro da faixa de $34 \pm 2^\circ\text{C}$ durante pelo menos 16 dias. Em outra modalidade, a temperatura é mantida dentro da faixa de $34 \pm 2^\circ\text{C}$ durante pelo menos 17 dias. Em outra modalidade, a temperatura é mantida dentro da faixa de $34 \pm 2^\circ\text{C}$ durante pelo menos 18 dias. Em outra modalidade, a temperatura é mantida dentro da faixa de $34 \pm 2^\circ\text{C}$ durante pelo menos 19 dias. Em outra modalidade, a temperatura é mantida dentro da faixa de $34 \pm 2^\circ\text{C}$ durante pelo menos 20 dias. Em outra modalidade, a temperatura é mantida dentro da faixa de $34 \pm 2^\circ\text{C}$ durante pelo menos 21 dias. Em outra modalidade, a temperatura é mantida dentro da faixa de $34 \pm 2^\circ\text{C}$ durante pelo menos 22 dias. Em outra modalidade, a temperatura é mantida dentro da faixa de $34 \pm 2^\circ\text{C}$ durante pelo menos 23 dias. Em outra modalidade, a temperatura é mantida dentro da faixa de $34 \pm 2^\circ\text{C}$ durante pelo menos 24 dias. Em outra modalidade, a temperatura é mantida dentro da faixa de $34 \pm 2^\circ\text{C}$ durante pelo menos 25 dias. Em outra modalidade, a temperatura é mantida dentro da faixa de $34 \pm 2^\circ\text{C}$ durante pelo menos 26 dias. Em outra modalidade, a temperatura é mantida dentro da faixa de $34 \pm 2^\circ\text{C}$ durante pelo menos 27 dias. Em outra modalidade, a temperatura é mantida dentro da faixa de $34 \pm 2^\circ\text{C}$ durante pelo menos 28 dias. Em outra modalidade, a temperatura é mantida dentro da faixa de $34 \pm 2^\circ\text{C}$ durante até 28 dias. Em outra modalidade, a temperatura é mantida dentro da faixa de $34 \pm 2^\circ\text{C}$ até a densidade celular da cultura ser de cerca de 30×10^5 a cerca de 79×10^5 células por mL de cultura líquida.

Em uma modalidade, o tempo suficiente é um tempo pelo qual a viabilidade das células não cai abaixo de 30%. Em outra modalidade, o tempo suficiente é um tempo pelo qual a viabilidade das células não cai abaixo de 40%. Em outra modalidade, o tempo suficiente é um tempo pelo qual a viabilidade das células não cai abaixo de 50%. Em outra modalidade, o tempo suficiente é um tempo pelo qual a viabilidade das células não cai abaixo de 60%. Em outra modalidade, o tempo suficiente é um tempo pelo qual a viabilidade das células não cai abaixo de 70% ou 80% ou 90% ou 95%.

Em uma modalidade, galactose é adicionada ao meio isento de soro quimicamente definido. Em outra modalidade, isolamento ocorre quan-

do a cultura líquida contém mais de ou igual a cerca de 6 moles de ácido siálico por mol de proteína. Em outra modalidade, isolamento ocorre quando a cultura líquida contém de cerca de 5,2 a cerca de 7,6 moles de ácido siálico por mol de proteína. Em outra modalidade, o isolamento ocorre quando a cultura líquida tem uma densidade celular de cerca de 33×10^5 a cerca de 79×10^5 células por mL. Em outra modalidade, o isolamento ocorre quando a viabilidade celular na cultura líquida não caiu para abaixo de cerca de 37%. Em outra modalidade, o isolamento ocorre quando a endotoxina é menos de ou igual a cerca de 4,8 EU por mL de cultura líquida. Em outra modalidade, o isolamento ocorre quando a biocarga é menos de cerca de 1 unidade de formação de colônia por mL (cfu/ml) de cultura líquida. Em outra modalidade, o isolamento ocorre se pelo menos duas das seguintes condições são reunidas: (i) a cultura líquida contém mais de ou igual a cerca de 6 moles de ácido siálico por mol de proteína, (ii) a cultura líquida tem uma densidade celular de cerca de 33×10^5 a cerca de 79×10^5 células por mL, (iii) a viabilidade celular na cultura líquida não caiu para abaixo de cerca de 37% ou (iv) a quantidade de glicoproteína na cultura é de cerca de 0,46 g/L a cerca de 0,71 g/L.

Em uma modalidade, as células de mamífero são a prole de uma linhagem de célula clonal de Ovário de Hâmster Chinês que produz qualquer combinação de beta polipeptídeos ou moléculas de beta polipeptídeo, em que cada polipeptídeo compreende SEQ ID NO: 11, 12, 13, 14, 15 ou 16, em que as células de Ovário de Hâmster Chinês têm, cada uma, estávelmente integradas em seu genoma, pelo menos 30 cópias de um cassette de expressão compreendendo SEQ ID NO: 3. Em uma modalidade, a cultura líquida compreende uma célula de ou uma célula de prole de uma célula de uma linhagem de célula de produção da invenção.

A invenção proporciona um beta polipeptídeo compreendendo SEQ ID NO: 11, 12, 13, 14, 15 ou 16 obtido através de um método proporcionado pela invenção. A invenção proporciona uma composição compreendendo beta polipeptídeos ou moléculas de beta polipeptídeo, em que cada polipeptídeo compreende SEQ ID NO: 11, 12, 13, 14, 15 ou 16 obtido atra-

vés de um método proporcionado pela invenção. A invenção proporciona um beta polipeptídeo obtido através de um método proporcionado pela invenção.

Células: A invenção proporciona uma célula clonal de Ovário de Hâms-
5 Hâms-ter Chinês compreendendo um ácido nucleico que codifica um beta polipeptídeo ou uma molécula de beta polipeptídeo. A invenção proporciona uma população de célula clonal de Ovário de Hâms-ter Chinês que produz beta polipeptídeos ou moléculas de beta polipeptídeo. Em uma modalidade, o beta polipeptídeo compreende SEQ ID NO: 11, 12, 13, 14, 15 ou 16. A invenção proporciona uma célula clonal de Ovário de Hâms-ter Chinês com-
10 prendendo um ácido nucleico compreendendo um cassete de expressão que codifica a seqüência de aminoácido de SEQ ID NO: 11, 12, 13, 14, 15 ou 16. Em uma modalidade, o cassete de expressão compreende SEQ ID NO: 3. A invenção proporciona uma população de célula clonal de Ovário de Hâms-ter Chinês que produz um beta polipeptídeo ou molécula de beta poli-
15 peptídeo, em que o beta polipeptídeo é expresso a partir de uma seqüência de nucleotídeo derivada de um plasmídeo tendo No. de Acesso ATCC PTA-2104 depositado sob as condições do Tratado de Budapeste em 19 de Junho de 2000 com a American Type Cultura Collection (ATCC), 10801 Uni-
20 versity Blvd., Manassas, VA, 20110.

A invenção proporciona uma população de célula clonal de Ovário de Hâms-ter Chinês que produz um beta polipeptídeo ou moléculas de beta polipeptídeo, cada célula compreendendo 30 ou mais cópias de um cassete de expressão de beta polipeptídeo. A invenção proporciona uma população de célula clonal de Ovário de Hâms-ter Chinês que produz um be-
25 ta polipeptídeo ou moléculas de beta polipeptídeo, cada célula compreendendo 30 ou mais cópias de um cassete de expressão de beta polipeptídeo, em que as 30 ou mais cópias são integradas em um único sítio no genoma de cada célula. A invenção proporciona uma população de célula clonal de
30 Ovário de Hâms-ter Chinês que produz um beta polipeptídeo ou moléculas de beta polipeptídeo, em que um cassete de expressão de beta polipeptídeo é estável durante cerca de 105 passagens. Em uma modalidade, o beta poli-

peptídeo é codificado por um cassete de expressão integrado em um genoma de célula.

A invenção proporciona uma população de célula clonal de Ovário de Hâmster Chinês que produz um beta polipeptídeo, em que pelo menos 5 75% da população de células tem 30 ou mais cópias de um cassete de expressão de beta polipeptídeo por célula, em que as 30 ou mais cópias são integradas em um único sítio no genoma de cada célula dos 75% da população. A invenção proporciona uma população de célula clonal de Ovário de Hâmster Chinês que produz um beta polipeptídeo, em que pelo menos 85% 10 da população de células tem 30 ou mais cópias de um cassete de expressão de beta polipeptídeo por célula, em que as 30 ou mais cópias são integradas em um único sítio no genoma de cada célula dos 85% da população. A invenção proporciona uma população de célula clonal de Ovário de Hâmster Chinês que produz um beta polipeptídeo, em que pelo menos 95% da população 15 de células tem 30 ou mais cópias de um cassete de expressão de beta polipeptídeo por célula, em que as 30 ou mais cópias são integradas em um único sítio no genoma de cada célula dos 95% da população. Em uma modalidade, o cassete de expressão é derivado de um plasmídeo depositado como No. de Acesso ATCC PTA-2104. Em outra modalidade, o cassete de 20 expressão compreende um ácido nucleico tendo a seqüência de SEQ ID NO: 3. Em uma modalidade, a população de célula produz pelo menos cerca de 0,5 gramas do beta polipeptídeo por litro de cultura líquida e em que o beta polipeptídeo tem uma proporção molar de ácido siálico para dímero de beta polipeptídeo ou molécula de beta polipeptídeo de cerca de 5,5 a cerca 25 de 8,5 em uma escala de cultura de 1.000 L ou mais. Em outra modalidade, a população de célula produz pelo menos 5, pelo menos 10 ou pelo menos 20 gramas do beta polipeptídeo por litro de cultura líquida. Em outra modalidade, o beta polipeptídeo tem uma proporção molar de ácido siálico para dímero de beta polipeptídeo ou molécula de beta polipeptídeo de cerca de 5 30 a cerca de 10 em uma escala de cultura de 1.000 L ou mais. Em outra modalidade, a população de célula foi adaptada a um meio isento de soro quimicamente definido. Em outra modalidade, um beta polipeptídeo produzido a

partir da cultura da população de célula tem um coeficiente de extinção de $1,0 \pm 0,05 \text{ AU mL cm}^{-1} \text{ mg}^{-1}$. Em outra modalidade, a população de célula, quando crescida em cultura, produz beta polipeptídeos, em que: (a) cerca de 90% ou cerca de 80% dos beta polipeptídeos compreendem uma seqüência de aminoácido de SEQ ID NO: 4 começando com a metionina no resíduo 27; (b) cerca de 10% ou cerca de 20% dos beta polipeptídeos compreendem a seqüência de aminoácido de SEQ ID NO: 4 começando com a alanina no resíduo número 26; (c) de cerca de 4% a cerca de 8% dos beta polipeptídeos compreendem a seqüência de aminoácido de SEQ ID NO: 4 terminando com a lisina no resíduo número 383; (d) de cerca de 92% a cerca de 96% dos beta polipeptídeos compreendem a seqüência de aminoácido de SEQ ID NO: 4 terminando com a glicina no resíduo número 382; e opcionalmente, (e) cerca de menos de 1% dos beta polipeptídeos compreendem a seqüência de aminoácido de SEQ ID NO: 4 começando com a metionina no resíduo número 25.

A invenção proporciona uma célula de prole de uma população de célula da invenção, em que a célula de prole produz um beta polipeptídeo. Em uma modalidade, a célula de prole é obtida a partir de cultura de uma célula durante pelo menos 5, pelo menos 10, pelo menos 20, pelo menos 40, pelo menos 50, pelo menos 75 gerações. Em outra modalidade, a célula de prole é obtida a partir de cultura de uma célula durante 27 gerações.

A invenção proporciona uma linhagem de célula produzida a partir de qualquer célula proporcionada pela invenção. Em uma modalidade, a linhagem de célula é clonal. Em uma modalidade, a linhagem de célula produz: (a) um beta polipeptídeo tendo uma seqüência de aminoácido de SEQ ID NO: 16 (metionina na posição de aminoácido 27 e glicina na posição de aminoácido 382 de SEQ ID NO: 4); (b) um beta polipeptídeo tendo uma seqüência de aminoácido de SEQ ID NO: 13 (metionina na posição de aminoácido 27 e lisina na posição de aminoácido 383 de SEQ ID NO: 4); (c) um beta polipeptídeo tendo uma seqüência de aminoácido de SEQ ID NO: 15 (alanina na posição de aminoácido 26 e glicina na posição de aminoácido

382 de SEQ ID NO: 4); (d) um beta polipeptídeo tendo uma seqüência de aminoácido de SEQ ID NO: 12 (alanina na posição de aminoácido 26 e lisina na posição de aminoácido 383 de SEQ ID NO: 4); (e) um beta polipeptídeo tendo uma seqüência de aminoácido de SEQ ID NO: 11 (metionina na posição de aminoácido 25 e lisina na posição de aminoácido 383 de SEQ ID NO: 4); (f) um beta polipeptídeo tendo uma seqüência de aminoácido de SEQ ID NO: 14 (metionina na posição de aminoácido 25 e glicina na posição de aminoácido 382 de SEQ ID NO: 4); ou (g) qualquer combinação dos mesmos. Em uma modalidade, a linhagem de célula produz beta polipeptídeos ou moléculas de beta polipeptídeo, em que: (a) cerca de 90% ou cerca de 80% dos beta polipeptídeos compreendem uma seqüência de aminoácido de SEQ ID NO: 4 começando com a metionina no resíduo 27; (b) cerca de 10% ou cerca de 20% dos beta polipeptídeos compreendem a seqüência de aminoácido de SEQ ID NO: 4 começando com a alanina no resíduo número 26; (c) de cerca de 4% a cerca de 8% dos beta polipeptídeos compreendem a seqüência de aminoácido de SEQ ID NO: 4 terminando com a lisina no resíduo número 383; (d) de cerca de 92% a cerca de 96% dos beta polipeptídeos compreendem a seqüência de aminoácido de SEQ ID NO: 4 terminando com a glicina no resíduo número 382; e opcionalmente, (e) cerca de menos de 1% dos beta polipeptídeos compreendem a seqüência de aminoácido de SEQ ID NO: 2 começando com a metionina no resíduo número 25, Em uma modalidade, em que os beta polipeptídeos, os quais são produzidos a partir de cultura a linhagem de célula, têm um coeficiente de extinção de $1,0 \pm 0,05$ AU mL cm⁻¹ mg⁻¹.

A invenção proporciona uma população de célula derivada de uma célula da invenção. Em uma modalidade, as células da população contêm pelo menos uma alteração genética adicional quando comparado com a célula da invenção da qual a população foi derivada e em que as células produzem um beta polipeptídeo. Em outra modalidade, as células da população contêm pelo menos 2, pelo menos 3, pelo menos 4, pelo menos 5, pelo menos 6, pelo menos 7, pelo menos 8, pelo menos 9, pelo menos 10 ou pelo menos 20 alterações genéticas adicionais quando comparado com a

célula da invenção da qual a população foi derivada e em que as células produzem um beta polipeptídeo. Em uma modalidade, a alteração genética compreende pelo menos uma mutação não conservativa no genoma celular ou no cassete de expressão que codifica o beta polipeptídeo. Em outra modalidade, a alteração genética compreende pelo menos um ácido nucleico recombinante adicional dentro da célula. Em outra modalidade, a alteração genética compreende uma mutação do genoma celular. Em outra modalidade, a alteração genética compreende adição de um ácido nucleico a um genoma de célula ou como um ácido transnucleico e em que o ácido nucleico codifica um polipeptídeo anti-apoptótico. Em outra modalidade, o polipeptídeo anti-apoptótico se refere à glicosilação. Em outra modalidade, a alteração genética compreende pelo menos uma mutação do genoma celular ou do cassete de expressão que codifica um beta polipeptídeo. Em outra modalidade, a população de célula, quando crescida em cultura, produz: (a) um beta polipeptídeo tendo uma seqüência de aminoácido de SEQ ID NO: 16 (metionina na posição de aminoácido 27 e glicina na posição de aminoácido 382 de SEQ ID NO: 4); (b) um beta polipeptídeo tendo uma seqüência de aminoácido de SEQ ID NO: 7 (metionina na posição de aminoácido 27 e lisina na posição de aminoácido 383 de SEQ ID NO: 4); (c) um beta polipeptídeo tendo uma seqüência de aminoácido de SEQ ID NO: 15 (alanina na posição de aminoácido 26 e glicina na posição de aminoácido 382 de SEQ ID NO: 4); (d) um beta polipeptídeo tendo uma seqüência de aminoácido de SEQ ID NO: 12 (alanina na posição de aminoácido 26 e lisina na posição de aminoácido 383 de SEQ ID NO: 4); (e) um beta polipeptídeo tendo uma seqüência de aminoácido de SEQ ID NO: 11 (metionina na posição de aminoácido 25 e lisina na posição de aminoácido 383 de SEQ ID NO: 4); (f) um beta polipeptídeo tendo uma seqüência de aminoácido de SEQ ID NO: 14 (metionina na posição de aminoácido 25 e glicina na posição de aminoácido 382 de SEQ ID NO: 4); ou (g) qualquer combinação dos mesmos.

30 Composições: A invenção proporciona uma população isolada de beta polipeptídeos ou moléculas de beta polipeptídeo. Em que cada polipeptídeo compreende a seqüência de SEQ ID NO: 11, 12, 13, 14, 15 ou 16,

tendo uma proporção molar média de grupos ácido siálico para dímero de beta polipeptídeo ou molécula de beta polipeptídeo de cerca de 5 a cerca de 10. Em uma modalidade, a proporção molar média de grupos ácido siálico para dímero de beta polipeptídeo ou molécula de beta polipeptídeo é de cerca de 5,5 a cerca de 8,5. Em uma modalidade, a proporção molar média de grupos ácido siálico para dímero de beta polipeptídeo ou molécula de beta polipeptídeo é de cerca de 5,2 a cerca de 7,6. A invenção proporciona uma população isolada de beta polipeptídeos, em que cada polipeptídeo compreende a seqüência de SEQ ID NO: 11, 12, 13, 14, 15 ou 16, tendo uma proporção molar média de grupos ácido siálico para dímero de beta polipeptídeo ou molécula de beta polipeptídeo de cerca de 6. A invenção proporciona uma população isolada de beta polipeptídeos, em que cada polipeptídeo compreende a seqüência de SEQ ID NO: 11, 12, 13, 14, 15 ou 16 e em que mais de 95% dos polipeptídeos são transformados em dímeros. Em uma modalidade, mais de 98%, mais de 99% ou mais de 99,5% dos polipeptídeos são transformados em dímeros. Em outra modalidade, de cerca de 95% a cerca de 99,5% dos polipeptídeos são transformados em dímeros e cerca de 0,5% a cerca de 5% dos polipeptídeos são transformados em tetrâmeros ou espécies de elevado peso molecular. Em outra modalidade, cerca de 98,6% dos polipeptídeos são transformados em dímeros e cerca de 1,2% dos polipeptídeos são transformados em tetrâmeros ou espécies de elevado peso molecular e cerca de menos de 0,7 % dos polipeptídeos são monômeros. Em outra modalidade, cerca de 95% dos polipeptídeos são transformados em dímeros e cerca de 4% dos polipeptídeos são transformados em tetrâmeros ou espécies de elevado peso molecular e cerca de 1% dos polipeptídeos são a população isolada de dímeros de beta polipeptídeo, em que cada monômero de polipeptídeo compreende a seqüência de SEQ ID NO: 11, 12, 13, 14, 15 ou 16. Em uma modalidade, a população é substancialmente isenta de monômero de beta polipeptídeo. Em outra modalidade, a população é substancialmente isenta de tetrâmero de beta polipeptídeo. A invenção proporciona uma população isolada de monômeros de beta polipeptídeos substancialmente isenta de dímero de tetrâmero de beta polipeptídeos. Em

uma modalidade, cada monômero de cada dímero de beta polipeptídeo compreende a seqüência de SEQ ID NO: 11, 12, 13, 14, 15 ou 16 e tem pelo menos 2,5 grupos ácido siálico.

A invenção proporciona uma população isolada de beta polipeptídeos, em que cada polipeptídeo compreende a seqüência de SEQ ID NO: 11, 12, 13, 14, 15 ou 16, tendo uma potência de cerca de 70% a cerca de 130% em um ensaio de ligação a B7, comparado com um padrão de CTLA4-Ig, em que o ensaio compreende medição através de ressonância de plasmônio em superfície. A invenção proporciona uma população isolada de beta polipeptídeos, em que cada polipeptídeo compreende a seqüência de SEQ ID NO: 11, 12, 13, 14, 15 ou 16, tendo uma potência de cerca de 50% a cerca de 150% em um ensaio de inibição de IL-2 em célula humana, comparado com um padrão. A invenção proporciona uma população purificada de tetrâmeros de beta polipeptídeo ou espécies de elevado peso molecular, em que cada monômero de polipeptídeo compreende a seqüência de SEQ ID NO: 11, 12, 13, 14, 15 ou 16, a população sendo substancialmente isenta de dímeros de beta polipeptídeo e opcionalmente em que a população compreende uma quantidade que é mais de cerca de 100 gramas. A invenção proporciona uma população purificada de tetrâmeros de beta polipeptídeo ou espécies de elevado peso molecular, em que cada monômero de polipeptídeo compreende a seqüência de SEQ ID NO: 11, 12, 13, 14, 15 ou 16, a população sendo substancialmente isenta de monômero de beta polipeptídeo e opcionalmente em que a população compreende uma quantidade que é mais de cerca de 100 gramas. Em uma modalidade, cada molécula tetramérica compreende dois pares de beta polipeptídeos, em que cada monômero de polipeptídeo compreende a seqüência de SEQ ID NO: 11, 12, 13, 14, 15 ou 16 e em que cada membro do par de polipeptídeos é covalentemente ligado ao outro membro e em que os dois pares de polipeptídeos são não covalentemente associados um ao outro. Em uma modalidade, cada molécula tetramérica é capaz de ligação a um CD80 ou CD86. Em uma modalidade, cada molécula tetramérica tem pelo menos uma avidéz 2 vezes maior pelo CD80 ou CD86 quando comparado com um dímero de beta poli-

peptídeo, em que cada monômero de polipeptídeo do dímero compreende a seqüência de SEQ ID NO: 11, 12, 13, 14, 15 ou 16. Em outra modalidade, cada molécula tetramérica tem pelo menos uma avidéz 2 vezes maior pelo CD80 ou CD86 quando comparado com a tetrâmero de molécula de CTLA4-Ig compreendendo a seqüência de SEQ ID NO: 2. Em outra modalidade, cada molécula tetramérica tem pelo menos uma inibição 2 vezes maior de proliferação ou ativação de células T quando comparado com um dímero de beta polipeptídeo, em que cada monômero de polipeptídeo do dímero compreende a seqüência de SEQ ID NO: 11, 12, 13, 14, 15 ou 16. Em outra modalidade, cada molécula tetramérica tem pelo menos uma inibição 2 vezes maior de proliferação ou ativação de células T quando comparado com a tetrâmero de molécula de CTLA4-Ig compreendendo a seqüência de SEQ ID NO: 2.

A invenção proporciona uma composição isolada compreendendo beta polipeptídeos ou moléculas de beta polipeptídeo, em que cada polipeptídeo compreende a seqüência de SEQ ID NO: 11, 12, 13, 14, 15 ou 16 e em que a composição compreende isoformas dominantes visualizáveis sobre um gel de focalização isoeletrica o qual tem um ponto isoeletrico, pI , menos de ou igual a 5,5 conforme determinado através de focalização isoeletrica. Em uma modalidade, o pI aumenta após tratamento com neuraminidase. Em uma modalidade, pelo menos 40% dos beta polipeptídeos ou moléculas de beta polipeptídeo exibem um ponto isoeletrico de menos de ou igual a cerca de 5,3 conforme determinado através de focalização isoeletrica. Em uma modalidade, pelo menos 70% dos beta polipeptídeos ou moléculas de beta polipeptídeo exibem um ponto isoeletrico de menos de ou igual a cerca de 5,3 conforme determinado através de focalização isoeletrica. Em uma modalidade, pelo menos 90% dos beta polipeptídeos ou moléculas de beta polipeptídeo exibem um ponto isoeletrico de menos de ou igual a cerca de 5,3 conforme determinado através de focalização isoeletrica. A invenção proporciona uma população isolada de beta polipeptídeos ou moléculas de beta polipeptídeo tendo um pI de cerca de $2,0 \pm 0,2$ a cerca de $5,2 \pm 0,2$. A invenção proporciona uma população isolada de beta polipeptídeos ou mo-

lécúlas de beta polipeptídeo tendo um pI de cerca de $4,5 \pm 0,2$ a cerca de $5,2 \pm 0,2$. A invenção proporciona uma população isolada de beta polipeptídeos ou moléculas de beta polipeptídeo tendo um pI de cerca de $4,7 \pm 0,2$ a cerca de $5,1 \pm 0,2$. A invenção proporciona um método para preparo de uma

5 composição, a composição compreendendo beta polipeptídeos ou moléculas de beta polipeptídeo com um pI de cerca de $2,0 \pm 0,2$ a cerca de $5,2 \pm 0,2$, em que cada polipeptídeo compreende a seqüência de SEQ ID NO: 11, 12, 13, 14, 15 ou 16, o método compreendendo: (a) sujeição de uma mistura de beta polipeptídeos à eletroforese em gel de focalização isoelétrica, em que

10 uma única banda sobre o gel representa uma população de beta polipeptídeos ou moléculas de beta polipeptídeo com um pI em particular e (b) isolamento da população de beta polipeptídeos ou moléculas de beta polipeptídeo tendo um pI de cerca de $2,0 \pm 0,2$ a cerca de $5,2 \pm 0,2$ de modo a preparar a composição.

15 A invenção proporciona uma composição isolada compreendendo beta polipeptídeos ou moléculas de beta polipeptídeo, em que cada polipeptídeo compreende a seqüência de SEQ ID NO: 11, 12, 13, 14, 15 ou 16 e em que os polipeptídeos são caracterizados por uma proporção molar média de GlcNAc por mol de dímero de beta polipeptídeo ou molécula de beta polipeptídeo de cerca de 24 a cerca de 28. A invenção proporciona uma composição isolada compreendendo beta polipeptídeos, em que cada polipeptídeo

20 compreende a seqüência de SEQ ID NO: 11, 12, 13, 14, 15 ou 16 e em que os polipeptídeos são caracterizados por uma proporção molar média de GalNAc por mol de dímero de beta polipeptídeo ou molécula de beta polipeptídeo de cerca de 2,7 a cerca de 3,6. A invenção proporciona uma composição isolada compreendendo beta polipeptídeos, em que cada polipeptídeo

25 compreende a seqüência de SEQ ID NO: 11, 12, 13, 14, 15 ou 16 e em que os polipeptídeos são caracterizados por uma proporção molar média de galactose por mol de dímero de beta polipeptídeo ou molécula de beta polipeptídeo de cerca de 11 a cerca de 13. A invenção proporciona uma composição isolada compreendendo beta polipeptídeos, em que cada polipeptídeo

30 compreende a seqüência de SEQ ID NO: 11, 12, 13, 14, 15 ou 16 e em que

os polipeptídeos são caracterizados por uma proporção molar média de fucose por mol de dímero de beta polipeptídeo ou molécula de beta polipeptídeo de cerca de 6,4 a cerca de 7,0. A invenção proporciona uma composição isolada compreendendo beta polipeptídeos, em que cada polipeptídeo

5 compreende a seqüência de SEQ ID NO: 11, 12, 13, 14, 15 ou 16 e em que os polipeptídeos são caracterizados por uma proporção molar média de manose por mol de dímero de beta polipeptídeo ou molécula de beta polipeptídeo de cerca de 14 a cerca de 16. A invenção proporciona uma composição isolada compreendendo beta polipeptídeos, em que cada polipeptídeo

10 compreende a seqüência de SEQ ID NO: 11, 12, 13, 14, 15 ou 16 e em que as moléculas são caracterizadas por uma proporção molar média de ácido siálico por mol de dímero de beta polipeptídeo ou molécula de beta polipeptídeo de cerca de 5,5 a cerca de 8,5. A invenção proporciona uma composição isolada compreendendo beta polipeptídeos, em que cada polipeptídeo

15 compreende a seqüência de SEQ ID NO: 11, 12, 13, 14, 15 ou 16 e em que as moléculas são caracterizadas por uma proporção molar média de ácido siálico por mol de dímero de beta polipeptídeo ou molécula de beta polipeptídeo de cerca de 5 a cerca de 10. A invenção proporciona uma composição isolada compreendendo beta polipeptídeos, em que cada polipeptídeo

20 compreende a seqüência de SEQ ID NO: 11, 12, 13, 14, 15 ou 16 e em que os polipeptídeos são caracterizados por: (a) uma proporção molar média de GlcNAc por mol de dímero de beta polipeptídeo ou molécula de beta polipeptídeo de cerca de 24 a cerca de 28; e (b) uma proporção molar média de ácido siálico por mol de dímero de beta polipeptídeo ou molécula de beta polipeptídeo de cerca de 5,5 a cerca de 8,5. A invenção proporciona uma

25 composição isolada compreendendo beta polipeptídeos, em que cada polipeptídeo compreende a seqüência de SEQ ID NO: 11, 12, 13, 14, 15 ou 16 e em que as moléculas são caracterizadas por: (a) uma proporção molar média de GlcNAc por mol de dímero de beta polipeptídeo ou molécula de beta polipeptídeo de cerca de 24 a cerca de 28; (b) uma proporção molar média de GalNAc por mol de dímero de beta polipeptídeo ou molécula de beta polipeptídeo de cerca de 2,7 a cerca de 3,6; e (c) uma proporção molar média de á-

30

cido siálico por mol de dímero de beta polipeptídeo ou molécula de beta polipeptídeo de cerca de 5,5 a cerca de 8,5. A invenção proporciona uma composição isolada compreendendo beta polipeptídeos, em que cada polipeptídeo compreende a seqüência de SEQ ID NO: 11, 12, 13, 14, 15 ou 16 e em que as moléculas são caracterizadas por: (a) uma proporção molar média de GlcNAc por mol de dímero de beta polipeptídeo ou molécula de beta polipeptídeo de cerca de 24 a cerca de 28; (b) uma proporção molar média de GalNAc por mol de dímero de beta polipeptídeo ou molécula de beta polipeptídeo de cerca de 2,7 a cerca de 3,6; (c) uma proporção molar média de galactose por mol de dímero de beta polipeptídeo ou molécula de beta polipeptídeo de cerca de 11 a cerca de 13; e (d) uma proporção molar média de ácido siálico por mol de dímero de beta polipeptídeo ou molécula de beta polipeptídeo de cerca de 5,5 a cerca de 8,5. A invenção proporciona uma composição isolada compreendendo beta polipeptídeos, em que cada polipeptídeo compreende a seqüência de SEQ ID NO: 11, 12, 13, 14, 15 ou 16 e em que os polipeptídeos são caracterizados por: (a) uma proporção molar média de GlcNAc por mol de dímero de beta polipeptídeo ou molécula de beta polipeptídeo de cerca de 24 a cerca de 28; (b) uma proporção molar média de GalNAc por mol de dímero de beta polipeptídeo ou molécula de beta polipeptídeo de cerca de 2,7 a cerca de 3,6; (c) uma proporção molar média de galactose por mol de dímero de beta polipeptídeo ou molécula de beta polipeptídeo de cerca de 11 a cerca de 13; (d) uma proporção molar média de fucose por mol de dímero de beta polipeptídeo ou molécula de beta polipeptídeo de cerca de 6,4 a cerca de 7,0; e (e) uma proporção molar média de ácido siálico por mol de dímero de beta polipeptídeo ou molécula de beta polipeptídeo de cerca de 5,5 a cerca de 8,5. A invenção proporciona uma composição isolada compreendendo beta polipeptídeos, em que cada polipeptídeo compreende a seqüência de SEQ ID NO: 11, 12, 13, 14, 15 ou 16 e em que os polipeptídeos são caracterizados por: (a) uma proporção molar média de GlcNAc por mol de dímero de beta polipeptídeo ou molécula de beta polipeptídeo de cerca de 24 a cerca de 28; (b) uma proporção molar média de GalNAc por mol de dímero de beta polipeptídeo ou molécula de

beta polipeptídeo de cerca de 2,7 a cerca de 3,6; (c) uma proporção molar média de galactose por mol de dímero de beta polipeptídeo ou molécula de beta polipeptídeo de cerca de 11 a cerca de 13; (d) uma proporção molar média de fucose por mol de dímero de beta polipeptídeo ou molécula de beta polipeptídeo de cerca de 6,4 a cerca de 7,0; (e) uma proporção molar média de manose por mol de dímero de beta polipeptídeo ou molécula de beta polipeptídeo de cerca de 14 a cerca de 16; e (f) uma proporção molar média de ácido siálico por mol de dímero de beta polipeptídeo ou molécula de beta polipeptídeo de cerca de 5,5 a cerca de 8,5. A invenção proporciona uma composição isolada compreendendo beta polipeptídeos, em que cada polipeptídeo compreende a seqüência de SEQ ID NO: 11, 12, 13, 14, 15 ou 16 e em que os polipeptídeos são caracterizados por: (a) uma proporção molar média de galactose por mol de dímero de beta polipeptídeo ou molécula de beta polipeptídeo de cerca de 8 a cerca de 17; (b) uma proporção molar média de ácido siálico por mol de dímero de beta polipeptídeo ou molécula de beta polipeptídeo de cerca de 5,5 a cerca de 8,5; e (c) um perfil de carboidrato substancialmente o mesmo conforme na Figura 8. A invenção proporciona uma composição isolada compreendendo beta polipeptídeos ou moléculas de beta polipeptídeo, em que cada polipeptídeo compreende a seqüência de SEQ ID NO: 11, 12, 13, 14, 15 ou 16 e em que os polipeptídeos são caracterizados por: (a) uma proporção molar média de galactose por mol de dímero de beta polipeptídeo ou molécula de beta polipeptídeo de cerca de 8 a cerca de 17; (b) uma proporção molar média de ácido siálico por mol de dímero de beta polipeptídeo ou molécula de beta polipeptídeo de cerca de 5,5 a cerca de 8,5; (c) um perfil de carboidrato substancialmente o mesmo conforme na Figura 8; e (d) um teor de tetrâmero de beta polipeptídeo de menos de cerca de 5%. A invenção proporciona uma composição isolada compreendendo beta polipeptídeos ou moléculas de beta polipeptídeo, em que cada polipeptídeo compreende a seqüência de SEQ ID NO: 11, 12, 13, 14, 15 ou 16 e em que os polipeptídeos são caracterizados por: (a) uma proporção molar média de galactose por mol de dímero de beta polipeptídeo ou molécula de beta polipeptídeo de cerca de 11 a cerca de 13; e (b) uma pro-

porção molar média de ácido siálico por mol de dímero de beta polipeptídeo ou molécula de beta polipeptídeo de cerca de 5,5 a cerca de 8,5. A invenção proporciona uma composição isolada compreendendo beta polipeptídeos, em que cada polipeptídeo compreende a seqüência de SEQ ID NO: 11, 12, 13, 14, 15 ou 16 e em que os polipeptídeos são caracterizados por: (a) uma proporção molar média de galactose por mol de dímero de beta polipeptídeo ou molécula de beta polipeptídeo de cerca de 11 a cerca de 13; (b) uma proporção molar média de ácido siálico por mol de dímero de beta polipeptídeo ou molécula de beta polipeptídeo de cerca de 5,5 a cerca de 8,5; e (c) um teor de tetrâmero de beta polipeptídeo de menos de cerca de 5%. A invenção proporciona uma composição isolada compreendendo beta polipeptídeos, em que cada polipeptídeo compreende a seqüência de SEQ ID NO: 11, 12, 13, 14, 15 ou 16 e em que polipeptídeos são caracterizadas por: (a) uma proporção molar média de ácido siálico por mol de dímero de beta polipeptídeo ou molécula de beta polipeptídeo de cerca de 5,5 a cerca de 8,5; e (b) um perfil de carboidrato substancialmente o mesmo conforme na Figura 8. A invenção proporciona uma composição isolada compreendendo beta polipeptídeos, em que cada polipeptídeo compreende a seqüência de SEQ ID NO: 11, 12, 13, 14, 15 ou 16 e em que os polipeptídeos são caracterizados por: (a) uma proporção molar média de galactose por mol de dímero de beta polipeptídeo ou molécula de beta polipeptídeo de cerca de 11 a cerca de 13; e (b) um perfil de carboidrato substancialmente o mesmo conforme na Figura 8. A invenção proporciona uma composição isolada compreendendo beta polipeptídeos, em que cada polipeptídeo compreende a seqüência de SEQ ID NO: 11, 12, 13, 14, 15 ou 16 e em que polipeptídeos são caracterizadas por: (a) uma proporção molar média de ácido siálico por mol de dímero de beta polipeptídeo ou molécula de beta polipeptídeo de cerca de 5,5 a cerca de 8,5; e (b) um teor de tetrâmero de beta polipeptídeo ou espécies de elevado peso molecular de menos de cerca de 5%. A invenção proporciona uma composição isolada compreendendo beta polipeptídeos ou moléculas de beta polipeptídeo, em que cada polipeptídeo compreende a seqüência de SEQ ID NO: 11, 12, 13, 14, 15 ou 16 e em que os polipeptídeos são caracte-

rizados por: (a) uma proporção molar média de galactose por mol de dímero de beta polipeptídeo ou molécula de beta polipeptídeo de cerca de 11 a cerca de 13; e (b) um teor de tetrâmero de beta polipeptídeo ou espécies de elevado peso molecular de menos de cerca de 5%.

5 A invenção proporciona uma composição isolada compreendendo beta polipeptídeos ou moléculas de beta polipeptídeo, em que cada polipeptídeo compreende a seqüência de SEQ ID NO: 11, 12, 13, 14, 15 ou 16 e em que os polipeptídeos exibem um perfil de carboidrato substancialmente o mesmo conforme na Figura 8. A invenção proporciona uma composição iso-

10 lada compreendendo beta polipeptídeos, em que cada polipeptídeo compreende a seqüência de SEQ ID NO: 11, 12, 13, 14, 15 ou 16 e em que os polipeptídeos exibem um perfil de carboidrato dos Domínios I - IV, em que o Domínio I compreende picos os quais representam oligossacarídeos a-

15 sialilados, o Domínio II compreende picos os quais representam oligossacarídeos mono-sialilados, o Domínio III compreende picos os quais representam oligossacarídeos di-sialilados e Domínio IV compreende picos os quais representam oligossacarídeos tri-sialilados. Em uma modalidade, a diferença nos tempos de retenção de oligossacarídeos N-ligados entre um primeiro pico no Domínio I e um pico principal no Domínio II é de cerca de 11 a cerca

20 de 13 minutos. Em uma modalidade, a soma dos Domínios III e IV compreende cerca de 25% a cerca de 36% do perfil total de carboidrato.

A invenção proporciona uma composição isolada compreendendo dímeros de beta polipeptídeo ou moléculas de beta polipeptídeo, em que cada monômero de polipeptídeo compreende a seqüência de SEQ ID NO:

25 11, 12, 13, 14, 15 ou 16 e em que pelo menos cerca de 0,5 % das moléculas são cisteinilados. A invenção proporciona uma população isolada de beta polipeptídeos, em que cada polipeptídeo compreende a seqüência de SEQ ID NO: 11, 12, 13, 14, 15 ou 16 e em que a população exibe um perfil de espectrometria de massa conforme mostrado na Figura 11. A invenção pro-

30 porciona uma população isolada de beta polipeptídeos ou moléculas de beta polipeptídeo, em que cada polipeptídeo compreende a seqüência de SEQ ID NO: 11, 12, 13, 14, 15 ou 16, tendo uma proporção molar média de grupos

ácido siálico para dímero de beta polipeptídeo ou molécula de beta polipeptídeo de cerca de 5,5 a cerca de 8,5, em que o dímero de beta polipeptídeo ou moléculas de beta polipeptídeo são produzidas a partir de células de uma linhagem de célula de produção. A invenção proporciona uma composição isolada compreendendo beta polipeptídeos, em que cada polipeptídeo compreende a seqüência de SEQ ID NO: 11, 12, 13, 14, 15 ou 16, em que os polipeptídeos são glicosilados em um resíduo de aminoácido asparagina na posição 102 de SEQ ID NO: 4, um resíduo de aminoácido asparagina na posição 134 de SEQ ID NO: 4, um resíduo de aminoácido asparagina na posição 233 de SEQ ID NO: 4. A invenção proporciona uma composição isolada compreendendo beta polipeptídeos, em que cada polipeptídeo compreende a seqüência de SEQ ID NO: 11, 12, 13, 14, 15 ou 16 e em que as moléculas são caracterizadas por: (a) uma proporção molar média de GlcNAc por mol de dímero de beta polipeptídeo ou molécula de beta polipeptídeo de cerca de 24 a cerca de 28; (b) uma proporção molar média de GalNAc por mol de dímero de beta polipeptídeo ou molécula de beta polipeptídeo de cerca de 2,7 a cerca de 3,6; (c) uma proporção molar média de galactose por mol de dímero de beta polipeptídeo ou molécula de beta polipeptídeo de cerca de 11 a cerca de 13; (d) uma proporção molar média de fucose por mol de dímero de beta polipeptídeo ou molécula de beta polipeptídeo de cerca de 6,4 a cerca de 7,0; (e) uma proporção molar média de manose por mol de dímero de beta polipeptídeo ou molécula de beta polipeptídeo de cerca de 14 a cerca de 16; (f) uma proporção molar média de ácido siálico por mol de dímero de beta polipeptídeo ou molécula de beta polipeptídeo de cerca de 5,5 a cerca de 8,5; (g) um *pI*, conforme determinado a partir de visualização sobre um gel de focalização isoeletrica, em uma faixa de cerca de 2,4 ± 0,2 a cerca de 5,2 ± 0,2; (h) MCP-1 de menos de ou igual a 5 ppm; (i) menos de 5% de tetrâmero ou espécies de elevado peso molecular; (j) menos de beta polipeptídeo 1% de monômero; e (k) beta polipeptídeos ou moléculas de beta polipeptídeo da população tendo uma seqüência de aminoácido pelo menos 95% idêntica a qualquer uma de SEQ ID NOS: 4, 11, 12, 13, 14, 15 ou 16, em que os beta polipeptídeos dentro da população são

capazes de ligação a CD80 e CD86. A invenção proporciona uma população isolada de beta polipeptídeos, em que cada polipeptídeo compreende a sequência de SEQ ID NO: 11, 12, 13, 14, 15 ou 16 e em que a população de moléculas é caracterizada por: (a) uma proporção molar média de GlcNAc por mol de dímero de beta polipeptídeo ou molécula de beta polipeptídeo de
5 cerca de 24 a cerca de 28; (b) uma proporção molar média de GalNAc por mol de dímero de beta polipeptídeo ou molécula de beta polipeptídeo de cerca de 2,7 a cerca de 3,6; (c) uma proporção molar média de galactose por mol de dímero de beta polipeptídeo ou molécula de beta polipeptídeo de
10 cerca de 11 a cerca de 13; (d) uma proporção molar média de fucose por mol de dímero de beta polipeptídeo ou molécula de beta polipeptídeo de cerca de 6,4 a cerca de 7,0; (e) uma proporção molar média de manose por mol de dímero de beta polipeptídeo ou molécula de beta polipeptídeo de
15 cerca de 14 a cerca de 16; (f) uma proporção molar média de ácido siálico por mol de dímero de beta polipeptídeo ou molécula de beta polipeptídeo de cerca de 5,5 a cerca de 8,5; (g) um pI, conforme determinado a partir de visualização sobre um gel de focalização isoeletrica, em uma faixa de cerca de 2,4 ± 0,2 a cerca de 5,2 ± 0,2; (h) MCP-1 de menos de ou igual a 5 ppm; (i) menos de 5% de tetrâmero de beta polipeptídeo ou espécies de elevado
20 peso molecular; (j) menos de 1% de monômero; e (k) beta polipeptídeos da população tendo um aminoácido pelo menos 95% idêntica a qualquer uma de SEQ ID NOS: 4, 11, 12, 13, 14, 15 ou 16, em que moléculas de beta polipeptídeo dentro da população são capazes de ligação a CD80 e CD86; ou equivalentes farmacêuticos dos mesmos.

25 A invenção proporciona uma composição compreendendo uma quantidade eficaz do beta polipeptídeo da invenção e um veículo farmacêuticamente aceitável. A invenção proporciona uma composição compreendendo excipientes conforme descrito no Pedido U.S. No. 60/752.150; depositado em 20 de Dezembro de 2005. Em uma modalidade, a composição inclui mo-
30 léculas de beta polipeptídeo. Em uma modalidade, a composição ainda compreende um diluente, adjuvante ou veículo farmacêuticamente aceitável. Em uma modalidade, a composição ainda compreende sacarose, monohi-

drato monobásico de fosfato de sódio, cloreto de sódio, hidróxido de sódio, ácido clorídrico e água estéril. Em outra modalidade, a composição compreende sacarose, poloxâmero, monohidrato monobásico de fosfato de sódio, fosfato de sódio anídrico dibásico, cloreto de sódio, hidróxido de sódio e água estéril. Em uma modalidade, a composição é liofilizada. A invenção proporciona uma composição liofilizada compreendendo uma quantidade eficaz dos beta polipeptídeos da invenção, sacarose, monohidrato monobásico de fosfato de sódio, cloreto de sódio, hidróxido de sódio e ácido clorídrico.

Formulações e kits: A invenção proporciona uma mistura liofilizada de beta polipeptídeo, em que cada polipeptídeo compreende a sequência de SEQ ID NO: 11, 12, 13, 14, 15 ou 16, compreendendo pelo menos 95% de dímero de beta polipeptídeo e não mais do que 5% de tetrâmero de beta polipeptídeo (espécies de elevado peso molecular). Em uma modalidade, a mistura compreende pelo menos 98% de dímero de beta polipeptídeo e não mais do que 2% de tetrâmero de beta polipeptídeo (espécies de elevado peso molecular). Em uma modalidade, a mistura compreende pelo menos 99% de dímero de beta polipeptídeo e não mais do que 1% de tetrâmero de beta polipeptídeo (espécies de elevado peso molecular). Em uma modalidade, a mistura compreende pelo menos 5 moles de ácido siálico por mol de dímero de beta polipeptídeo ou molécula de beta polipeptídeo. Em uma modalidade, a mistura compreende cerca de 24 a cerca de 28 moles de GlcNAc por mol de dímero de beta polipeptídeo (espécies de elevado peso molecular). Em uma modalidade, a mistura compreende cerca de 2,7 a cerca de 3,6 moles de GalNAc por mol de dímero de beta polipeptídeo ou molécula de beta polipeptídeo. Em uma modalidade, a mistura compreende cerca de 11 a cerca de 13 moles de galactose por mol de dímero de beta polipeptídeo ou molécula de beta polipeptídeo. Em uma modalidade, a mistura compreende cerca de 6,4 a cerca de 7,0 moles de fucose por mol de dímero de beta polipeptídeo ou molécula de beta polipeptídeo. Em uma modalidade, a mistura compreende cerca de 14 a cerca de 16 moles de manose por mol de dímero de beta polipeptídeo ou molécula de beta polipeptídeo. A invenção também proporciona um kit farmacêutico compreendendo: (a) um recipiente

contendo a mistura liofilizada de beta polipeptídeo da invenção e (b) instruções para reconstituição da mistura liofilizada de beta polipeptídeo em solução para injeção.

Métodos ilustrativos de tratamento: Um método para inibição de proliferação de células T, ativação ou ambos, o método compreendendo contato de uma célula T com uma quantidade eficaz de uma composição de beta polipeptídeo da invenção. A invenção proporciona um método para inibição de uma resposta imune em um indivíduo, o método compreendendo administração, a um indivíduo que precisa do mesmo, de uma quantidade eficaz de uma composição de beta polipeptídeo da invenção. A invenção proporciona um método para tratamento de um distúrbio imune em um indivíduo, o método compreendendo administração, a um indivíduo que precisa do mesmo, de uma quantidade eficaz de uma composição de beta polipeptídeo da invenção. A invenção proporciona um método para indução de tolerância imune a um antígeno em um indivíduo, o método compreendendo administração, a um indivíduo que precisa do mesmo, de uma quantidade eficaz de uma composição de beta polipeptídeo da invenção. A invenção proporciona um método para tratamento de inflamação em um indivíduo, o método compreendendo administração, a um indivíduo que precisa do mesmo, de uma quantidade eficaz de uma composição de beta polipeptídeo da invenção. A invenção proporciona um método para tratamento de artrite reumatóide compreendendo administração, a um indivíduo que precisa do mesmo, de uma quantidade eficaz de uma composição de beta polipeptídeo da invenção. A invenção proporciona um método para tratamento de psoríase em um indivíduo, o método compreendendo administração, a um indivíduo que precisa do mesmo, de uma quantidade eficaz de uma composição de beta polipeptídeo da invenção. A invenção proporciona um método para tratamento de lupus em um indivíduo, o método compreendendo administração, a um indivíduo que precisa do mesmo, de uma quantidade eficaz de uma composição de beta polipeptídeo da invenção. A invenção proporciona um método para tratamento de ou prevenção de uma alergia em um indivíduo, o método compreendendo administração, a um indivíduo que precisa

do mesmo, de uma quantidade eficaz de uma composição de beta polipeptídeo da invenção. A invenção proporciona um método para tratamento de ou prevenção de doença enxerto versus hospedeiro em um indivíduo, o método compreendendo administração, a um indivíduo que precisa do mesmo, de uma quantidade eficaz de uma composição de beta polipeptídeo da invenção. A invenção proporciona um método para tratamento de ou prevenção de rejeição de um órgão transplantado em um indivíduo, o método compreendendo administração, a um indivíduo que precisa do mesmo, de uma quantidade eficaz de uma composição de beta polipeptídeo da invenção. A invenção proporciona um método para tratamento de ou prevenção de rejeição a tecido transplantado em um indivíduo, o método compreendendo administração, a um indivíduo que precisa do mesmo, de uma quantidade eficaz de a composição uma composição de beta polipeptídeo da invenção. A invenção proporciona um método para tratamento de ou prevenção de rejeição de uma célula transplantada em um indivíduo, o método compreendendo administração, a um indivíduo que precisa do mesmo, de uma quantidade eficaz de uma composição de beta polipeptídeo da invenção. Em uma modalidade, a célula transplantada é uma célula de medula óssea. Em outra modalidade, a célula transplantada é uma célula de ilhota. Em outra modalidade, a célula transplantada é uma célula pancreática que produz insulina. A invenção proporciona um método para tratamento de esclerose múltipla em um indivíduo, o método compreendendo administração, a um indivíduo que precisa do mesmo, de uma quantidade eficaz de uma composição de beta polipeptídeo da invenção. A invenção proporciona um método para tratamento de Doença de Crohn em um indivíduo, o método compreendendo administração, a um indivíduo que precisa do mesmo, de uma quantidade eficaz de uma composição de beta polipeptídeo da invenção. A invenção proporciona um método para tratamento de diabetes do tipo I em um indivíduo, o método compreendendo administração, a um indivíduo que precisa do mesmo, de uma quantidade eficaz de uma composição de beta polipeptídeo da invenção. A invenção proporciona um método para tratamento de doença inflamatória do intestino em um indivíduo, o método compreendendo

administração, a um indivíduo que precisa do mesmo, de uma quantidade eficaz de uma composição de beta polipeptídeo da invenção. A invenção proporciona um método para tratamento de ooforite em um indivíduo, o método compreendendo administração, a um indivíduo que precisa do mesmo, de uma quantidade eficaz de uma composição de beta polipeptídeo da invenção. A invenção proporciona um método para tratamento de glomerulonefrite em um indivíduo, o método compreendendo administração, a um indivíduo que precisa do mesmo, de uma quantidade eficaz de uma composição de beta polipeptídeo da invenção. A invenção proporciona um método para tratamento de encefalomielite alérgica em um indivíduo, o método compreendendo administração, a um indivíduo que precisa do mesmo, de uma quantidade eficaz de uma composição de beta polipeptídeo da invenção. A invenção proporciona um método para tratamento de miastenia gravis em um indivíduo, o método compreendendo administração, a um indivíduo que precisa do mesmo, de uma quantidade eficaz de uma composição de beta polipeptídeo da invenção.

A invenção proporciona o uso de uma população de beta polipeptídeos ou moléculas de beta polipeptídeo, em que cada polipeptídeo compreende a seqüência de SEQ ID NO: 11, 12, 13, 14, 15 ou 16 e em que a população tem uma proporção molar média de grupos ácido siálico para dímero de beta polipeptídeo ou molécula de beta polipeptídeo de cerca de 5 a cerca de 10 na fabricação de um medicamento para o tratamento terapêutico e/ou profilático de um distúrbio imune. A invenção proporciona o uso de uma população de beta polipeptídeos ou moléculas de beta polipeptídeo, em que cada polipeptídeo compreende a seqüência de SEQ ID NO11, 12, 13, 14, 15 ou 16 e em que a população tem uma proporção molar média de grupos ácido siálico para dímero de beta polipeptídeo ou molécula de beta polipeptídeo de cerca de 5 a cerca de 10 na fabricação de um agente anti-artrite reumatóide em uma embalagem junto com instruções para seu uso no tratamento de artrite reumatóide. Em uma modalidade, a população tem uma proporção molar média de grupos ácido siálico para dímero de beta polipeptídeo ou molécula de beta polipeptídeo de cerca de 5,5 a cerca de 8,5.

Terapias combinadas ilustrativas: A invenção proporciona um método para inibição de proliferação de células T, ativação ou ambos, o método compreendendo contato de uma célula T com uma quantidade eficaz de uma composição de beta polipeptídeo da invenção em combinação com metotrexato. A invenção proporciona um método para inibição de uma resposta imune em um indivíduo, o método compreendendo administração, a um indivíduo que precisa do mesmo, de uma quantidade eficaz de uma composição de beta polipeptídeo da invenção em combinação com metotrexato. A invenção proporciona um método para indução de tolerância imune a um antígeno em um indivíduo, o método compreendendo administração, a um indivíduo que precisa do mesmo, de uma quantidade eficaz de uma composição de beta polipeptídeo da invenção em combinação com metotrexato.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

As **FIGS. 1A-1B** apresentam a seqüência de nucleotídeo (SEQ ID NO: 1) de uma porção de um cassete de expressão para a molécula de CTLA4-Ig. Também mostrada é a seqüência de aminoácido (SEQ ID NO: 2) codificada pelo ácido nucleico. Moléculas de CTLA4-Ig que podem ser produzidas a partir desse cassete de expressão incluem moléculas tendo a seqüência de aminoácido de resíduos: (i) 26-383 de SEQ ID NO: 2, (ii) 26-382 de SEQ ID NO: 2, (iii) 27-383 de SEQ ID NO: 2, (iv) 26-382 de SEQ ID NO: 2, (v) 25-382 de SEQ ID NO: 2 e (vi) 25-383 de SEQ ID NO: 2. O cassete de expressão compreende as seguintes regiões: (a) uma seqüência sinalizadora de Oncostatina M (nucleotídeos 11-88 de SEQ ID NO: 1; aminoácidos 1-26 de SEQ ID NO: 2); (b) um domínio extracelular de CTLA4 humana (nucleotídeos 89-463 de SEQ ID NO: 1; aminoácidos 27-151 de SEQ ID NO: 2); (c) uma porção modificada de região constante de IgG1 humana (nucleotídeos 464-1159 de SEQ ID NO: 1; aminoácidos 152-383 de SEQ ID NO: 2), incluindo uma região de dobradiça modificada (nucleotídeos 464-508 de SEQ ID NO: 1; aminoácidos 152-166 de SEQ ID NO: 2), um domínio C_H2 de IgG1 humana (nucleotídeos 509-838 de SEQ ID NO: 1; aminoácidos 167-276 de SEQ ID NO: 2) e um domínio C_H3 de IgG1 humana (nucleotídeos

839-1159 de SEQ ID NO: 1; aminoácidos 277-383 de SEQ ID NO: 2).

A **FIG. 2** apresenta as seqüências de ácido nucleico (fileira superior) e aminoácido (fileira inferior) correspondendo a CTLA4^{A29YL104E}-Ig. A seqüência de aminoácido contém uma alteração de aminoácido da seqüência mostrada na Fig. 1, em que as alterações estão na posição 29 (A a Y) e na posição 104 (L a E) comparado com aquela de SEQ ID NO: 2, em que a numeração dos resíduos de aminoácido começa na Metionina (M) marcada por "+1". A seqüência de nucleotídeo de CTLA4^{A29YL104E}-Ig é mostrada nessa figura começando de A na posição 79 (isto é, a posição marcada pelo "+1" abaixo de M) a A na posição de nucleotídeo 1149 (SEQ ID NO: 3). Em particular, a seqüência de nucleotídeo que codifica CTLA4^{A29YL104E}-Ig é do nucleotídeo na posição 79 ao nucleotídeo na posição 1149, designada SEQ ID NO: 3. A seqüência de nucleotídeo completa mostrada na Fig. 2 é designada SEQ ID NO: 23 e inclui a seqüência de ácido nucleico que codifica o peptídeo sinalizador Oncostatina M.

A **FIG. 3** apresenta a seqüência de aminoácido (SEQ ID NO: 4) da molécula de CTLA4^{A29YL104E}-Ig, incluindo uma pró-seqüência de Oncostatina M (veja itálico em negrito). Polipeptídeos que podem ser produzidos que são moléculas de CTLA4^{A29YL104E}-Ig incluem moléculas tendo a seqüência de aminoácido de resíduos: (i) 26-383 de SEQ ID NO: 4, (ii) 26-382 de SEQ ID NO: 4, (iii) 27-383 de SEQ ID NO: 4, (iv) 26-382 de SEQ ID NO: 4, (v) 25-382 de SEQ ID NO: 4 e (vi) 25-383 de SEQ ID NO: 4.

A **FIG. 4** é um modelo de uma CTLA4^{A29YL104E}-Ig mostrada com os sítios de glicosilação N-ligados (N76, N108 e N207), a ligação de dissulfeto C120-C120 e as duas substituições de aminoácido feitas no domínio de CTLA-4 (L104E e A29Y).

A **FIG. 5** representa a seqüência de aminoácido cDNA-derivada teórica de uma CTLA4^{A29YL104E}-Ig (SEQ ID NO: 4). Duas substituições de aminoácido foram feitas no domínio extracelular de CTLA-4 (L104E e A29Y) para gerar CTLA4^{A29YL104E}-Ig. A seqüência identifica o peptídeo sinalizador (pró-seqüência) de oncostatina M junto com os sítios de glicosilação N-ligados.

A **FIG. 6** é um gráfico representando a ligação de amostras de CTLA4^{A29YL104E}-Ig a um anticorpo de Fc anti-IgG humana de bezerro. A ligação de amostras de CTLA4^{A29YL104E}-Ig foi detectada através de medição da resposta obtida sobre essa superfície, comparado com uma superfície de chip sensor não modificada. Os vários lotes representam três amostras de CTLA4^{A29YL104E}-Ig diferentes.

A **FIG. 7** é um gráfico que mostra os pesos moleculares evidentes os quais correspondem às frações de multímero, tetrâmero e dímero de um pico de clarificação por HIC de CTLA4-Ig, conforme determinado através de uma sobreposição de SEC com duas colunas com detecção por dispersão dinâmica de luz (DSL) e tempo de retenção sobre SEC.

As **FIG. 8A** (superior) e **8B** (inferior) mostram géis de IEF representativos de frações de moléculas de CTLA4-Ig glicosiladas (compreendendo monômeros de SEQ ID NO: 2) isoladas e purificadas de um pico de clarificação por HIC. A ordem de carregamento para o gel superior é: fileira 1, marcadores de pI (Amersham); fileira 2, padrão de dímero de CLTA4-Ig; fileira 3, eluato de Proteína A; fileira 4, Multímero; fileira 5, tetrâmero; fileira 6, dímero. A ordem de carregamento para o gel inferior é: fileira 1, marcador de pI (Amersham); fileira 2, padrão de dímero de CLTA4-Ig; fileira 3, tetrâmero; fileira 4, tetrâmero dissociado. Os painéis mostram que o tetrâmero é menos sialilado do que o dímero.

A **FIG. 9** mostra as estruturas de carboidrato predominantes e quantidades relativas de carboidratos observadas sobre um dímero de CTLA4-Ig compreendendo monômeros de SEQ ID NO: 2. A numeração de resíduo de aminoácido na figura não é consistente com SEQ ID NO: 2. Para que a numeração de resíduo de aminoácido na figura seja consistente com SEQ ID NO: 2, a numeração precisa aumentar em 26, isto é, N⁷⁶ é N¹⁰².

A **FIG. 10** INTENCIONALMENTE DEIXADA EM BRANCO.

A **FIG. 11** mostra um gel de IEF representativo (pH de 4,0 a 6,5) de um dímero de CTLA4-Ig compreendendo monômeros de SEQ ID NO: 2. As fileiras 1 e 5 mostram um padrão de calibração, a fileiras 2, 3, 4 mostram, cada uma, 20 µg/µl de dímero de CLTA4-Ig.

A **FIG. 12** mostra um gel de IEF representativo (pH de 4,0 a 6,5) de um dímero de CTLA4^{A29YL104E}-Ig compreendendo monômeros de SEQ ID NO: 4. As fileiras 1 e 8 mostram um padrão de calibração, as fileira 2-7 mostram, cada uma, 10 μ g/ \square l de dímero de CTLA4^{A29YL104E}-Ig.

5 A **FIG. 13** mostra o perfil de carboidrato N-ligado de uma população de moléculas de CTLA4-Ig compreendendo monômeros de SEQ ID NO: 2. Os carboidratos foram coletados de glicopeptídeos e separados usando a técnica de oligossacarídeo N-ligado PGC por LC/MS. Os cromatogramas proporcionam o perfil de população para cada sítio de fixação de N-ligação. A) Os carboidratos Asn⁷⁶ (Asn¹⁰² de SEQ ID NO: 2) do peptídeo T5 e B) os carboidratos Asn¹⁰⁸ (Asn¹³⁴ de SEQ ID NO: 2) do peptídeo T7 mostram ambos distribuições dentre espécies mono- e multi-sialiladas. C) Os carboidratos Asn²⁰⁷ (Asn²³³ de SEQ ID NO: 2) do peptídeo T14 consistem predominantemente de espécies asialiladas. D) A distribuição de carboidra-
10 tos N-ligados para moléculas de CTLA4-Ig é mostrada. E) Um espectro primário selecionado do peptídeo T5 mostra um pico principal correspondendo à estrutura mono-sialilada bi-anténaria representada. F) Um espectro primário selecionado do T14 mostra um pico principal correspondendo à estrutura asialo bi-anténaria. G) Um espectro primário selecionado de uma espécie
15 menor a qual co-elui com o pico a 64,23 minutos, o qual corresponde à estrutura di-sialilada tri-anténaria. H) Um espectro primário selecionado revela a espécie principal no pico a 64,23 minutos, o qual corresponde à estrutura di-sialilada bi-anténaria.
20

 As **FIGs. 14A-B** mostram um traço por UV e TIC de um perfil de
25 oligossacarídeo N-ligado de um monômero de SEQ ID NO: 2 de CTLA4-Ig a partir de cromatografia PGC sob condições de eluição ácida (TFA a 0,05%). O traço da FIG. 14A mostra a contagem total de íons negativos (TIC) para o cromatograma PGC sob condições de eluição ácida (TFA a 0,05%). O traço da FIG. 14B mostra o traço por UV a 206 nm para cromatograma PGC sob
30 condições de eluição ácida (TFA a 0,05%).

 As **FIGs. 15A-B** mostram um traço por UV e TIC de um perfil de oligossacarídeo N-ligado de um monômero de SEQ ID NO: 2 de CTLA4-Ig a

partir de cromatografia PGC sob condições de eluição básica (NH₄OH a 0,4%). O traço da FIG. 15A mostra a contagem total de íons negativos (TIC) para cromatograma PGC sob condições de eluição básica (NH₄OH a 0,4%). O traço da FIG. 15B mostra o traço por UV a 206 nm para cromatograma PGC sob condições de eluição básica (NH₄OH a 0,4%).

A FIG. 16 representa os perfis de carboidrato e oligossacarídeo N-ligado para moléculas de CTLA4^{A29YL104E}-Ig compreendendo SEQ ID NO: 4. Quatro domínios de oligossacarídeo são observados: o Domínio I contém espécies não-sialiladas, enquanto que os Domínios II, III e IV contêm espécies mono-sialiladas, di-sialiladas e tri-sialiladas, respectivamente. Isolamento dos oligossacarídeos cromatograficamente e análise dos mesmos através de espectroscopia de massa determinou os domínios.

A FIG. 17 mostra um perfil por HPAEC-PAD de oligossacarídeos N-ligados de moléculas de CTLA4-Ig compreendendo monômeros de SEQ ID NO: 2. Os domínios são mostrados na ordem crescente de teor de ácido siálico para os oligossacarídeos. Os Domínios I, II, III e IV contêm estruturas de oligossacarídeo tendo 0, 1, 2 e 3 ácidos siálicos, respectivamente. Os rótulos de pico representam estruturas de oligossacarídeo atribuídas através de determinação de perfil por HPAEC-PAD de picos coletados a partir de determinação de perfil por PGC. A identificação estrutural da estrutura de carboidrato é consistente com determinações anteriores.

As FIGs. 18A-B mostram um perfil por PGC de moléculas de CTLA4-Ig compreendendo monômeros de SEQ ID NO: 2. O perfil é obtido a partir de injeção direta de mistura de digestão de carboidrato preparada conforme descrito no Exemplo 3. Injeção direta resulta em detecção da estrutura P4144 eluindo a 130 minutos. A estrutura tetra-sialilada P4144 não é observada em perfis de oligossacarídeos os quais são isolados antes de injeção.

A FIG. 19 apresenta um espectro por eletropulverização positiva de desconvolução por LC/MS para o fragmento T9 de um monômero de SEQ ID NO: 2. O espectro ilustra três principais estruturas O-ligadas. O espectro ilustra o peptídeo de base com ladder de açúcar consistente com a estrutura O-ligada (GalNAc)₁(Gal)₁(NeuAc)₁. A porção em negrito do espec-

tro foi intensificada 10 vezes com relação à porção não em negrito do espectro e ilustra duas estruturas O-ligadas adicionais com (GalNAc)₁(Gal)₁(NeuAc)₂ e (GalNAc)₁(GlcNAc)₁(Gal)₂(NeuAc)₂.

5 A FIG. 20 mostra os pontos de fixação e populações relativas de estruturas de carboidrato O-ligado de uma cadeia simples de CTLA4-Ig tendo a seqüência monomérica SEQ ID NO: 2. As quantidades relativas em cada local mostram dados gerados através de duas ou mais técnicas ortogonais e estão sujeitas à variabilidade. A localização da cisteinilação covalente também é representada.

10 A FIG. 21 representa um mapa do plasmídeo intermediário pILN-huCTLA4-Ig. Esse plasmídeo compreende uma seqüência que pode codificar uma molécula de CTLA4-Ig humana (huCTLA4-Ig) (isto é, SEQ ID NO: 1) flanqueada pelos sítios de enzima de restrição *HindIII* e *XbaI*.

15 A FIG. 22 representa um mapa do plasmídeo pD16LEA29Y. Esse plasmídeo compreende uma seqüência que pode codificar uma molécula de CTLA4^{A29YL104E}-Ig humana (isto é, SEQ ID NO: 4).

20 A FIG. 23 é uma fotografia de uma Southern blot de DNA extraído de células CHO expressando o cassete de expressão de CTLA4-Ig derivado de 1D5-100A1 (por exemplo, clone 17). As fileiras para o gel da esquerda para a direita são: fileira M, marcador de peso molecular de DNA; fileira N, DNA de CHO digerido com EcoRI/XbaI (5 mg); fileira 1, DNA de CHO digerido com EcoRI/XbaI não transfectado (2,5 µg) + 1 ng de pcSDhuCTLA4-Ig; fileira 2, DNA de CHO digerido com EcoRI/XbaI não transfectado (2,5 µg) + 0,5 ng de pcSDhuCTLA4-Ig; fileira 3, DNA de CHO digerido com EcoRI/XbaI não transfectado (2,5 µg) + 0,25 ng de pcSDhuCTLA4-Ig; fileira 4, DNA de CHO digerido com EcoRI/XbaI não transfectado (2,5 µg) + 0,125 ng de pcSDhuCTLA4-Ig; fileira 5, DNA de CHO digerido com EcoRI/XbaI não transfectado (2,5 µg) + 0,0625 ng de pcSDhuCTLA4-Ig; fileira 6, DNA de CHO digerido com EcoRI/XbaI não transfectado (2,5 µg) + 0,03125 ng de pcSDhuCTLA4-Ig; fileira 7, DNA digerido com EcoRI/XbaI: MCB (5,0 µg); fileira 8, DNA digerido com EcoRI/XbaI: Número de Lote EPCB C20030618A-01 (5,0 µg); fileira 9, DNA digerido com EcoRI/XbaI: Número

25

30

de Lote EPCB C20030712A-01 (5,0 µg); fileira 10, DNA digerido com EcoRI/XbaI: Número de Lote EPCB C20030801A-01 (5,0 µg); fileira 11, DNA digerido com EcoRI/XbaI: MCB (2,5 µg); fileira 12, DNA digerido com EcoRI/XbaI: Número de Lote EPCB C20030618A-01 (2,5 µg); fileira 13, DNA digerido com EcoRI/XbaI: Número de Lote EPCB C20030712A-01 (2,5 µg); fileira 14, DNA digerido com EcoRI/XbaI: Número de Lote EPCB C20030801A-01 (2,5 µg); fileira 15, DNA digerido com EcoRI/XbaI: MCB (1,25 µg); fileira 16, DNA digerido com EcoRI/XbaI: Número de Lote EPCB C20030618A-01 (1,25 µg); fileira 17, DNA digerido com EcoRI/XbaI: Número de Lote EPCB C20030712A-01 (1,25 µg); fileira 18, DNA digerido com EcoRI/XbaI: Número de Lote EPCB C20030801A-01 (1,25 µg).

A **FIG. 24** representa um fluxograma de um processo de cultura em escala de produção. Esse processo permite a produção em massa de proteínas recombinantes em um bio-reator de produção de 25.000 L.

15 A **FIG. 25** mostra um cromatograma representativo do padrão de adequabilidade de sistema de NGNA e NANA. O pico a ~9,7 min é NGNA e o pico a ~10,7 min é NANA.

20 A **FIG. 26** mostra um cromatograma representativo de moléculas de CTLA4-Ig hidrolisadas compreendendo monômeros de SEQ ID NO: 2. O pico a ~8,4 min é o pico de solvente. O pico a ~9,6 min é NGNA. O pico a ~10,5min é NANA. O pico a ~11,3 min é NANA degradado, resultante das condições de hidrólise. As contagens de área são combinadas para cálculos da proporção molar de NANA.

25 As **FIGS. 27A, 27B e 27C** mostram os espectros por MALDI de peptídeos cisteinilados de CTLA4-Ig. Os espectros por MALDI foram obtidos para fragmentos de tripsina/quimiotripsina de CTLA4-Ig contendo Cys¹⁴⁶ de SEQ ID NO: 2. A **FIG. 27A** mostra o espectro de peptídeo com cadeia simples ilustrando a modificação por cisteinilação. A **FIG. 27B** mostra o espectro do peptídeo com cadeia simples após redução e demonstra que a modificação ocorre em Cys¹⁴⁶. A **FIG. 27C** mostra a alquilação do peptídeo com cadeia simples reduzido, o qual demonstra que a cisteinilação ocorre em Cys¹⁴⁶.

30

A **FIG. 28** apresenta um esquema de clonagem útil para a geração do vetor pcSD. pcDNA3 foi digerido com a enzima de restrição *NaeI* de forma a isolar um fragmento de 3,821 Kb que contém o promotor de CMV, um gene de resistência à ampicilina e uma origem de replicação para *E. coli*.
5 pSV2-dhfr foi digerido com as enzimas de restrição *PvuII* e *BamHI* de forma a isolar um fragmento de 1,93 Kb, o qual contém o promotor SV40 e o gene *dhfr* e teve a extremidade subsequente cega. Para gerar o pcSD, ambos os fragmentos foram ligados. O mapa do plasmídeo pcSD é mostrado no fundo da figura.

10 A **FIG. 29** apresenta um esquema de clonagem útil para geração do vetor de expressão pcSDhuCTLA4-Ig. pcSD foi digerido com as enzimas de restrição *EcoRV* e *XbaI*. piLN-huCTLA4-Ig foi digerido com a enzima de restrição *HindIII*, teve a extremidade cega e, então, digerido com a enzima de restrição *XbaI* de forma a isolar o fragmento huCTLA4-Ig de 1,2 Kb. Para
15 gerar o pcSDhuCTLA4-Ig, o fragmento de CTLA4-Ig foi ligado ao vetor pcSD digerido. O mapa do plasmídeo pcSDhuCTLA4-Ig é mostrado no inferior da figura. Esse plasmídeo foi linearizado e transfectado em células CHO que não têm um gene *dhfr* funcional. Uma vez que o plasmídeo contém um gene *dhfr* funcional, transfectantes estáveis podem ser selecionados com base na
20 sobrevivência celular. O pcSDhuCTLA4-Ig no cassete de expressão compreendendo o promotor de CMV, uma seqüência que codifica uma molécula de CTLA4-Ig humana (huCTLA4-Ig) (isto é, SEQ ID NO: 1) e uma seqüência de cauda poli(A) de BGH.

A **FIG. 30** mostra um eletroferograma de amino monossacarídeos do sistema de adequabilidade representado como unidades de fluorescência relativa (RFU) versus tempo (min).
25

A **FIG. 31** mostra um eletroferograma de monossacarídeos neutros da adequabilidade de sistema representada como unidades de fluorescência relativa (RFU) versus tempo (min).

30 A **FIG. 32** representa um mapa por peptídeo tríplice de CTLA4^{A29YL104E}-Ig com peptídeos rotulados. A Tabela 23 corresponde aos peptídeos rotulados.

A FIG. 33 mostra uma análise por hibridização de Northern da CTLA4^{A29YL104E}-Ig. O Painel A representa um gel de agarose corado com brometo de etídio em que a Fileira M é marcador de RNA; a Fileira 1 é RNA total de CHO; a Fileira 2 é RNA total de MCB; e a Fileira 3 é RNA total de EPCB. O Painel B é o auto-radiograma correspondente, em que a Fileira M é marcador de RNA; a Fileira 1 é RNA total de CHO; a Fileira 2 é RNA total de MCB; e a Fileira 3 é RNA total de EPCB.

A FIG. 34A-C representa cromatogramas por exclusão de tamanho, os quais distinguem dímeros de CTLA4^{A29YL104E}-Ig de espécies de alto e baixo peso molecular.

A FIG. 35 mostra uma análise por SDS-PAGE (Reduzida e Não-Reduzida) de CTLA4^{A29YL104E}-Ig corada com Coomassie Blue. A Fileira 1 é carregada com marcadores de peso molecular; as Fileiras 2, 7 e 12 são placebo; as Fileiras 3-6 são amostras de CTLA4^{A29YL104E}-Ig (reduzida); as Fileiras 8-11 são amostras de CTLA4^{A29YL104E}-Ig (não-reduzida).

A FIG. 36 mostra uma análise por SDS-PAGE (Reduzida e Não-Reduzida) de CTLA4^{A29YL104E}-Ig submetida à coloração com prata. A Fileira 1 é carregada com marcadores de peso molecular; as Fileiras 2, 7 e 12 são placebo; as Fileiras 3-6 são amostras de CTLA4^{A29YL104E}-Ig (reduzida); as Fileiras 8-11 são amostras de CTLA4^{A29YL104E}-Ig (não-reduzida).

A FIG. 37 representa um mapa peptídico de CTLA4^{A29YL104E}-Ig não reduzida usando uma combinação de digestão com tripsina e quimiotripsina.

A FIG. 38 representa um mapa peptídico de CTLA4^{A29YL104E}-Ig não-reduzida usando uma combinação de digestão com tripsina e elastase.

A FIG. 39 é um diagrama que representa pacientes com respostas anti-CTLA4-Ig ou anti-CTLA-4. A resposta de anticorpo à molécula de CTLA4-Ig inteira (CTLA-4 e porção de Ig) e à porção de CTLA-4 apenas foi determinada usando os Ensaio A e B, conforme esboçado no Exemplo 32.

A FIG. 40 é um esquema mostrando a distribuição de eliminação e o volume de compartimento central através do estado de imunogenicidade.

A FIG. 41 é um gráfico demonstrando perfis de concentrações

médias de CTLA4-Ig no soro (SD) com o tempo em macacos administrados 10 mg/kg de substância de fármaco produzida através de um processo de invenção.

5 A FIG. 42 é um gráfico de um cromatograma por cromatografia de exclusão de tamanho (SEC) de Proteína A (MAbSelect) purificada do controle e material de CTLA4-Ig desagregado.

A FIG. 43 é um gráfico de uma análise de N-glicana comparando o Material Processado de Desagregação (ii) com o Controle (i).

10 A FIG. 44 é um gráfico representando as concentrações médias de CTLA4-Ig no soro [μ g/ml] versus o tempo (mais de 71 dias).

A FIG. 45 mostra um eletroferograma de monossacarídeos neutros representado como unidades de fluorescência relativa (RFU) versus o tempo (min).

15 A FIG. 46 mostra um eletroferograma de amino monossacarídeos representado como unidades de fluorescência relativa (RFU) versus o tempo (min).

20 A FIG. 47 representa os perfis de carboidrato de oligossacarídeo N-ligado para moléculas de CTLA4^{A29YL104E}-Ig compreendendo SEQ ID NO: 4. Quatro domínios de oligossacarídeo são observados, em que o Domínio I contém espécies não-sialiladas, enquanto que os Domínios II, III e IV contém espécies mono-sialiladas, di-sialiladas e tri-sialiladas, respectivamente.

25 A FIG. 48 é um gráfico de uma separação por eletroforese capilar de CTLA4-Ig que foi misturada a 1:1 com CTLA4^{A29YL104E}-Ig. Os tempos de migração do pico principal são de aproximadamente 0,8 minutos de intervalo.

A FIG. 49 é um cromatograma de material CTLA4^{A29YL104E}-Ig hidrolisado, em que um pico de NANA é observado a 3,4 minutos.

30 A FIG. 50 representa várias das estruturas de carboidrato N-ligadas encontradas em proteínas de mamífero. Todas as cadeias compartilham uma estrutura central em comum contendo dois resíduos de GlcNAc e três de manose.

A FIG. 51 é um gráfico representando a exposição de CTLA4-Ig

(AUC) como uma função de sialilação da glicoproteína (proporção de NA-NA).

A FIG. 52 é um gráfico representando a exposição de CTLA4-Ig (AUC) como uma função do perfil de carboidrato de CTLA4-Ig. Um grande número de picos foram gerados através de HPLC de troca de ânions, os quais foram decompostos em quatro ou cinco domínios. Os domínios 1 e 2 são estruturas grandemente asialiladas e mono-sialiladas, enquanto que os domínios 3 e 4 são estruturas grandemente di- e tri-sialiladas.

A Fig. 53 representa um mapa por peptídeo tríptico de CTLA4^{A29YL104E}-Ig com peptídeos rotulados. A Tabela 56 corresponde aos peptídeos rotulados.

A FIG. 54 representa os perfis de carboidrato N-ligado comparativos para moléculas de CTLA4-Ig compreendendo SEQ ID NO: 2. Quatro domínios de oligossacarídeo são observados, em que o Domínio I contém espécies não-sialiladas, enquanto que os Domínios II, III e IV contêm espécies mono-sialiladas, di-sialiladas e tri-sialiladas, respectivamente.

As FIGs. 55A-D são um gráfico que representa os perfis de oligossacarídeo de CTLA4-Ig e Peptídeos T5, T7 e T14 através de HPAEC-PAD.

A FIG. 56 é um gráfico representando o perfil de oligossacarídeo rotulado de CTLA4-Ig obtida de uma coluna de PGC (Hypercarb).

A Fig. 57 representa um gráfico dos dados de farmacocinética mostrando AUC de macaco sobre o eixo Y e o percentual de glicosilação N-ligada, conforme mostrado nos Domínios I e II a partir de um perfil de carboidrato sobre o eixo X. Veja métodos de determinação do perfil de carboidrato N-ligado, por exemplo, nos Exemplos 3, 44, 22 e 37. À medida que o percentual dos Domínios I e II aumenta (e o percentual dos Domínios III, IV e V diminui), a eliminação aumenta. Note que o controle negativo, a CTLA4-Ig com baixo teor de ácido siálico, é eliminado muito rapidamente. Note que a variante de CTLA4-Ig, LEA (CTLA4-Ig^{A29YL104E}-Ig), é incluída nesse gráfico.

As Fig. 58 A e 58 B representam um traço de um cromatograma de carboidrato N-ligado dos carboidratos N-ligados liberados de CTLA4-Ig

(conforme obtida a partir de métodos tais como aqueles descritos nos Exemplos 3, 44, 22 e 37). O traço na Fig. 58A é de uma análise de CTLA4-Ig produzida em um método de cultura sem galactose extra adicionado à cultura. O traço na Fig. 58 B tem galactose adicionada à cultura. Os percentuais de carboidratos N-ligados em cada domínios são mostrados na tabela em anexo.

A Fig. 59 representa um traço de um cromatograma de carboidrato N-ligado dos carboidratos N-ligados liberados de CTLA4-Ig (conforme obtida a partir de métodos tais como aqueles descritos nos Exemplos 3, 44, 22 e 37). Esse é de uma análise de CTLA4-Ig produzida em um método de cultura com galactose adicionada à cultura no dia 8. Esse traço é de uma análise de CTLA4-Ig produzida em um método de cultura sem galactose extra adicionado à cultura. Os percentuais de carboidratos N-ligados em cada domínios são mostrados na tabela em anexo.

A Fig. 60 representa um traço de um cromatograma de carboidrato N-ligado dos carboidratos N-ligados liberados de CTLA4-Ig (conforme obtida a partir de métodos tais como aqueles descritos nos Exemplos 3, 44, 22 e 37). Esse é de uma análise de CTLA4-Ig produzida em um método de cultura com galactose adicionada à cultura no dia 14. Esse traço é de uma análise de CTLA4-Ig produzida em um método de cultura sem galactose extra adicionado à cultura. Os percentuais de carboidratos N-ligados em cada domínios são mostrados na tabela em anexo.

As Figs. 61A e 61B representa um traço de um cromatograma de carboidrato N-ligado dos carboidratos N-ligados liberados de CTLA4-Ig (conforme obtida a partir de métodos tais como aqueles descritos nos Exemplos 3, 44, 22 e 37). A Fig. 61A é de uma análise de CTLA4-Ig produzida em uma método de cultura sem galactose adicionada e a Fig. 61B é de uma análise onde galactose foi adicionada à cultura no dia 14. Esse traço é de uma análise de CTLA4-Ig produzida em um método de cultura sem galactose extra adicionado à cultura. Os percentuais de carboidratos N-ligados em cada domínios são mostrados na tabela em anexo.

A Fig. 62 representa um traço de um cromatograma de carboi-

drato N-ligado dos carboidratos N-ligados liberados de CTLA4-Ig (conforme obtida a partir de métodos tais como aqueles descritos nos Exemplos 3, 44, 22 e 37). Esse traço foi obtido de material CTLA4-Ig que foi recuperado da etapa de lavagem da coluna de QFF, produzindo uma fração de material de CTLA4-Ig com baixo teor de ácido siálico. A quantidade relativa de Domínios I e II é aumentada e os Domínios III e IV são diminuídos, comparado com os traços mostrados nas Figuras 61, 60 e 59. Os percentuais de carboidratos N-ligados em cada domínios são mostrados na tabela em anexo.

A FIG. 63 mostra o mapa por peptídeo tríptico de CTLA4-Ig, indicando que T8 elui ao final da frente de solvente e T9 elui no ombro de T27.

A FIG. 64 é um gráfico que representa o espectro todo de massa correspondendo ao glicopeptídeo T8 de CTLA4-Ig.

A FIG. 65 é um gráfico que representa o espectro todo de massa correspondendo ao glicopeptídeo T9 de CTLA4-Ig.

A FIG. 66 é um gráfico que representa os dados de MALDI-TOF para o fragmento de peptídeo T9 de CTLA4-Ig.

A FIG. 67A-B representa cromatogramas de íons e espectros de massa de peptídeos trípticos nativos e oxidados de CTLA4-Ig.

A FIG. 68 representa um perfil de oligossacarídeo N-ligado típico (Domínios I, II, III, IV e V e Picos 1A e 1B dentro de 5% das médias dos lotes). Os picos 1A, 1B e 1C representam as estruturas de asialo oligossacarídeo N-ligados de G0, G1e G2. Os dados para o perfil estão na tabela diretamente abaixo. Veja Exemplo 44.

	Nome de Pico	RT	Área	Área %
	Domínio I	19,413	47807873	31,3
	Domínio II	29,076	50746179	33,2
	Domínio III	42,819	36640805	24,0
	Domínio V	67,546	3421324	2,2
	Domínio IV	55,899	14331509	9,4
	Pico 1A	19,413	11115168	7,3
	Pico 1B	20,290	16331761	10,7
	Pico 1C	21,032	13507144	8,8
	Pico 2	21,925	4285962	2,8
0		22,685	2567838	1,7
1		29,076	2808537	1,8

2		30,763	27989176	18,3
3		31,577	19948466	13,0
4		42,819	4555254	3,0
5	Pico 3	43,823	22213064	14,5
6		46,626	9872487	6,5
7		55,899	3898179	2,5
8	Pico 4	57,368	6789516	4,4
9		60,333	3643813	2,4
0		67,546	3421324	2,2

A FIG. 69 representa um gel de focalização isoeletrica de C-TLA4-Ig. As bandas são caracterizadas por:

Fileira	Descrição	Carga de proteína (microgramas)	Banda No.	Intensidade % de banda cumulativa	Percentual relativo de banda (%)
1	Marcadores IEF	NA	NA	NA	NA
2	Material CTLA4-Ig	20	16	100	NA
3	Substância de fármaco de CTLA4-Ig	20	16	100	100
4	Controle de coloração	1	NA	NA	NA

5 A Fig. 70 representa um relatório de análise quantitativa em gel de focalização isoeletrica representativo de CTLA4-Ig. A quantificação do gel foi realizada e os dados são como segue:

IEF Marker			L010007-2005-015			BQC060082 (DS ABC04014)			Staining Control		
Lane 1	Lane 1	Lane 1	Lane 2	Lane 2	Lane 2	Lane 3	Lane 3	Lane 3	Lane 4	Lane 4	Lane 4
Band	Band %	pI	Band	Band %	pI	Band	Band %	pI	Band	Band %	pI
1	20.95	5.85	1	0.51	5.28	1	1.34	5.26	1	100	5.68
2	22.39	5.2	2	0.17	5.25	2	2.34	5.19			
3	9.62	4.55	3	0.71	5.23	3	0.99	5.17			
4	47.04	3.5	4	1.61	5.2	4	3.2	5.14			
			5	1.15	5.18	5	3.23	5.11			
			6	7.44	5.15	6	3.41	5.08			
			7	10.96	5.09	7	10.29	5.03			
			8	9.32	5.02	8	5.95	5.01			
			9	18.22	4.94	9	5.66	4.97			
			10	5.52	4.91	10	13.4	4.91			
			11	4.19	4.88	11	17.11	4.85			
			12	22.58	4.82	12	7.39	4.8			
			13	3.8	4.67	13	16.03	4.72			
			14	10.02	4.63	14	3.88	4.56			
			15	3.44	4.55	15	4.97	4.52			
			16	0.35	4.48	16	0.8	4.45			
			Bands (4.3-5.6)	16	Bands (4.3-5.6)	16					
			% Bands (4.3-5.3)	100	% Bands (4.3-5.3)	100					
			Sample Relative Percent (%)	100							

Sample Relative Percent (%) = (Sample % Band Intensity/Ref % Band Intensity) x 100
 NOTE: For the pI range of 4.3 to 5.3.

A Fig. 71 A representa uma injeção de 20 μ L típica do padrão de adequabilidade de sistema sobre uma coluna TOSO HAAS 3000 SWXL equipada com uma coluna de proteção. A Fig. 71B representa uma injeção de 20 μ L de material de referência CTLA4-Ig sobre a coluna TOSO HAAS 3000 SWXL equipada com uma coluna de proteção.

Fig. 72 – Exemplo de imagem digitalmente adquirida de análise por SDS-PAGE de CTLA4-Ig através de eletroforese em gel de poliacrilamida corado com Coomassie Blue (4-2020).

Fileira	Descrição	Carga de Proteína (microgramas)	Condição não-reduzida (NR)/Reduzida (R)	Intensidade de banda percentual (%)
1	Substância de fármaco de CTLA4-Ig	10	NR	100
2	Material CTLA4-Ig	10	NR	99
3	Placebo	NA	NR	NA
4	Substância de fármaco de CTLA4-Ig	10	R	100
5	Material CTLA4-Ig	10	R	100
6	Marcador de peso molecular	NA	NA	NA
7	Produto de fármaco de CTLA4-Ig	10	NR	99
8	Material CTLA4-Ig	10	NR	100
9	Placebo	NA	NR	NA
10	Produto de fármaco de CTLA4-Ig	10	R	99
11	CTLA4-Ig material	10	R	99
12	Controle de coloração de inibidor de tripsina	NA	NA	NA

A **Fig. 73** representa um exemplo de um relatório de análise quantitativa para SDS-PAGE corado com Coomassie Blue.

A **Fig. 74** mostra uma tabela apresentando a análise quantitativa do gel de SDS-PAGE corado na Fig. 73.

5 A **Fig. 75** representa um exemplo de uma imagem intensificada de análise por SDS-PAGE de um gel corado com Coomassie Blue de CTLA4-Ig para ilustração das posições de migração das bandas principais e menores esperadas com relação aos marcadores de peso molecular.

10 A **Fig. 76** é uma representação de um perfil de carboidrato N-ligado de material padrão/referência de CTLA4-Ig. Esse é um perfil de carboidrato representativo da operação sobre o sistema Waters. Os tempos de retenção são dependentes do sistema.

A **Fig. 77** é uma representação de um cromatograma de adequabilidade de sistema por estaquiiose representativo.

15 A **Fig. 78** é um traço de um cromatograma representativo de material CTLA4-Ig hidrolisado.

A **Fig. 79** representa uma imagem em gel de análise por SDS-PAGE de CTLA4^{A29YL104E}-Ig em eletroforese em gel de poliacrilamida corado com Coomassie Blue (4-20%).

20

Fileira #	Descrição	Carga de Proteína (µg)	Condição R/NR	Pureza % (%)
1	Substância de fármaco de CTLA4 ^{A29YL104E} -Ig	10	NR	99
2	Material de referência CTLA4 ^{A29YL104E} -Ig	10	NR	99
3	Placebo	NA	NR	NA
4	Substância de fármaco de CTLA4 ^{A29YL104E} -Ig	10	R	100
5	Material de referência CTLA4 ^{A29YL104E} -Ig	10	R	100
6	Marcador de peso molecular	NA	R	NA
7	Material de referência CTLA4 ^{A29YL104E} -Ig	10	R	99
8	Produto de fármaco de CTLA4 ^{A29YL104E} -Ig	10	R	99
9	Placebo	0	NR	0
10	Material de referência CTLA4 ^{A29YL104E} -Ig	10	NR	100
11	Produto de fármaco de CTLA4 ^{A29YL104E} -Ig	10	NR	100
12	Controle de coloração	0,1	NR	100

A **Figura 80** representa um fluxograma das etapas de coleta. Veja Exemplo 28.

A **Figura 81** representa um eletroferograma da adequabilidade de sistema de amino monossacarídeos. Veja Exemplo 16.

5 A **Figura 82** representa um gráfico de dados farmacocinéticos mostrando a AUC de macaco sobre o eixo Y e o percentual de glicosilação N-ligada, conforme mostrado no Domínios I e II de um perfil de carboidrato sobre o eixo X. Veja métodos de determinação do perfil de carboidrato N-ligado, por exemplo, nos Exemplos 3, 44, 22 e 37. À medida que o percentual dos Domínios I e II aumenta (e o percentual dos Domínios III, IV e V diminui), a AUC aumenta. Note que o controle negativo, a CTLA4-Ig com baixo teor de ácido siálico, é eliminado muito rapidamente. Note que a molécula mutante de CTLA4-Ig, CTLA4-Ig^{A29YL104E}-Ig (designada LEA), é incluída nesse gráfico.

15 A **Figura 83** representa um gráfico de dados farmacocinéticos mostrando a AUC sobre o eixo Y e o percentual de glicosilação N-ligada, conforme mostrado no Domínios III e IV (conforme determinado a partir de um perfil de carboidrato N-ligado) sobre o eixo X. À medida que o percentual dos Domínios III e IV aumenta, a AUC aumenta. Note que o controle negativo, a CTLA4-Ig com baixo teor de ácido siálico, é eliminado muito rapidamente. Veja métodos de determinação do perfil de carboidrato N-ligado, por exemplo, nos Exemplos 3, 44, 22 e 37. Note que a molécula mutante de CTLA4-Ig, CTLA4-Ig^{A29YL104E}-Ig (designada LEA), é incluída nesse gráfico.

25 A **Figura 84** representa outro gráfico de dados farmacocinéticos mostrando a AUC sobre o eixo Y e o percentual de glicosilação N-ligada, conforme mostrado no Domínios III e IV de um perfil de carboidrato sobre o eixo X. À medida que o percentual dos Domínios III e IV aumenta, a AUC aumenta. Note que o controle negativo, a CTLA4-Ig com baixo teor de ácido siálico, é eliminado muito rapidamente. Veja métodos de determinação do perfil de carboidrato N-ligado, por exemplo, nos Exemplos 3, 44, 22 e 37. Note que a molécula mutante de CTLA4-Ig, CTLA4-Ig^{A29YL104E}-Ig (designada LEA), é incluída nesse gráfico.

30

A **Fig. 85** representa um Mapeamento Tríptico de padrão de CTLA4-Ig (veja Tabela no final do Exemplo 65) para atribuições de pico. Um pequeno pico rotulado T1+A é o peptídeo tríptico T1 estendido por um resí-
duo de alanina N-terminal. O pequeno pico rotulado T31+K é o peptídeo trí-
ptico T31 estendido por um resíduo de lisina C-terminal.

A **Fig. 86** representa uma sobreposição de dados a 280 nm para um Mapeamento Tríptico de padrão de CTLA4-Ig mais Same Spiked com 5 moles % de Peptídeo Indicador T6ox, Met(O) 85 (84-93). Veja Exemplo 65.

A **Fig. 87** representa uma vista expandida de dados a 215 nm para um Mapeamento Tríptico de padrão de CTLA4-Ig mais Same Spiked com 5 moles % de Peptídeo Indicador T26deaml, isoAsp294(281-302). Veja Exemplo 65.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

Moléculas de CTLA4-Ig podem ser usadas para tratar uma variedade de distúrbios, incluindo distúrbios relacionados a fenômenos imunoproliferativos e imuno-reativos anormais, tais como autoimunidade e alergia. A invenção proporciona composições de CTLA4-Ig que compreendem, por exemplo, populações de moléculas de CTLA4-Ig tendo particular modificações de glicosilação, em particular, tendo perfis ou características de carboidrato em particular, tendo estruturas multiméricas em particular e/ou tendo resistências de avidéz em particular. Documentos que são aqui incorporados por referência em sua totalidade que também descrevem moléculas de CTLA4-Ig, usos e métodos das mesmas, incluem Patente U.S. No. 5.434.131; 5.851.795; 5.885.796; 5.885.579; e 7.094.874.

A invenção também proporciona linhagens de células que são capazes de produzir grandes quantidades de moléculas de CTLA4-Ig via os métodos de produção em massa e cultura proporcionados aqui. Uma linhagem de célula em particular da invenção é uma linhagem de célula clonal que pode ser usada para produzir em massa moléculas de CTLA4-Ig, de modo que elas tenham um perfil de carboidrato e glicosilação em particular. Quando comparado com a população de célula heterogenia e não-clonal tendo No. de Acesso ATCC 68629 (veja Patente U.S. No. 5.434.131, a qual

é incorporada aqui por referência em sua totalidade), as linhagens de células clonais da invenção podem secretar uma população de moléculas de CTLA4-Ig tendo um perfil de glicosilação ou carboidrato mais consistente ou mais uniforme. Ainda, quando comparado com a população de células heterogênea e não-clonal tendo No. de Acesso ATCC 68629, as linhagens de células clonais da invenção podem secretar uma maior quantidade de moléculas de CTLA4-Ig, em parte porque as presentes linhagens de célula clonal são selecionadas para ter um maior número de cópias de cassetes de expressão de CTLA4-Ig integrados em um único sítio no genoma da célula.

10 A invenção proporciona a descoberta de que a avidéz e potência de CTLA4-Ig (SEQ ID NO: 2) pode ser aumentada fazendo duas substituições de aminoácido na região de ligação B7 do domínio de ligação de CTLA-4: (i) alanina na posição 29 de SEQ ID NO: 2 é substituída por tirosina (A29Y) e (ii) lisina na posição 104 de SEQ ID NO: 2 é substituída por glutamato (L104E). A invenção proporciona um subgênero de moléculas de CTLA4-Ig, denominado "moléculas de beta polipeptídeo," as quais compreendem beta polipeptídeos os quais têm atividade de ligação a B7 e podem compreender a seqüência de aminoácido em SEQ ID NO: 24 (domínio extracelular de CTLA4 com mutações A29Y e L104E), ligados a uma região constante de imunoglobulina ou porção da mesma.

[SEQ ID NO: 24]

MHVAQPAVVLASSRGIASFVCEYASPGKYTEVRVTVLRQADS
QVTEVCAATYMMGNELTFLDDSICTGTSSGNQVNLTIQGLRAMDTGLYICK
VELMYPPPYEYEGINGTQIYVIDPEPCPDS

25 [SEQ ID NO: 18]- Um domínio extracelular CTLA4

MHVAQPAVVLASSRGIASFVCEYASPGKATEVRVTVLRQADS
QVTEVCAATYMMGNELTFLDDSICTGTSSGNQVNLTIQGLRAMDTGLYICK
VELMYPPPYLGIINGTQIYVIDPEPCPDS

Termos

30 Conforme usado aqui, o termo "clonal" se refere a uma população de célula que é expandida a partir de uma única célula. Com relação a uma linhagem de célula clonal ou população de célula clonal capaz de ex-

pressar a molécula de CTLA4-Ig, a linhagem ou população de célula clonal é expandida a partir de uma única célula que foi isolada de uma população de células que foram transfectadas com um vetor de expressão que codifica a molécula de CTLA4-Ig. A população transfectada de células pode ser uma população heterogênea. Uma linhagem ou população de célula clonal pode ser considerada como sendo homogênea no sentido de que todas as células na população se originam de um único transfectante.

Conforme usado aqui, o termo "B7-1" se refere a CD80; o termo "B7-2" se refere a CD86; e o termo "B7" se refere a um ou ambos de B7-1 e B7-2 (CD80 e CD86). O termo "B7-1-Ig" ou "B7-1lg" se refere a CD80-Ig; o termo "B7-2-Ig" ou "B7-2lg" se refere a CD86-Ig.

Conforme usado aqui, os termos "CTLA4-Ig" ou "molécula de CTLA4-Ig" ou "molécula de CTLA4lg" ou "proteína CTLA4-Ig" ou "Proteína de CTLA4lg" são usados permutavelmente e se referem a uma molécula de proteína que compreende pelo menos um polipeptídeo de CTLA4-Ig tendo um domínio extracelular de CTLA4 e uma região constante de imunoglobulina ou porção da mesma. Em algumas modalidades, por exemplo, um polipeptídeo de CTLA4-Ig compreende pelo menos a seqüência de aminoácido de SEQ ID NO: 18. Em determinadas modalidades, o domínio extracelular de CTLA4 e a região constante de imunoglobulina ou porção da mesma pode ser do tipo silvestre ou mutante ou modificada. Um polipeptídeo de CTLA4-Ig mutante é um polipeptídeo de CTLA4-Ig compreendendo um domínio extracelular de CTLA4 mutante. Uma molécula mutante de CTLA4lg compreende pelo menos um polipeptídeo de CTLA4-Ig mutante. Em algumas modalidades, o domínio extracelular de CTLA4 e a região constante de imunoglobulina ou porção da mesma pode ser de mamífero, incluindo de ser humano ou camundongo. Em algumas modalidades, um domínio extracelular de CTLA4 mutante pode ter uma seqüência de aminoácido que é pelo menos 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% idêntica ao domínio extracelular de CTLA4 mostrado na Figura 1 ou SEQ ID NO: 18. Em algumas modalidades, uma região constante de imunoglobulina mutante ou porção da mesma pode ter uma seqüência de aminoácido que é pelo menos

75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% idêntica à região constante de imunoglobulina (g) conforme mostrado na Figura 1. O polipeptídeo pode ainda compreender domínios de proteína adicionais. A molécula de CTLA4-Ig pode se referir a um monômero do polipeptídeo de CTLA4-Ig e também pode se referir às formas multiméricas do polipeptídeo, tais como dímeros, tetrâmeros e hexâmeros, etc. (ou outras espécies de elevado peso molecular). Moléculas de CTLA4-Ig são também capazes de ligação a CD80 e/ou CD86, moléculas de CTLA4-Ig incluem moléculas mutantes de CTLA4-Ig, tais como "moléculas de beta polipeptídeos," por exemplo, CTLA4^{A29YL104E}-Ig. Por exemplo, CTLA4-Ig compreende moléculas de CTLA4-Ig e CTLA4^{A29YL104E}-Ig compreende moléculas de beta polipeptídeos (um exemplo de moléculas mutantes de CTLA4-Ig).

Conforme usado aqui, o termo "domínio extracelular de CTLA4" se refere a um domínio de proteína compreendendo toda ou uma porção da seqüência de aminoácido mostrada em SEQ ID NO: 18, que se liga a B7-1 (CD80) e/ou B7-2 (CD86). Em algumas modalidades, um domínio extracelular de CTLA4 podem compreender um polipeptídeo tendo uma seqüência de aminoácido que é pelo menos 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% idêntica aos aminoácidos 27-150 de SEQ ID NO: 2, os quais são os mesmos aminoácidos mostrados em SEQ ID NO: 18. O aminoácido 151 de SEQ ID NO: 2 é um aminoácido de junção.

Conforme usado aqui, o termo "beta polipeptídeo" se refere a um polipeptídeo de CTLA4-Ig mutante que (1) compreenda seqüência de aminoácido de SEQ ID NO: 18 em que o aminoácido na posição 29 sofreu mutação para tirosina e o aminoácido na posição 104 sofreu mutação para glutamato, opcionalmente com várias mutações adicionais e uma região constante de imunoglobulina ou uma porção da mesma; e (2) é capaz de ligação a CD80 e/ou CD86. Em algumas modalidades, por exemplo, um beta polipeptídeo compreende pelo menos a seqüência de aminoácido do domínio extracelular de CTLA4^{A29YL104E}-Ig (conforme mostrado em SEQ ID NO: 24). Exemplos não limitativos de beta polipeptídeos incluem belatacept e SEQ ID NOS: 4 e 11-16. Em determinadas modalidades, a região constante

de imunoglobulina ou porção da mesma pode ser do tipo silvestre ou mutante ou modificada. Em determinadas modalidades, a região constante de imunoglobulina ou porção da mesma pode ser de mamífero, incluindo de ser humano ou camundongo. Exemplos não limitativos adicionais de beta polipeptídeos incluem um beta polipeptídeo compreendendo uma ou mais mutações de aminoácido na região constante de imunoglobulina ou porção da mesma (por exemplo, substituição de cisteína 120 de SEQ ID NO: 4) e um beta polipeptídeo compreendendo outras mutações em uma ou mais das posições de aminoácido 25, 30, 93, 96, 103 ou 105 de SEQ ID NO: 18. Uma molécula de beta polipeptídeo compreende um beta polipeptídeo. Uma molécula de beta polipeptídeo pode se referir a um monômero do beta polipeptídeo e formas multiméricas do beta polipeptídeo, tais como dímeros, tetrâmeros e hexâmeros, etc. Por exemplo, belatacept compreende moléculas de beta polipeptídeo. Moléculas de beta polipeptídeo são ainda descritas no Pedido Provisório U.S. No. 60/849.543 depositado em 5 de Outubro de 2006, o qual é incorporado aqui por referência em sua totalidade.

Conforme usado aqui, os termos "glutamato" e "ácido glutâmico" são usados permutavelmente.

Conforme usado aqui, o termo "dímero" se refere a uma proteína de CTLA4-Ig ou molécula de CTLA4-Ig composta de dois polipeptídeos de CTLA4-Ig ou monômeros ligados ou unidos juntos. A ligação entre monômeros de um dímero pode ser uma ligação ou interação não covalente, uma ligação ou interação covalente ou ambos. Um exemplo de um dímero de CTLA4-Ig é mostrado na Figura 4. Uma proteína de CTLA4-Ig ou molécula de CTLA4-Ig composta de dois monômeros idênticos é um homodímero. Um homodímero de CTLA4-Ig também abrange uma molécula compreendendo dois monômeros que podem diferir ligeiramente quanto à seqüência. Um homodímero abrange um dímero onde os monômeros unidos juntos têm substancialmente a mesma seqüência. Os monômeros compreendendo um homodímero compartilham homologia estrutural considerável. Por exemplo, as diferenças na seqüência podem ser em virtude de modificações de processamento N-terminais do monômero.

Conforme usado aqui, "mutação conservativa" se refere a uma alteração em uma seqüência de ácido nucleico que substitui um aminoácido por outro da mesma classe (por exemplo, substituição de um aminoácido não polar por outro, tais como isoleucina, valina, leucina ou metionina; ou substituição de um aminoácido polar por outro, tais como substituição de arginina por lisina, ácido glutâmico por ácido aspártico ou glutamina por asparagina).

Conforme usado aqui, "mutação não conservativa" se refere a uma alteração em uma seqüência de ácido nucleico que substitui um aminoácido por outro de uma classe diferente (por exemplo, substituição de um aminoácido básico, tais como lisina, arginina ou histidina, por um aminoácido ácido, tais como ácido aspártico ou ácido glutâmico). Por exemplo, um aminoácido pode ser bioquimicamente dissimilar de outro aminoácido baseado no tamanho, carga, polaridade, reatividade ou outras de tais características dos aminoácidos.

Conforme usado aqui, "isolado" se refere a uma molécula que é tirada de seu ambiente nativo e está em um ambiente diferente daquele no qual a molécula ocorre naturalmente ou uma substância (por exemplo, uma proteína) que é parcial ou completamente recuperada ou separada de outros componentes de seu ambiente, de modo que a substância (por exemplo, proteína) é a espécie predominante (por exemplo, espécie de proteína) presente na composição, mistura ou coleção de componentes resultantes (por exemplo, em uma base molar, ela é mais abundante do que qualquer outra espécie individual na composição). Por exemplo, um preparado pode consistir de mais de cerca de 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 ou 95% de CTLA4-Ig isolada. "Isolada" não exclui misturas de moléculas de CTLA4-Ig com outras moléculas de CTLA4-Ig do ambiente no qual a molécula ocorre naturalmente. "Isolada" não exclui excipientes farmacologicamente aceitáveis combinados com CTLA4-Ig, em que a CTLA4-Ig foi recuperada de seu ambiente, tal como uma cultura de célula, uma cultura em batelada ou um bio-reator, etc. Conforme usado aqui, "isolamento" se refere à realização de um processo ou método

para obter uma molécula de CTLA4-Ig isolada.

Conforme usado aqui, o termo "CTLA4 solúvel" significa uma molécula que pode circular *in vivo* ou CTLA4 a qual não é ligada a uma membrana celular. Por exemplo, a CTLA4 solúvel pode incluir CTLA4-Ig a
5 qual inclui a região extracelular de CTLA4 ligada a uma Ig.

Conforme usado aqui, o termo "fração solúvel de uma cultura de célula" se refere à porção líquida de uma outra cultura de célula que não ou a qual é substancialmente isenta de componentes insolúveis, em partículas ou sólidos da cultura de célula, tais como células, membranas celulares e
10 núcleos. A fração solúvel pode ser, por exemplo, o sobrenadante resultante após centrifugação da cultura de célula ou o filtrado resultante após filtração da cultura de célula.

Conforme usado aqui, o termo "cassete de expressão" se refere a um ácido nucleico tendo pelo menos a região regulatória 5' (por exemplo, promotor) operavelmente ligada a uma seqüência de nucleotídeo que codifi-
15 ca um polipeptídeo e opcionalmente uma região de término não traduzida 3' (por exemplo, códon terminal e seqüência de poliadenilação). Sob condições apropriadas, um polipeptídeo codificado por um cassete de expressão é produzido pelo cassete de expressão. Um cassete de expressão pode também
20 ter uma ou mais seqüências de nucleotídeo que objetivam a integração do cassete de expressão em um sítio específico no genoma de uma célula hospedeira (por exemplo, veja Koduri e colaboradores, (2001) *Gene* 280: 87-95). Por exemplo, um cassete de expressão de polipeptídeo de CTLA4^{A29YL104E}-Ig derivado de um plasmídeo depositado como No. de Acesso
25 ATCC PTA-2104, é um exemplo de um cassete de expressão que codifica uma CTLA4^{A29YL104E}-Ig.

Conforme usado aqui, o termo "substancialmente purificada" se refere a uma composição compreendendo a molécula de CTLA4-Ig ou uma população selecionada de moléculas de CTLA4-Ig que é removida de seu
30 ambiente natural (por exemplo, é isolada) e é pelo menos 90% isenta, 91% isenta, 92% isenta, 93% isenta, 94% isenta, 95% isenta, 96% isenta, 97% isenta, 98% isenta, 99% isenta, 99,5% isenta ou 99,9% isenta de outros

componentes, tais como material celular ou meio de cultura, com o qual ela está naturalmente associada. Por exemplo, com relação a uma molécula de proteína de CTLA4-Ig recombinantemente produzida, o termo "substancialmente purificada" podem também se referir a uma composição compreendendo uma proteína de molécula de CTLA4-Ig que é removida do ambiente de produção, de modo que a molécula de proteína é pelo menos 90% isenta, 91% isenta, 92% isenta, 93% isenta, 94% isenta, 95% isenta, 96% isenta, 97% isenta, 98% isenta, 99% isenta, 99,5% isenta ou 99,9% isenta de moléculas de proteína as quais não são polipeptídeos de SEQ ID NO: 2 ou polipeptídeos mutantes de SEQ ID NO: 2 os quais são de interesse. "Substancialmente purificada" não exclui misturas de moléculas de CTLA4-Ig (tais como dímeros) com outras moléculas de CTLA4-Ig (tais como tetrâmeros). "Substancialmente purificada" não exclui excipientes ou veículos farmacêuticamente aceitáveis combinados com moléculas de CTLA4-Ig, em que as moléculas de CTLA4-Ig foram tiradas de seu ambiente nativo.

Conforme usado aqui, o termo "processo em larga escala" é usado permutavelmente com o termo "processo em escala industrial". O termo "vaso de cultura" é usado permutavelmente com "bio-reator", "reator" e "tanque".

Uma "cultura líquida" se refere à células (por exemplo, células de bactérias, planta, inseto, levedo ou animal) crescidas sobre suportes ou crescidas em suspensão em um meio nutriente líquido.

Uma "cultura original" se refere a uma cultura de célula crescida de forma a ser usada para inocular volumes maiores de meio de cultura. A cultura original pode ser usada para inocular volumes maiores de meios de forma a expandir o número de células em crescimento na cultura (por exemplo, células crescida em suspensão).

Conforme usado aqui, "cultura" se refere ao crescimento de uma ou mais células *in vitro* sob condições definidas ou controladas. Exemplos de condições de cultura as quais podem ser definidas incluem temperatura, mistura de gás, tempo e formulação de meio.

Conforme usado aqui, "expansão" se refere à cultura de uma ou

mais células *in vitro* para fins de obtenção de um número maior de células na cultura.

Conforme usado aqui, "população" se refere a um grupo de duas ou mais moléculas ("população de moléculas") ou células ("população de células") que são caracterizadas pela presença ou ausência de uma ou mais propriedades mensuráveis ou detectáveis. Em uma população homogênea, as moléculas ou células na população são caracterizadas pela mesma ou substancialmente as mesmas propriedades (por exemplo, as células de uma linhagem de célula clonal). Em uma população heterogênea, as moléculas ou células na população são caracterizadas por pelo menos uma propriedade que é a mesma, onde as células ou moléculas podem também exibir propriedades que não são as mesmas (por exemplo, uma população de moléculas de CTLA4-Ig tendo um teor médio de ácido siálico substancialmente similar, mas tendo um teor de manose não similar).

Conforme usado aqui, "agregado de espécies de elevado peso molecular" é usado permutavelmente com "espécies de elevado peso molecular" para se referir a uma molécula de CTLA4-Ig compreendendo pelo menos três monômeros de CTLA4-Ig. Por exemplo, um agregado de espécies de elevado peso molecular pode ser um tetrâmero, um pentâmero ou um hexâmero.

"Rendimento percentual (%)" se refere ao rendimento real dividido pelo rendimento teórico e esse valor multiplicado por 100. O rendimento real pode ser fornecido como o peso em grama ou em molécula (por exemplo, um rendimento molar). O rendimento teórico pode ser fornecido como o rendimento ideal ou matematicamente calculado.

Conforme usado aqui uma quantidade de MCP-1" se refere a (1) uma quantidade de MCP-1 (Proteína-1 quimiotática de monócito, especialmente MCP-1 de hámster) sozinha ou (2) uma quantidade de proteína "semelhante à MCP-1", fragmentos de MCP-1, e/ou fragmentos de proteínas homólogas à MCP-1 (por exemplo, em cada um dos casos antes mencionados, conforme pode ser de reação cruzada com um ensaio de anticorpo (por exemplo ELISA policlonal para a detecção de MCP-1). A ausência de MCP-1 (e/ou proteínas homólogas à MCP-1, fragmentos de MCP-1 e/ou fragmentos

de proteínas homólogas à MCP-1) é considerada onde nenhum limite mínimo é proporcionado com relação a uma faixa de quantidades de MCP-1.

5 Conforme usado aqui, "teor de glicosilação" se refere a uma quantidade de resíduos de açúcar N-ligados ou O-ligados covalentemente presos a uma molécula de proteína, tal como uma glicoproteína, tal como uma molécula de CTLA4-Ig.

10 Conforme usado aqui, o termo "proporção molar de ácido siálico para proteína" é calculada e fornecida como o número de moles de moléculas de ácido siálico por moles de proteína (moléculas ou dímero de CTLA4-Ig).

Conforme usado aqui, o termo "glicoproteína" se refere a uma proteína que é modificada através da adição de um ou mais carboidratos, incluindo a adição de um ou mais resíduos de açúcar.

15 Conforme usado aqui, o termo "sialilação" se refere à adição de um resíduo de ácido siálico a uma proteína, incluindo uma glicoproteína.

20 Conforme usado aqui, o termo "isoforma de glicoproteína" se refere a uma molécula caracterizada por seu teor de carboidrato e ácido siálico, conforme determinado através de eletroforese em gel de focalização isoelétrica (IEF) ou outros métodos adequados para distinguir diferentes proteínas em uma mistura por seu peso molecular, carga e/ou outras características. Por exemplo, cada banda distinta observada sobre um gel de IEF representa moléculas que têm um ponto isoelétrico (pI) em particular e, assim, a mesma carga global líquida. Uma isoforma de glicoproteína pode ser uma banda distinta observada sobre um gel de IEF, onde cada banda pode ser
25 uma população de moléculas que tem um pI em particular.

"Tolerância imune" se refere a um estado de não responsividade a um antígeno ou grupo de antígenos específico ao qual uma pessoa é normalmente responsiva (por exemplo, um estado no qual uma célula T não pode mais responder ao antígeno).

30 "Potência" se refere a uma medida da resposta como uma função da concentração de ligante. Por exemplo, potência agonista é quantificada como a concentração de ligante que produz metade do efeito máximo

(EC₅₀). Uma definição farmacológica não limitativa de potência inclui componentes de afinidade e eficácia, onde eficácia é capacidade de um fármaco de estimular uma resposta uma vez ligado. Potência está relacionada à afinidade, mas a potência e a afinidade são diferentes medidas de ação de fármaco.

5
Conforme usado aqui, "veículo farmacologicamente aceitável" se refere a um veículo para um agente farmacologicamente ativo. O veículo facilita a distribuição do agente ativo ao local alvo sem terminar a função do agente. Exemplos não limitativos de formas adequadas do veículo incluem
10 soluções, cremes, géis, emulsões de gel, geléias, pastas, loções, ungüentos, sprays, pomadas, pós, misturas sólidas, aerossóis, emulsões (por exemplo, água em óleo ou óleo em água), soluções aquosas de gel, soluções aquosas, suspensões, linimentos, tinturas e emplastros adequados para administração tópica.

15
Conforme usado aqui, a frase "composição farmacologicamente aceitável" (ou "composição farmacêutica") se refere a uma composição que é aceitável para administração farmacêutica, tal como a um ser humano. Tal composição pode incluir substâncias que são impuras em um nível não excedendo a um nível aceitável para administração farmacêutica, tal nível incluindo uma ausência de tais impurezas) e pode incluir excipientes, veículos,
20 carreadores e outros ingredientes inativos farmacologicamente aceitáveis, por exemplo, para formular tal composição para facilidade de administração, além de qualquer (quaisquer) agente(s) ativo(s). Por exemplo, uma composição de CTLA4-Ig farmacologicamente aceitável pode incluir MCP-1 ou DNA,
25 na medida em que essas substâncias estejam em um nível aceitável para administração a seres humanos.

"Substância de fármaco" é o ingrediente farmacêutico ativo contido em uma composição farmacêutica. O termo "substância de fármaco" inclui um ingrediente farmacêutico ativo em solução e/ou na forma tamponada.
30 "Produto de fármaco" é uma composição farmacêutica contendo substância de fármaco formulada para administração farmacêutica. Para fins dos ensaios contidos nos Exemplo e em qualquer parte aqui, a qual possa se

referir a uma substância de fármaco e/ou produto de fármaco, substâncias de fármaco e produtos de fármaco exemplificativos que podem ser ensaiados são como segue.

- 5 Uma substância de fármaco exemplificativa para moléculas de CTLA4-Ig compreendendo SEQ ID NOs: 2, 5, 6, 7, 8, 9, 10 ou 18, é proteína de CTLA4-Ig em uma concentração de 50 mg/mL, em uma solução aquosa tamponada (fosfato de sódio a 25 mM, cloreto de sódio a 50 mM, pH de 7,5).

- 10 Um produto de fármaco exemplificativo para moléculas de CTLA4-Ig compreendendo SEQ ID NOs: 2, 5, 6, 7, 8, 9, 10 ou 18, é 250 mg de proteína de CTLA4-Ig liofilizada, 500 mg de maltose, 17,2 mg de fosfato de sódio monobásico e 14,6 mg de cloreto de sódio, pH de 7,0 – 8,0; ou

Composição de produto de fármaco de proteína de CTLA4-Ig liofilizada (250 mg / frasco)

Componente	Quantidade (mg/frasco) ^a
Proteína de CTLA4-Ig	262,5
Monohidrato de maltose	525
Monohidrato de fosfato de sódio monobásico ^b	18,1
Cloreto de sódio ^b	15,3
Ácido clorídrico	Ajustar para pH de 7,5
Hidróxido de sódio	Ajustar para pH de 7,5

- 15 Uma substância de fármaco exemplificativa para moléculas de CTLA4-Ig compreendendo SEQ ID NOs: 4, 11, 12, 13, 14, 15, 16 ou 24 é proteína de CTLA4-Ig em uma concentração de 25 mg/ml, em uma solução aquosa tamponada (fosfato de sódio a 25 mM, cloreto de sódio a 10 mM, pH de 7,5).

- 20 Um produto de fármaco exemplificativo para moléculas de CTLA4-Ig compreendendo SEQ ID NOs: 4, 11, 12, 13, 14, 15, 16 ou 24:

**Composição de produto de fármaco de CLTA4^{A29YL104E}-Ig
liofilizada – 100 mg / frasco**

Componente	Quantidade/frasco (mg)
CLTA4 ^{A29YL104E} -Ig	110
Sacarose	220
Monohidrato de fosfato de sódio monobásico	15,18
Cloreto de sódio	2,55
Hidróxido de sódio a 1N	Ajustar para pH de 7,5
Ácido clorídrico a 1N	Ajustar para pH de 7,5

Conforme usado aqui, os termos "meio de cultura" e "meio de cultura de célula" e "meio de alimentação" e "meio de fermentação" se referem à soluções nutrientes usadas para crescimento ou manutenção de células, especialmente células de mamífero. Sem limitação, Essas soluções proporcionam, comumente, pelo menos um componente de uma ou mais das seguintes categorias: (1) uma fonte de energia, usualmente na forma de um carboidrato, tal como glicose; (2) todos os aminoácidos essenciais e usualmente o conjunto básico de vinte aminoácidos mais cisteína; (3) vitaminas e/ou outros compostos orgânicos requeridos em baixas concentrações; (4) ácidos graxos livres ou lipídios, por exemplo, ácido linoleico; e (5) elementos vestigiais, onde elementos vestigiais são definidos como compostos inorgânicos ou elementos que ocorrem naturalmente que são, tipicamente, requeridos em concentrações muito baixas, usualmente na faixa de micro molar. A solução nutriente pode ser suplementada eletivamente com um ou mais componentes de qualquer uma das seguintes categorias: (1) hormônios e outros fatores de crescimento, tais como soro, insulina, transferrina e fator de crescimento epidérmico; (2) sais, por exemplo, magnésio, cálcio e fosfato (3) tampões, tal como HEPES; (4) nucleosídeos e bases, tais como adenosina, timidina e hipoxantina; (5) proteína e hidrolisatos teciduais, por exemplo, peptona ou misturas de peptona as quais podem ser obtidas de gelatina purificada, material vegetal ou subproduto animais; (6) antibióticos, tal como gentamicina; (7) agentes protetores de células, por exemplo, polioli pluronic; e (8) galactose.

O termo "inoculação", conforme usado aqui, se refere à adição

de células a uma meio de cultura no início de cultura.

O termo "fase de crescimento" de uma cultura de célula, conforme usado aqui, se refere ao período de crescimento celular exponencial (por exemplo, a fase log), onde as células estão primariamente em divisão rapidamente. Durante essa fase, a taxa de aumento na densidade de células viáveis é maior do que em qualquer outro ponto de tempo.

Conforme usado aqui, o termo "fase de produção" de uma cultura de célula se refere ao período de tempo durante o qual o crescimento celular está estacionário ou é mantido em ou próximo de um nível constante. A densidade de células viáveis permanece aproximadamente durante um determinado período de tempo. Crescimento de célula logarítmico terminou e a produção de proteína é a atividade primária durante a fase de produção. O meio, nesse momento, geralmente é suplementado para suportar produção contínua de proteína e obter o produto de glicoproteína desejado.

Conforme usado aqui, os termos "expressão" ou "expressa" são usados para se referir à transcrição e tradução que ocorrem dentro de uma célula. O nível de expressão de um produto genético em uma célula hospedeira pode ser determinado com base na quantidade de mRNA correspondente que está presente na célula ou na quantidade de uma proteína codificada pelo produto genético que é produzida por uma célula ou ambos. Conforme usado aqui, "glicosilação" se refere à adição de estruturas de oligossacarídeos complexos em uma proteína em sítios específicos dentro da cadeia polipeptídica. Glicosilação de proteínas e o subsequente processamento dos carboidratos adicionados pode afetar a estrutura e duplicação da proteína, a estabilidade da proteína, incluindo meia-vida da proteína e propriedades funcionais de uma proteína. Glicosilação de proteína pode ser dividida em duas classes em virtude do contexto de seqüência onde a modificação ocorre: glicosilação N-ligada e glicosilação O-ligada. Polissacarídeos O-ligados são ligados a um grupo hidroxila, usualmente ao grupo hidroxila de um resíduo de serina ou treonina. O-glicanas não são adicionadas a cada resíduo de serina e treonina. Oligossacarídeos O-ligados são usualmente mono ou bi-antênários, isto é, eles compreendem uma ou no máximo duas

ramificações (antenas) e compreendem de um a quatro tipos diferentes de resíduos de açúcar, os quais são adicionados um por um. Polissacarídeos N-ligados são presos ao nitrogênio da amida de uma asparagina. Apenas asparaginas que são partes de uma de duas seqüências tripeptídicas, quer

5 asparagina-X – serina ou asparagina – X – treonina (onde X é qualquer aminoácido exceto prolina), são alvos para glicosilação. Oligossacarídeos N-ligados podem ter de uma a quatro ramificações referidas como mono -, bi-, tri- e tetra-antenárias. As estruturas de resíduos de açúcar encontrados em oligossacarídeos O- e N-ligados são diferentes. A despeito dessa diferença,

10 o resíduo terminal sobre cada ramificação de um polissacarídeo O- e N-ligado pode ser modificado através de uma molécula de ácido siálico, uma modificação referida como revestimento de ácido siálico. O ácido siálico é um nome comum para uma família de monossacarídeos com nove carbonos únicos, os quais podem ser ligados a outros oligossacarídeos. Dois mem-

15 bros na família são ácido N-acetil neuramínico, abreviado como Neu5Ac ou NANA e ácido N-glicolil neuramínico, abreviado como Neu5Gc ou NGNA. A forma mais comum de ácido siálico em seres humanos é NANA. Ácido N-acetil neuramínico (NANA) é a espécie de ácido siálico primária presente em moléculas de CTLA4-Ig. Contudo, deve ser notado que níveis mínimos, mas

20 detectáveis de ácido N-glicolil neuramínico (NGNA) também estão presentes em moléculas de CTLA4-Ig. Além disso, o método descrito aqui pode ser usado para determinar o número de moles de ácido siálico para NANA e NGNA e, portanto, os níveis de NANA e NGNA são determinados e reportados para moléculas de CTLA4-Ig. Oligossacarídeos O- e N-ligados têm dife-

25 rentes números de ramificações, as quais proporcionam diferentes números de posições às quais moléculas de ácido siálico podem ser presas. Oligossacarídeos N-ligados podem proporcionar até quatro posições de fixação para ácidos siálicos, enquanto que oligossacarídeos O-ligados podem proporcionar 2 sítios para fixação de ácido siálico.

30 Conforme usado aqui, o termo "processo em larga escala" pode ser usado permutavelmente com o termo "processo em escala industrial". Além disso, o termo "vaso de cultura" pode ser usado permutavelmente com

"bio-reator", "reator" e "tanque".

Conforme usado aqui, a frase "solução(ões) de trabalho" se refere à soluções que são usadas em um método. Exemplos não limitativos de soluções de trabalho incluem tampões.

- 5 Conforme usado aqui, "material de referência" se refere a um material que é usado como um padrão em um método. Por exemplo, um material de referência pode ser usado como um padrão com o qual amostras experimentais são comparadas.

- 10 A ausência de uma substância é considerada onde nenhum limite mínimo é proporcionado com relação a uma faixa de quantidades de tal substância.

- 15 Conforme usado aqui, as temperaturas mencionadas em referência à cultura de células se referem ao ajuste de temperatura sobre o instrumento que regula a temperatura do bio-reator. Naturalmente, a temperatura da cultura líquida em si adotará o ajuste de temperatura sobre o instrumento que regula a temperatura para o bio-reator. Onde a temperatura se refere a uma cultura de células que é mantida sobre uma prateleira em uma incubadora, a temperatura, então, se refere à temperatura da prateleira da incubadora.

20 **Modalidades não limitativas da invenção:**

- 25 A invenção proporciona composições de moléculas de CTLA4-Ig e composições de moléculas mutantes de CTLA4-Ig, tal como CTLA4^{A29YL104E}-Ig. A invenção proporciona composições com determinadas características, tais como determinadas quantidades de endotoxina bacteriana, biocarga, um pl dentro de uma faixa determinada (ou determinadas bandas de IEF dentro de uma faixa determinada de pl), uma determinada quantidade de monômero (cadeia simples), dímero ou espécies de elevado peso molecular (tal como tetrâmero), um determinado padrão de peptídeo trípico, um determinado conjunto de bandas principais sobre SDS-PAGE,
- 30 um determinado teor de DNA, uma quantidade de MCP-1 não excedendo um determinado máximo, uma quantidade de proteína celular não excedendo a um determinado máximo, uma quantidade de Triton X-100 não exce-

5 dando a um determinado máximo, uma quantidade de Proteína A não excedendo a um determinado máximo, um determinado perfil de carboidratos N-
ligados, uma determinada composição de amino monossacarídeos (GlcNac, GalNAc), uma determinada composição de monossacarídeos neutros (galac-
tose, fucose, manose), uma determinada quantidade de ligação a B7, uma
10 determinada quantidade de atividade em um ensaio celular de inibição de IL-2 e /ou uma determinada composição de ácido siálico (NANA, NGNA), em
cada caso onde as referidas determinadas quantidades podem ser uma faixa ou faixas. A invenção proporciona composições com qualquer uma das ca-
racterísticas antes mencionadas ou mais de uma das características antes
15 mencionadas, até e incluindo todas as características antes mencionadas em qualquer e todas as possíveis permutações ou combinações. A invenção
inclui todas as composições da invenção na forma isolada ou substancialmente purificada ou não na forma isolada ou substancialmente purificada. A
invenção proporciona composições as quais são composições farmacêuti-
cas.

Em um aspecto, a invenção é dirigida a um método para obtenção de uma composição compreendendo uma população isolada de moléculas de CTLA4-Ig de um meio de cultura líquida, o meio compreendendo uma
20 população inicial de moléculas de CTLA4-Ig, em que (1) moléculas de CTLA4-Ig da população inicial têm um ou mais resíduos de ácido siálico, (2) o
número de resíduos de ácido siálico por molécula de CTLA4-Ig varia dentro da população inicial e (3) a população inicial compreende dímero de CTLA4-Ig
e agregado de espécies de elevado peso molecular e o método compre-
25 ende (a) coleta, do meio de cultura líquida, de uma cultura de células de mamífero expressando moléculas de CTLA4-Ig; (b) separação das moléculas
de CTLA4-Ig dos componentes celulares; (c) separação de dímeros de CTLA4-Ig de agregados moleculares de espécies de elevado peso molecular
de CTLA4-Ig; e (d) separação das moléculas de CTLA4-Ig em duas ou mais
30 frações, em que pelo menos uma fração tem uma maior proporção molar de ácido siálico para moléculas de CTLA4-Ig comparado com pelo menos uma
outra fração e em que as etapas (b), (c) e (d) são realizadas simultaneamen-

te ou em qualquer ordem, de modo a obter a referida composição.

Em uma modalidade do método da invenção, a coleta na etapa (a) compreende obtenção de uma fração solúvel da cultura líquida. Em outra modalidade, as etapas (c) e (d) do método compreendem o uso de cromatografia em coluna de modo a obter frações de moléculas de CTLA4-Ig tendo diferentes teores de ácido siálico. Em ainda outra modalidade, o método ainda compreende uso de cromatografia em coluna para reduzir o teor de MCP-1 na composição.

Em algumas modalidades do método da invenção, as moléculas de CTLA4-Ig compreendem um ou mais polipeptídeos tendo SEQ ID NO: 2, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10. Em outras modalidades, as moléculas de CTLA4-Ig compreendem um ou mais polipeptídeos tendo SEQ ID NO: 4, 11, 12, 13, 14, 15 ou 16.

Em algumas modalidades do método da invenção, a fração em (d) tendo a maior proporção molar de ácido siálico para moléculas de CTLA4-Ig exibe uma proporção molar média de ácido siálico para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 8 a cerca de 14. Em modalidades específicas, a proporção molar média é de cerca de 8 a cerca de 11, de cerca de 8 a cerca de 10 ou de cerca de 8 a cerca de 9.

A invenção proporciona um método para isolamento de moléculas de CTLA4-Ig, o método compreendendo: (i) obtenção de uma fração solúvel de uma cultura líquida compreendendo células de mamífero que produzem composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig; (ii) sujeição da fração solúvel à cromatografia de troca de ânions para obter uma composição eluída compreendendo moléculas de CTLA4-Ig; (iii) sujeição da composição da etapa (ii) à cromatografia de interação hidrofóbica, de modo a obter uma composição enriquecida compreendendo moléculas de CTLA4-Ig; (iv) sujeição da composição de (iii) à cromatografia por afinidade para obter uma composição adicionalmente enriquecida compreendendo moléculas de CTLA4-Ig; e (v) sujeição da composição de (iv) à cromatografia de troca de ânions. Em uma modalidade, a composição obtida na etapa (ii) é caracterizada por: (a) uma média de 6,0-10,1 moles de NANA por mol de molécula

de CTLA4Ig; e (b) uma área de menos de ou igual a 2,57 por cento de espécies de elevado peso molecular de CTLA4-Ig conforme determinado através de cromatografia por exclusão de tamanho e detecção espectrofotométrica. Em outra modalidade, a composição obtida na etapa (iii) é caracterizada por:

5 (a) uma média de 6,8-11,4 moles de NANA por mol de molécula de CTLA4Ig; e (b) uma área de menos de ou igual a 2,5 por cento de espécies de elevado peso molecular de CTLA4-Ig conforme determinado através de cromatografia por exclusão de tamanho e detecção espectrofotométrica. Em uma outra modalidade, a composição obtida na etapa (iv) é caracterizada por:

10 (a) uma média de 8,0-11,0 moles de NANA por mol de molécula de CTLA4-Ig; e (b) uma área de menos de ou igual a 2,5 por cento de espécies de elevado peso molecular de CTLA4-Ig. Em outra modalidade, a composição obtida na etapa (v) é caracterizada por: (a) uma média de 8,0-11,9 moles de NANA por mol de molécula de CTLA4-Ig; e (b) uma área de menos de

15 ou igual a 2,0 por cento sendo espécies de elevado peso molecular de CTLA4-Ig conforme determinado através de cromatografia por exclusão de tamanho e detecção espectrofotométrica (SPD). Em uma modalidade, um exemplo de SPD pode ser a 280 nm.

A presente invenção também proporciona um método para isolamento de uma composição de moléculas de CTLA4-Ig compreendendo: (i)

20 obtenção de uma fração solúvel de uma cultura líquida compreendendo células de mamífero que produzem moléculas de CTLA4-Ig e, em qualquer ordem, (ii) sujeição da fração solúvel à cromatografia de troca de ânions de modo a obter uma composição enriquecida e eluída compreendendo moléculas de CTLA4-Ig; (iii) sujeição da fração solúvel à cromatografia de interação hidrofóbica, de modo a obter uma composição enriquecida e eluída

25 compreendendo moléculas de CTLA4-Ig; (iv) sujeição da fração solúvel à cromatografia por afinidade de modo a obter uma composição enriquecida e eluída compreendendo moléculas de CTLA4-Ig; e (v) sujeição da fração solúvel à cromatografia de troca de ânions de modo a obter uma composição

30 enriquecida e eluída compreendendo moléculas de CTLA4-Ig. Em outro aspecto, a presente invenção proporciona um método para isolamento de uma

composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig, o método compreendendo: (i) obtenção de uma fração solúvel de uma cultura líquida compreendendo células de mamífero que produzem moléculas de CTLA4-Ig; (ii) sujeição da fração solúvel à cromatografia de troca de ânions para obter uma
5 composição eluída compreendendo moléculas de CTLA4-Ig; (iii) sujeição de um produto de proteína da etapa (ii) à cromatografia de interação hidrofóbica, de modo a obter uma composição enriquecida compreendendo moléculas de CTLA4-Ig; (iv) sujeição de um produto de proteína de (iii) à cromatografia por afinidade para obter uma composição adicionalmente enriquecida
10 compreendendo moléculas de CTLA4-Ig; e (v) sujeição de um produto de proteína de (iv) à cromatografia de troca de ânions, de modo a isolar uma composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig.

Em uma modalidade, a composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig obtida na etapa (ii) do método é caracterizada por: (a) uma
15 proporção molar média de NANA para moléculas de CTLA4-Ig de 6,0 a 10,1 e (b) uma área de menos de ou igual a 2,5 por cento espécies de elevado peso molecular de CTLA4-Ig conforme determinado através de cromatografia por exclusão de tamanho e detecção espectrofotométrica. Em outra modalidade, a composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig obtida na
20 etapa (iii) do método é caracterizada pelo fato de que (a) a área de espécies de elevado peso molecular de CTLA4-Ig é menos de cerca de 2,5% conforme determinado através de cromatografia por exclusão de tamanho e detecção espectrofotométrica, (b) proteína celular é menos de cerca de 95 ng/ml e (c) MCP-1 é menos de cerca de 5 ppm. Em uma modalidade adicional, a
25 composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig obtida na etapa (iii) do método é caracterizada por: (a) uma proporção molar média de NANA para moléculas de CTLA4-Ig de 6,8 a 11,4 e (b) uma área de menos de ou igual a 2,5 por cento espécies de elevado peso molecular de CTLA4-Ig conforme determinado através de cromatografia por exclusão de tamanho e detecção
30 espectrofotométrica. Em uma outra modalidade, a composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig obtida na etapa (iv) do método é caracterizada por: (a) uma proporção molar média de NANA para moléculas de CTLA4-

Ig de 8,0 a 11,0 e (b) uma área de menos de ou igual a 2,5 por cento espécies de elevado peso molecular de CTLA4-Ig conforme determinado através de cromatografia por exclusão de tamanho e detecção espectrofotométrica. Em ainda outra modalidade, a composição obtida na etapa (iii) da invenção é

5 caracterizado pelo fato de que a área percentual de espécies de elevado peso molecular de CTLA4-Ig é menos de 2,5% conforme determinado através de cromatografia por exclusão de tamanho e detecção espectrofotométrica. Em ainda outra modalidade, a proteína composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig na etapa (v) do método é caracterizada por: (a) uma

10 proporção molar média de NANA para moléculas de CTLA4-Ig de 8,0 a 11,9 e (b) uma área de menos de ou igual a 2,0 por cento espécies de elevado peso molecular de CTLA4-Ig conforme determinado através de cromatografia por exclusão de tamanho e detecção espectrofotométrica.

A invenção também proporciona, em outro aspecto, um método

15 para isolamento de uma composição de moléculas de CTLA4-Ig, compreendendo: (i) obtenção de uma fração solúvel de uma cultura líquida compreendendo células de mamífero que produzem moléculas de CTLA4-Ig e, em qualquer ordem, (ii) sujeição da fração solúvel à cromatografia de troca de ânions de modo a obter uma composição enriquecida e eluída compreendendo

20 moléculas de CTLA4-Ig; (iii) sujeição da fração solúvel à cromatografia de interação hidrofóbica, de modo a obter uma composição enriquecida e eluída compreendendo moléculas de CTLA4-Ig; (iv) sujeição da fração solúvel à cromatografia por afinidade de modo a obter uma composição enriquecida e eluída compreendendo moléculas de CTLA4-Ig; e (v) sujeição da fração

25 solúvel à cromatografia de troca de ânions de modo a obter uma composição enriquecida e eluída compreendendo moléculas de CTLA4-Ig, em que a composição obtida na etapa (iii) é caracterizada pelo fato de que o percentual da área de espécies de elevado peso molecular de CTLA4-Ig é menos de cerca de 2,5%, proteína celular é menos de 95 ng/ml e MCP-1 é

30 menos de cerca de 5 ppm.

Em ainda outro aspecto, a invenção proporciona um método para isolamento de uma composição de moléculas de CTLA4-Ig, o método

compreendendo: (i) obtenção de uma fração solúvel de uma cultura líquida compreendendo células de mamífero que produzem moléculas de CTLA4-Ig e, em qualquer ordem, (ii) sujeição da fração solúvel à cromatografia de troca de ânions de modo a obter uma composição enriquecida e eluída compreendendo moléculas de CTLA4-Ig; (iii) sujeição da fração solúvel à cromatografia de interação hidrofóbica, de modo a obter uma composição enriquecida e eluída compreendendo moléculas de CTLA4-Ig; (iv) sujeição da fração solúvel à cromatografia por afinidade de modo a obter uma composição enriquecida e eluída compreendendo moléculas de CTLA4-Ig; e (v) sujeição da fração solúvel à cromatografia de troca de ânions de modo a obter uma composição enriquecida e eluída compreendendo moléculas de CTLA4-Ig, em que a composição obtida na etapa (iii) é caracterizado pelo fato de que o percentual da área de espécies de elevado peso molecular de CTLA4-Ig é menos de cerca de 2,5%, proteína celular é menos de 95 ng/ml, MCP-1 é menos de cerca de 5 ppm e a proporção molar média de NANA para moléculas de CTLA4-Ig é de cerca de 8,0 a cerca de 12.

Em uma modalidade, a cromatografia de troca de ânions da etapa (ii) do método é realizada usando um tampão de lavagem compreendendo HEPES a cerca de 75 mM e NaCl a cerca de 360 mM e tendo um pH de cerca de 8,0. Em outra modalidade, a cromatografia de troca de ânions da etapa (ii) da invenção é realizada usando um tampão de eluição compreendendo HEPES a cerca de 25 mM e NaCl a cerca de 850 mM e tendo um pH de cerca de 7,0. Em uma modalidade adicional, a cromatografia de interação hidrofóbica da etapa (iii) do método é realizada usando um único tampão de lavagem compreendendo HEPES a cerca de 25 mM e NaCl a cerca de 850 mM e tendo um pH de cerca de 7,0. Em uma outra modalidade, a cromatografia por afinidade da etapa (iv) do método é realizada usando um tampão de lavagem compreendendo Tris a cerca de 25 mM e NaCl a cerca de 250 mM e tendo um pH de cerca de 8,0. Em ainda outra modalidade, a cromatografia por afinidade da etapa (iv) do método é realizada usando um tampão de eluição compreendendo Glicina a cerca de 100 mM e tendo um pH de cerca de 3,5. Em ainda outra modalidade, a cromatografia de troca de ân-

nions da etapa (v) do método é realizada usando um tampão de lavagem compreendendo HEPES a cerca de 25 mM e NaCl de cerca de 120 mM a NaCl a cerca de 130 mM e tendo um pH de cerca de 8,0. Em ainda outra modalidade, a cromatografia de troca de ânions da etapa (v) do método é

5 realizada usando um tampão de eluição compreendendo HEPES a cerca de 25 mM e NaCl a cerca de 200 mM e tendo um pH de cerca de 8,0. Em ainda outra modalidade, a cromatografia de troca de ânions da etapa (ii) do método é realizada usando uma coluna tendo uma resina de troca de ânions compreendendo um grupo funcional amina primária, secundária, terciária ou

10 quaternária. Em uma modalidade específica, a resina compreende um grupo funcional amina quaternária. Em ainda outra modalidade, a cromatografia de interação hidrofóbica da etapa (iii) do método é realizada usando uma resina de interação hidrofóbica compreendendo um grupo funcional fenila, um octila, um propila, um alcóxi, um butila ou um isoamila. Em uma modalidade es-

15 pecífica, o grupo funcional compreende um grupo funcional fenila. Em ainda outra modalidade, a cromatografia por afinidade da etapa (iv) do método é realizada usando uma resina de cromatografia por afinidade compreendendo Proteína A.

Em ainda outro aspecto, a invenção proporciona um método para

20 preparo de uma composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig, compreendendo purificação de moléculas de CTLA4-Ig de uma cultura de célula líquida, em que uma composição purificada de CTLA4-Ig compreende (a) uma quantidade farmacologicamente aceitável de MCP-1 por mg de moléculas de CTLA4-Ig e (b) uma área de menos de 2,5% de espécies de eleva-

25 do peso molecular de CTLA4-Ig conforme determinado através de cromatografia por exclusão de tamanho e detecção espectrofotométrica. Em uma modalidade, a quantidade farmacologicamente aceitável de MCP-1 compreende cerca de 40 a cerca de 0,5 ng/mg de moléculas de CTLA4-Ig. Em outra modalidade, a quantidade farmacologicamente aceitável de MCP-1 compre-

30 ende cerca de 35 a cerca de 0,5 ng/mg de moléculas de CTLA4-Ig. Em uma modalidade adicional, a quantidade farmacologicamente aceitável de MCP-1 compreende cerca de 10 a cerca de 0,5 ng/mg de moléculas de CTLA4-Ig.

Em uma outra modalidade, a cromatografia por afinidade da etapa (iv) do método é realizada usando uma coluna compreendendo uma resina capaz de reduzir a MCP-1 no produto de proteína eluído. Em ainda outra modalidade, a cromatografia de interação hidrofóbica da etapa (iii) do método é realizada usando uma resina de interação hidrofóbica, em que a resina é capaz de (a) separação de dímeros de CTLA4-Ig de espécies de elevado peso molecular de CTLA4-Ig; (b) aumento do teor de ácido siálico das moléculas eluídas de CTLA4-Ig; ou (c) (a) e (b). Em ainda outra modalidade, a cromatografia de troca de ânions da etapa (ii) ou etapa (iv) ou ambas, é realizada usando uma resina de troca de ânions, em que a resina é capaz de (a) diminuir o teor de agregados de espécies de elevado peso molecular de CTLA4-Ig da composição eluída; (b) aumentar o teor de ácido siálico da composição eluída; ou (c) (a) e (b).

Em outro aspecto, a invenção proporciona um método para isolamento de uma composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig, o método compreendendo: (i) obtenção de uma fração solúvel de uma cultura líquida compreendendo células de mamífero que produzem moléculas de CTLA4-Ig e, em qualquer ordem; (ii) sujeição da fração solúvel à cromatografia por afinidade de modo a obter uma composição eluída compreendendo moléculas de CTLA4-Ig; (iii) sujeição da fração solúvel à cromatografia de troca de ânions de modo a obter uma composição eluída e enriquecida compreendendo moléculas de CTLA4-Ig; e (iv) sujeição da fração solúvel à cromatografia de interação hidrofóbica, de modo a obter uma composição eluída e enriquecida compreendendo moléculas de CTLA4-Ig. Em uma modalidade, a cromatografia por afinidade etapa é realizada primeiro. Em outra modalidade, a cromatografia por afinidade da etapa (ii) do método é realizada usando uma resina compreendendo Proteína A. Em uma modalidade adicional, a cromatografia por afinidade da etapa (ii) é realizada usando um tampão de eluição compreendendo guanidina. Em uma outra modalidade, a cromatografia por afinidade da etapa (ii) é realizada usando um tampão de eluição compreendendo uréia. Em ainda outra modalidade, a cromatografia por afinidade da etapa (ii) resulta em um aumento em dímeros de CTLA4-Ig

na composição eluída compreendendo moléculas de CTLA4-Ig.

Em ainda outro aspecto, a invenção proporciona um método para isolamento de composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig de líquido coletado de uma cultura de células de mamífero, em que as células

5 produzem moléculas de CTLA4-Ig, o método compreendendo: (i) obtenção de uma fração solúvel do líquido coletado; (ii) sujeição da fração solúvel à cromatografia por afinidade para obter uma composição eluída compreendendo moléculas de CTLA4-Ig; (iii) sujeição da composição da etapa (ii) à cromatografia de troca de ânions de modo a obter uma composição eluída e

10 enriquecida compreendendo moléculas de CTLA4-Ig; e (iv) sujeição da composição da etapa (iii) à cromatografia de interação hidrofóbica para obter uma composição adicionalmente enriquecida compreendendo moléculas de CTLA4-Ig. Em uma modalidade, a composição obtida na etapa (iv) do método é caracterizada pelo fato de que o percentual de espécies de elevado

15 peso molecular é uma área de menos de cerca de 2,5% conforme determinado através de cromatografia por exclusão de tamanho e detecção espectrofotométrica e o percentual de proteína celular é menos de cerca de 95 ng/ml e o percentual de MCP-1 é menos de cerca de 5 ppm. Em outra modalidade, a cromatografia de troca de ânions da etapa (iii) é realizada usando

20 um tampão de lavagem compreendendo HEPES a cerca de 50 mM e NaCl a cerca de 135 mM e tendo um pH de cerca de 7. Em uma modalidade adicional, a cromatografia de troca de ânions da etapa (iii) é realizada usando um tampão de eluição compreendendo HEPES a cerca de 50 mM e NaCl a cerca de 200 mM e tendo um pH de cerca de 7. Em uma modalidade específica,

25 a cromatografia de interação hidrofóbica da etapa (iii) é realizada usando uma resina de interação hidrofóbica compreendendo um grupo funcional fenila, um octila, um propila, um alcóxi, um butila ou um isoamila. Em uma outra modalidade, a cromatografia de interação hidrofóbica da etapa (iv) é realizada usando um tampão de lavagem compreendendo HEPES a cerca de

30 50 mM e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a cerca de 1,2 M e tendo um pH de cerca de 7. Em ainda outra modalidade, a cromatografia por afinidade da etapa (ii) é realizada usando um tampão de lavagem compreendendo NaH_2PO_4 a cerca de 25

mM e NaCl a cerca de 150 mM e tendo um pH de cerca de 7,5. Em ainda outra modalidade, a cromatografia por afinidade da etapa (ii) é realizada usando um tampão de eluição compreendendo Glicina a cerca de 250 mM e tendo um pH de cerca de 3. Em outra modalidade, a cromatografia de troca de ânions da etapa (iii) é realizada usando uma coluna tendo uma resina de troca de ânions compreendendo um grupo funcional amina primária, secundária, terciária ou quaternária. Em uma modalidade específica, a resina compreende um grupo funcional amina quaternária.

Em uma modalidade, a cromatografia de interação hidrofóbica da etapa (iii) é realizada usando uma resina de interação hidrofóbica compreendendo um grupo funcional fenila, um octila, um propila, um alcóxi, um butila ou um isoamila. Em uma modalidade, o grupo funcional compreende um grupo funcional fenila. Em uma modalidade, a cromatografia por afinidade da etapa (ii) é realizada usando uma resina compreendendo Proteína A.

15 A invenção proporciona uma composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig obtida através de qualquer um dos métodos da invenção. Em uma modalidade, a composição compreende um ou mais polipeptídeos tendo SEQ ID NO: 2, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10. Em uma modalidade, a composição compreende um ou mais polipeptídeos tendo SEQ ID NO: 4, 11, 12, 13, 14, 15

20 ou 16. A invenção proporciona um plasmídeo de expressão de CTLA4-Ig tendo a seqüência de ácido nucleico de SEQ ID NO: 17. A invenção proporciona uma composição substancialmente purificada compreendendo moléculas de CTLA4-Ig, em que as moléculas de CTLA4-Ig têm uma proporção molar média de ácido siálico para proteína de CTLA4-Ig de cerca de 5,5 a cerca

25 de 18. A invenção proporciona uma composição substancialmente purificada compreendendo moléculas de CTLA4-Ig, em que as moléculas de CTLA4-Ig têm uma proporção molar média de ácido siálico para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 5,5 a cerca de 9,5.

A invenção proporciona uma composição substancialmente purificada compreendendo moléculas de CTLA4-Ig, em que as moléculas de CTLA4-Ig têm uma proporção molar média de ácido siálico para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 5 a cerca de 10. A invenção proporciona uma

composição substancialmente purificada compreendendo moléculas de CTLA4-Ig, em que as moléculas de CTLA4-Ig têm uma proporção molar média de ácido siálico para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 6 a cerca de 18. A invenção proporciona uma composição substancialmente purificada compreendendo moléculas de CTLA4-Ig, em que as moléculas de CTLA4-Ig têm uma proporção molar média de ácido siálico para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 8 a cerca de 18.

A invenção proporciona uma composição substancialmente purificada compreendendo moléculas de CTLA4-Ig, em que as moléculas de CTLA4-Ig têm uma proporção molar média de ácido siálico para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 8 a cerca de 12. A invenção proporciona uma composição substancialmente purificada compreendendo moléculas de CTLA4-Ig, em que as moléculas de CTLA4-Ig têm uma proporção molar média de ácido siálico para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 8 a cerca de 11. A invenção proporciona uma composição substancialmente purificada compreendendo moléculas de CTLA4-Ig, em que as moléculas de CTLA4-Ig têm uma proporção molar média de ácido siálico para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 7 a cerca de 12.

A invenção proporciona uma composição substancialmente purificada compreendendo moléculas de CTLA4-Ig, em que as moléculas de CTLA4-Ig têm uma proporção molar média de ácido siálico para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 7 a cerca de 11. A invenção proporciona uma composição substancialmente purificada compreendendo moléculas de CTLA4-Ig, em que as moléculas de CTLA4-Ig têm uma proporção molar média de ácido siálico para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 11 a cerca de 18. A invenção proporciona uma composição substancialmente purificada compreendendo moléculas de CTLA4-Ig, em que as moléculas de CTLA4-Ig têm uma proporção molar média de ácido siálico para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 12 a cerca de 18,

A invenção proporciona uma composição substancialmente purificada compreendendo moléculas de CTLA4-Ig, em que as moléculas de CTLA4-Ig têm uma proporção molar média de ácido siálico para moléculas

de CTLA4-Ig de cerca de 13 a cerca de 18. A invenção proporciona uma composição substancialmente purificada compreendendo moléculas de CTLA4-Ig, em que as moléculas de CTLA4-Ig têm uma proporção molar média de ácido siálico para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 14 a cerca de 18.

- 5 A invenção proporciona uma composição substancialmente purificada compreendendo moléculas de CTLA4-Ig, em que as moléculas de CTLA4-Ig têm uma proporção molar média de ácido siálico para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 15 a cerca de 17.

- 10 A invenção proporciona uma composição substancialmente purificada compreendendo moléculas de CTLA4-Ig, em que as moléculas de CTLA4-Ig têm uma proporção molar média de ácido siálico para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 16. A invenção proporciona uma composição substancialmente purificada compreendendo moléculas de CTLA4-Ig, em que as moléculas de CTLA4-Ig têm uma proporção molar média de ácido siálico
- 15 para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 10. A invenção proporciona uma composição substancialmente purificada compreendendo moléculas de CTLA4-Ig, em que as moléculas de CTLA4-Ig têm uma proporção molar média de ácido siálico para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 6. Em uma modalidade, o ácido siálico é ácido N-acetil neuramínico (NANA). A invenção proporciona uma composição substancialmente purificada compreendendo mo-
- 20 léculas de CTLA4-Ig, em que as moléculas de CTLA4-Ig têm uma proporção molar média de NANA para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 8 a cerca de 12. A invenção proporciona uma composição substancialmente purificada compreendendo moléculas de CTLA4-Ig, em que as moléculas de CTLA4-Ig
- 25 têm uma proporção molar média de ácido N-glicolil neuramínico (NGNA) para moléculas de CTLA4-Ig de menos de ou igual a cerca de 1,5.

- A invenção proporciona uma composição substancialmente purificada compreendendo moléculas de CTLA4-Ig, em que as moléculas de CTLA4-Ig têm uma proporção molar média de NGNA para moléculas de C-
- 30 TLA4-Ig de cerca de 0,5 a cerca de 1,5. A invenção proporciona uma composição substancialmente purificada compreendendo moléculas de CTLA4-Ig, em que as moléculas de CTLA4-Ig têm uma proporção molar média de

NGNA para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 1,0 a cerca de 1,5. A invenção proporciona uma composição substancialmente purificada compreendendo moléculas de CTLA4-Ig, em que as moléculas de CTLA4-Ig têm uma proporção molar média de ácido siálico para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 6 a cerca de 18.

A invenção proporciona uma composição substancialmente purificada compreendendo moléculas de CTLA4-Ig, em que as moléculas de CTLA4-Ig são caracterizadas por uma proporção molar média de ácido siálico por mol de moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 6 a cerca de 12.

A invenção proporciona uma composição substancialmente purificada compreendendo moléculas de CTLA4-Ig, em que cada polipeptídeo da molécula compreende seqüência de SEQ ID NO: 11, 12, 13, 14, 15 ou 16 e em que as moléculas de CTLA4-Ig são caracterizadas por uma proporção molar média de ácido siálico por mol de moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 5,5 a cerca de 9,5. Em uma modalidade, a proporção molar de ácido siálico por mol de moléculas de CTLA4-Ig é determinada através de hidrólise ácida e HPLC. Em uma modalidade, as moléculas de CTLA4-Ig compreendem um ou mais polipeptídeos tendo SEQ ID NO: 2, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10.

Em uma modalidade, as moléculas de CTLA4-Ig compreendem um ou mais polipeptídeos tendo SEQ ID NO: 4, 11, 12, 13, 14, 15 ou 16. A invenção proporciona uma composição substancialmente purificada compreendendo moléculas de CTLA4-Ig, em que mais de ou igual a 95% das moléculas de CTLA4-Ig são dímeros de CTLA4-Ig. Em uma modalidade, mais de ou igual a 98% das moléculas de CTLA4-Ig são dímeros de CTLA4-Ig. Em uma modalidade, mais de ou igual a 99% das moléculas de CTLA4-Ig são dímeros de CTLA4-Ig.

Em uma modalidade, mais de ou igual a 99,5% das moléculas de CTLA4-Ig são dímeros de CTLA4-Ig. Em uma modalidade, de cerca de 95% a cerca de 99,5% das moléculas de CTLA4-Ig são dímeros de CTLA4-Ig e uma área de cerca de 0,5 por cento a uma área de cerca de 5 por cento das moléculas são espécies de elevado peso molecular de CTLA4-Ig conforme determinado através de cromatografia por exclusão de tamanho e de-

tecção espectrofotométrica. Em uma modalidade, cerca de 98,6% das moléculas são dímeros de CTLA4-Ig e uma área de cerca de 1,2 por cento das moléculas são espécies de elevado peso molecular de CTLA4-Ig e uma área de menos de cerca de 0,7 por cento das moléculas são monômeros de CTLA4-Ig conforme determinado através de cromatografia por exclusão de tamanho e detecção espectrofotométrica. Em uma modalidade, cerca de menos de 0,3% das moléculas são multímeros compreendendo cinco ou mais monômeros de CTLA4-Ig. A invenção proporciona uma composição consistindo essencialmente de dímeros de CTLA4-Ig. A invenção proporciona uma composição consistindo essencialmente de moléculas de CTLA4-Ig, em que a população é substancialmente isenta de monômeros de CTLA4-Ig. A invenção proporciona uma composição consistindo essencialmente de moléculas de CTLA4-Ig, em que a população é substancialmente isenta de espécies de elevado peso molecular de CTLA4-Ig. A invenção proporciona uma composição consistindo essencialmente de monômeros de CTLA4-Ig substancialmente isenta de dímeros e espécies de elevado peso molecular de CTLA4-Ig. Em uma modalidade, cada monômero de cada dímero de CTLA4-Ig tem pelo menos 3 grupos ácido siálico. Em uma modalidade, cada monômero de cada dímero de CTLA4-Ig tem pelo menos 2,5 grupos ácido siálico. Em uma modalidade, cada monômero de cada dímero de CTLA4-Ig tem de pelo menos 3 grupos ácido siálico a pelo menos 8 grupos ácido siálico.

Em uma modalidade, cada monômero de cada dímero de CTLA4-Ig tem de pelo menos 2,5 grupos ácido siálico a pelo menos 5 grupos ácido siálico. Em uma modalidade, cada dímero compreende dois polipeptídeos de CTLA4-Ig, em que cada polipeptídeo tem uma seqüência de aminoácido selecionada do grupo consistindo de SEQ ID NOS: 5-16. Em uma modalidade, a composição compreende um ou mais polipeptídeos tendo SEQ ID NO: 2, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10. Em uma modalidade, a composição compreende um ou mais polipeptídeos tendo SEQ ID NO: 4, 11, 12, 13, 14, 15 ou 16. A invenção proporciona uma composição isolada compreendendo tetrâmeros de CTLA4-Ig, a qual é substancialmente isenta de dímeros de CTLA4-Ig.

A invenção proporciona uma composição isolada compreendendo tetrâmeros de CTLA4-Ig a qual é substancialmente isenta de monômeros de CTLA4-Ig. Em uma modalidade, a composição existe como uma quantidade que é mais de cerca de 100 gramas. Em uma modalidade, cada tetrâmero compreende dois pares de polipeptídeos de CTLA4-Ig, em que cada polipeptídeo tem uma seqüência de aminoácido selecionada do grupo consistindo de SEQ ID NOS: 5-10. Em uma modalidade, cada tetrâmero compreende dois pares de polipeptídeos de CTLA4-Ig, em que cada polipeptídeo tem uma seqüência de aminoácido selecionada do grupo consistindo de SEQ ID NOS: 11-16. Em uma modalidade, cada tetrâmero é capaz de ligação a um CD80 ou CD86. A invenção proporciona uma composição farmacologicamente aceitável compreendendo moléculas de CTLA4-Ig, em que a composição é substancialmente isenta de MCP-1. A invenção proporciona uma composição farmacologicamente aceitável compreendendo moléculas de CTLA4-Ig, em que a composição compreende não mais do que cerca de 25 ppm de MCP-1. Em uma modalidade, a composição compreende não mais do que 10 ppm de MCP-1. Em uma modalidade, a composição compreende cerca de 0,2 ng/ml de MCP-1 a cerca de 10 ng / ml de MCP-1. Em uma modalidade, a invenção proporciona uma composição farmacologicamente aceitável compreendendo moléculas de CTLA4-Ig, em que a composição compreende (a) de cerca de 0,2 ng/ml de MCP-1 a cerca de 10 ng / ml de MCP-1 e (b) não mais do que 25 ng/ml de proteína CHO ou não mais do que 10 ng/ml de proteína CHO. Em uma modalidade, a composição compreende não mais do que cerca de 20 pg/ml de DNA.

25 A invenção proporciona uma composição isolada compreendendo moléculas de CTLA4-Ig em que, quando administrada a um indivíduo em uma dose intravenosa de cerca de 10 mg/kg, as moléculas de CTLA4-Ig são capazes de exibir: uma área sob a curva (AUC) de cerca de 44400 μ g.h/ml; um volume de distribuição de cerca de 0,09 L/kg; uma concentração de pico (Cmax) de cerca de 292 μ g/ml; e uma taxa de eliminação de cerca de 0,23 ml/h/kg. A invenção proporciona uma composição isolada compreendendo moléculas de CTLA4-Ig, em que a composição compreende isoformas domi-

5 nantes de moléculas de CTLA4-Ig visualizáveis sobre um gel de focalização isoeletrica o qual tem um ponto isoeletrico, pI, menos de ou igual a $5,1 \pm 0,2$ conforme determinado através de focalização isoeletrica. Em uma modalidade, o pI médio da composição aumenta após tratamento com neuraminidase. Em uma modalidade, pelo menos 40% das moléculas de CTLA4-Ig exibem um ponto isoeletrico de menos de ou igual a cerca de $5,1 \pm 0,2$ conforme determinado através de focalização isoeletrica. Em uma modalidade, pelo menos 70% das moléculas de CTLA4-Ig exibem um ponto isoeletrico de menos de ou igual a cerca de $5,1 \pm 0,2$ conforme determinado através de focalização isoeletrica. Em uma modalidade, pelo menos 90% das moléculas de CTLA4-Ig exibem um ponto isoeletrico de menos de ou igual a cerca de $5,1 \pm 0,2$ conforme determinado através de focalização isoeletrica. A invenção proporciona uma composição isolada compreendendo moléculas de CTLA4-Ig tendo um pI de cerca de $3,0 \pm 0,2$ a cerca de $5,0 \pm 0,2$. A invenção proporciona uma composição isolada compreendendo moléculas de CTLA4-Ig tendo um pI de cerca de $4,3 \pm 0,2$ a cerca de $5,0 \pm 0,2$.

10 A invenção proporciona uma composição isolada compreendendo moléculas de CTLA4-Ig tendo um pI de cerca de $3,3 \pm 0,2$ a cerca de $4,7 \pm 0,2$. Em uma modalidade, a composição é substancialmente purificada. A invenção proporciona um método para preparo de uma composição, a composição compreendendo uma molécula de CTLA4-Ig com um pI de cerca de $3,0 \pm 0,2$ a cerca de $5,0 \pm 0,2$, o método compreendendo: (a) sujeição de uma mistura de moléculas de CTLA4-Ig à eletroforese em gel de focalização isoeletrica, em que uma única banda sobre o gel representa uma população de moléculas de CTLA4-Ig com um pI em particular e (b) isolamento da população de moléculas de CTLA4-Ig tendo um pI de cerca de $3,0 \pm 0,2$ a cerca de $5,0 \pm 0,2$ de modo a preparar uma composição. A invenção proporciona uma composição isolada compreendendo moléculas de CTLA4-Ig, em que a composição compreende isoformas dominantes visualizáveis sobre um gel de focalização isoeletrica o qual tem um ponto isoeletrico, pI, menos de ou igual a $5,5 \pm 0,2$ conforme determinado através de focalização isoeletrica. Em uma modalidade, o pI médio da composição aumenta após trata-

mento com neuraminidase. Em uma modalidade, pelo menos 40% das moléculas de CTLA4-Ig exibem um ponto isoelétrico de menos de ou igual a cerca de $5,3 \pm 0,2$ conforme determinado através de focalização isoelétrica. Em uma modalidade, pelo menos 70% das moléculas de CTLA4-Ig exibem um ponto isoelétrico de menos de ou igual a cerca de $5,3 \pm 0,2$ conforme determinado através de focalização isoelétrica. Em uma modalidade, pelo menos 90% das moléculas de CTLA4-Ig exibem um ponto isoelétrico de menos de ou igual a cerca de $5,3 \pm 0,2$ conforme determinado através de focalização isoelétrica. A invenção proporciona uma composição isolada compreendendo moléculas de CTLA4-Ig tendo um pI de cerca de $3,0 \pm 0,2$ a cerca de $5,2 \pm 0,2$.

A invenção proporciona uma composição isolada compreendendo moléculas de CTLA4-Ig tendo um pI de cerca de $4,5 \pm 0,2$ a cerca de $5,2 \pm 0,2$. A invenção proporciona uma composição isolada compreendendo moléculas de CTLA4-Ig tendo um pI de cerca de $4,7 \pm 0,2$ a cerca de $5,1 \pm 0,2$. Em uma modalidade, a composição é substancialmente purificada.

A invenção proporciona um método para preparo de uma composição, a composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig com um pI de cerca de $2,0 \pm 0,2$ a cerca de $5,2 \pm 0,2$, o método compreendendo: (a) sujeição de uma mistura de moléculas de CTLA4-Ig à eletroforese em gel de focalização isoelétrica, em que uma única banda sobre o gel representa uma população de moléculas de CTLA4-Ig com um pI em particular e (b) isolamento da população de moléculas de CTLA4-Ig tendo um pI de cerca de $3,0 \pm 0,2$ a cerca de $5,2 \pm 0,2$ de modo a preparar uma composição. A invenção proporciona uma composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig, em que as moléculas de CTLA4-Ig são caracterizadas por uma proporção molar média de GlcNAc para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 17 a cerca de 28. A invenção proporciona uma composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig, em que as moléculas de CTLA4-Ig são caracterizadas por uma proporção molar média de GlcNAc para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 17 a cerca de 25. A invenção proporciona uma composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig, em que as moléculas de CTLA4-Ig são caracteriza-

das por uma proporção molar média de GlcNAc para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 15 a cerca de 35.

5 A invenção proporciona uma composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig, em que cada polipeptídeo da molécula compreende a seqüência de SEQ ID NO: 11, 12, 13, 14, 15 ou 16 e em que as moléculas de CTLA4-Ig são caracterizadas por uma proporção molar média de GlcNAc para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 24 a cerca de 28. A invenção proporciona uma composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig, em que as moléculas de CTLA4-Ig são caracterizadas por uma proporção molar média de GalNAc para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 1,7 a cerca de 3,6.
10 A invenção proporciona uma composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig, em que cada polipeptídeo da molécula compreende a seqüência de SEQ ID NO: 11, 12, 13, 14, 15 ou 16 e em que as moléculas de CTLA4-Ig são caracterizadas por uma proporção molar média de GalNAc para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 2,7 a cerca de 3,6.
15

A invenção proporciona uma composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig, em que as moléculas de CTLA4-Ig são caracterizadas por uma proporção molar média de galactose para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 8 a cerca de 17. A invenção proporciona uma composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig, em que cada polipeptídeo da molécula compreende a seqüência de SEQ ID NO: 11, 12, 13, 14, 15 ou 16 e em que as moléculas de CTLA4-Ig são caracterizadas por uma proporção molar média de galactose para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 11 a cerca de 13.
20 A invenção proporciona uma composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig, em que as moléculas de CTLA4-Ig são caracterizadas por uma proporção molar média de fucose para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 3,5 a cerca de 8,3.
25

A invenção proporciona uma composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig, em que cada polipeptídeo da molécula compreende a seqüência de SEQ ID NO: 11, 12, 13, 14, 15 ou 16 e em que as moléculas de CTLA4-Ig são caracterizadas por uma proporção molar média de fucose para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 6,4 a cerca de 7,0. A invenção
30

proporciona uma composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig, em que as moléculas de CTLA4-Ig são caracterizadas por uma proporção molar média de manose para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 7,7 a cerca de 22. A invenção proporciona uma composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig, em que cada polipeptídeo da molécula compreende a seqüência de SEQ ID NO: 11, 12, 13, 14, 15 ou 16 e em que as moléculas de CTLA4-Ig são caracterizadas por uma proporção molar média de manose para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 14 a cerca de 16.

Em uma modalidade, a proporção molar de GlcNAc para moléculas de CTLA4-Ig é determinada através de eletroforese capilar. Em uma modalidade, a proporção molar de GalNAc para moléculas de CTLA4-Ig é determinada através de eletroforese capilar. Em uma modalidade, a proporção molar de galactose para moléculas de CTLA4-Ig é determinada através de eletroforese capilar.

Em uma modalidade, a proporção molar de fucose para moléculas de CTLA4-Ig é determinada através de eletroforese capilar. Em uma modalidade, a proporção molar de manose para moléculas de CTLA4-Ig é determinada através de eletroforese capilar. Em uma modalidade, as moléculas de CTLA4-Ig são obtidas através de fixação enzimática de um ou mais carboidratos à molécula. A invenção proporciona uma composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig, em que as moléculas compreendem resíduos de carboidrato presos às moléculas enzimaticamente *in vitro*. A invenção proporciona uma composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig caracterizada por: (a) uma proporção molar média de GlcNAc para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 15 a cerca de 35; e (b) uma proporção molar média de ácido siálico para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 6 a cerca de 12. A invenção proporciona uma composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig caracterizada por: (a) uma proporção molar média de GlcNAc para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 15 a cerca de 35; (b) uma proporção molar média de GalNAc para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 1,7 a cerca de 3,6; e (c) uma proporção molar média de ácido siálico para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 6 a cerca de 12. A invenção proporciona uma

composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig caracterizada por: (a) uma proporção molar média de GlcNAc para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 15 a cerca de 35; (b) uma proporção molar média de GalNAc para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 1,7 a cerca de 3,6; (c) uma proporção molar média de galactose para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 8 a cerca de 17; e (d) uma proporção molar média de ácido siálico para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 6 a cerca de 12. A invenção proporciona uma composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig caracterizada por: (a) uma proporção molar média de GlcNAc para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 15 a cerca de 35; (b) uma proporção molar média de GalNAc para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 1,7 a cerca de 3,6; (c) uma proporção molar média de galactose para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 8 a cerca de 17; (d) uma proporção molar média de fucose para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 3,5 a cerca de 8,3; e (e) uma proporção molar média de ácido siálico para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 6 a cerca de 12. A invenção proporciona uma composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig caracterizada por: (a) uma proporção molar média de GlcNAc para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 15 a cerca de 35; (b) uma proporção molar média de GalNAc para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 1,7 a cerca de 3,6; (c) uma proporção molar média de galactose para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 8 a cerca de 17; (d) uma proporção molar média de fucose para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 3,5 a cerca de 8,3; (e) uma proporção molar média de manose para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 7,2 a cerca de 22; e (f) uma proporção molar média de ácido siálico para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 6 a cerca de 12. A invenção proporciona uma composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig caracterizada por: (a) uma proporção molar média de GlcNAc para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 24 a cerca de 28; e (b) uma proporção molar média de ácido siálico para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 5,5 a cerca de 9,5. A invenção proporciona uma composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig caracterizada por: (a) uma proporção molar média de GlcNAc para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 24 a cerca de 28; (b) uma proporção molar média de GalNAc para moléculas

de CTLA4-Ig de cerca de 2,7 a cerca de 3,6; e (c) uma proporção molar média de ácido siálico para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 5,5 a cerca de 9,5. A invenção proporciona uma composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig caracterizada por: (a) uma proporção molar média de GlcNAc para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 24 a cerca de 28; (b) uma proporção molar média de GalNAc para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 2,7 a cerca de 3,6; (c) uma proporção molar média de galactose para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 11 a cerca de 13; e (d) uma proporção molar média de ácido siálico para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 5,5 a cerca de 9,5.

10 A invenção proporciona uma composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig caracterizada por: (a) uma proporção molar média de GlcNAc para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 24 a cerca de 28; (b) uma proporção molar média de GalNAc para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 2,7 a cerca de 3,6; (c) uma proporção molar média de galactose para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 11 a cerca de 13; (d) uma proporção molar média de fucose para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 6,4 a cerca de 7,0; e (e) uma proporção molar média de ácido siálico para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 5,5 a cerca de 9,5. A invenção proporciona uma composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig caracterizada por: (a) uma proporção molar média de GlcNAc para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 24 a cerca de 28; (b) uma proporção molar média de GalNAc para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 2,7 a cerca de 3,6; (c) uma proporção molar média de galactose para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 11 a cerca de 13; (d) uma proporção molar média de fucose para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 6,4 a cerca de 7,0; (e) uma proporção molar média de manose to proteína de CTLA4-Ig de cerca de 14 a cerca de 16; e (f) uma proporção molar média de ácido siálico to proteína de CTLA4-Ig de cerca de 5,5 a cerca de 9,5.

A invenção proporciona uma composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig, em que as moléculas de CTLA4-Ig são glicosiladas em um resíduo de aminoácido asparagina na posição 102 de SEQ ID NO: 2 ou 4, um resíduo de aminoácido asparagina na posição 134 de SEQ ID NO: 2 ou 4, um resíduo de aminoácido asparagina na posição 233 de SEQ ID NO:

2 ou 4, um resíduo de aminoácido serina na posição 155 de SEQ ID NO: 2 ou 4 ou um resíduo de aminoácido serina na posição 165 de SEQ ID NO: 2 ou 4. A invenção proporciona uma composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig, em que as moléculas de CTLA4-Ig são glicosiladas e em que
5 pelo menos cerca de 2 % da massa total de glicosilação é glicosilação O-ligada.

A invenção proporciona uma composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig, em que a composição exibe um pico por cromatograma de NGNA de cerca de $9,6 \pm 0,3$ e um pico por cromatograma de NANA de
10 cerca de $10,5 \pm 0,3$. A invenção proporciona uma composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig, em que as moléculas de CTLA4-Ig exibem um perfil de carboidrato substancialmente o mesmo conforme na Figura 68. A invenção proporciona uma composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig, em que as moléculas de CTLA-Ig exibem um perfil de carboidrato
15 conforme mostrado na Figura 68. A invenção proporciona uma composição consistindo essencialmente de moléculas de CTLA4-Ig, em que as moléculas de CTLA4-Ig exibem um perfil de carboidrato dos Domínios I - IV, em que o Domínio I compreende picos os quais representam oligossacarídeos a-sialilados, o Domínio II compreende picos os quais representam oligossacarídeos mono-sialilados, o Domínio III compreende picos os quais representam oligossacarídeos di-sialilados, o Domínio IV compreende picos os quais representam oligossacarídeos tri-sialilados e Domínio V compreende picos os quais representam oligossacarídeos tetra-sialilados e em que o perfil é um cromatograma de oligossacarídeos liberados de CTLA4-Ig. Em uma modalidade, a diferença nos tempos de retenção de oligossacarídeos N-ligados
25 entre um primeiro pico no Domínio I e um pico principal no Domínio II é de cerca de 10 a cerca de 12 minutos. Em uma modalidade, a diferença nos tempos de retenção de oligossacarídeos N-ligados entre um primeiro pico no Domínio I e um pico principal no Domínio II é de cerca de 11 a cerca de 13 minutos. Em uma modalidade, glicosilação dos Domínios III e IV compreende cerca de 25% a cerca de 36% de glicosilação N-ligada conforme medido através de HPAEC. Em uma modalidade, glicosilação do Domínio I compre-

30

ende cerca de 24,5% a cerca de 35,2% de glicosilação N-ligada conforme medido através de HPAEC. Em uma modalidade, glicosilação do Domínio II compreende cerca de 26,3% a cerca de 34,1% de glicosilação N-ligada conforme medido através de HPAEC. Em uma modalidade, glicosilação do Domínio III compreende cerca de 21,9% a cerca de 31,5% de glicosilação N-ligada conforme medido através de HPAEC. Em uma modalidade, glicosilação do Domínio IV e Domínio V compreende cerca de 7,9% a cerca de 18,6% de glicosilação N-ligada conforme medido através de HPAEC.

Em uma modalidade: (a) o Domínio I exibe uma área percentual de pelo menos cerca de 31; (b) o Domínio II exibe uma área percentual de pelo menos cerca de 33; (c) o Domínio III exibe uma área percentual de pelo menos cerca de 24; (iv) o Domínio IV exibe uma área percentual de pelo menos cerca de 9,4, (v) o Domínio V exibe uma área percentual de pelo menos cerca de 67; ou em que a área é medida a partir de um cromatograma de oligossacarídeos liberados de CTLA4-Ig.

Em uma modalidade: (a) o Domínio I exibe pelo menos cerca de 5 picos; (b) o Domínio II exibe pelo menos cerca de 5 picos; (c) o Domínio III exibe pelo menos cerca de 5 picos; (d) o Domínio IV exibe pelo menos cerca de 6 picos ou (e) o Domínio V exibe pelo menos cerca de 6 picos e em que os picos são exibidos sobre um cromatograma. A composição em que o Domínio I exibe pelo menos dois picos, em que um primeiro pico tem uma área mínima de cerca de 4,5% e uma área máxima de cerca de 11,2% e em que um segundo pico tem uma área mínima de cerca de 8,7% e um máximo de cerca de 11,8%.

Em uma modalidade, os Domínios III e IV exibem uma área percentual de cerca de 25% a cerca de 36% conforme medido através de HPAEC. Em uma modalidade, o Domínio I exibe uma área percentual de cerca de 24,5% a cerca de 35,2% conforme medido através de HPAEC. Em uma modalidade, o Domínio II exibe uma área percentual de cerca de 26,3% a cerca de 34,1% conforme medido através de HPAEC. Em uma modalidade, o Domínio III exibe uma área percentual de cerca de 21,9% a cerca de 31,5% conforme medido através de HPAEC. Em uma modalidade, o Domí-

nio IV exibe uma área percentual de cerca de 7,9% a cerca de 18,6% conforme medido através de HPAEC.

A invenção proporciona uma composição compreendendo polipeptídeos de CTLA4-Ig, em que: (a) cerca de 80 % dos polipeptídeos têm glicosilação N-ligada bi-antênária; (b) cerca de 14 % dos polipeptídeos têm glicosilação N-ligada tri-antênária; e (c) cerca de 6 % dos polipeptídeos têm glicosilação N-ligada tetra-antênária. Em uma modalidade, a glicosilação N-ligada é determinada através de cromatografia de troca de ânions em pH elevado com detecção amperométrica pulsada (HPEAC-PAD). A invenção proporciona uma composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig caracterizada por: (a) uma proporção molar média de galactose para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 8 a cerca de 17; e (b) uma proporção molar média de NANA para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 6 a cerca de 12. A invenção proporciona uma composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig caracterizada por: (a) uma proporção molar média de galactose para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 8 a cerca de 17; (b) uma proporção molar média de NANA para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 6 a cerca de 12; e (c) uma área percentual de espécies de elevado peso molecular de CTLA4-Ig de menos de cerca de 3% conforme determinado através de cromatografia por exclusão de tamanho e detecção espectrofotométrica. A invenção proporciona uma composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig caracterizada por: (a) uma proporção molar média de galactose para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 8 a cerca de 17; (b) uma proporção molar média de NANA para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 6 a cerca de 12; e (c) uma proporção molar média de NGNA para moléculas de CTLA4-Ig de menos de ou igual a cerca de 1,5.

A invenção proporciona uma composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig caracterizada por: (a) uma proporção molar média de galactose para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 8 a cerca de 17; (b) uma proporção molar média de NANA para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 6 a cerca de 12; (c) uma área de teor de agregados de espécies de elevado peso molecular de CTLA4-Ig de menos de cerca de 3 por cento conforme

determinado através de cromatografia por exclusão de tamanho e detecção espectrofotométrica; e (d) um perfil de carboidrato substancialmente o mesmo conforme aquele da Figura 68. A invenção proporciona a composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig caracterizada por: (a) uma proporção molar média de galactose para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 8 a cerca de 17; (b) uma proporção molar média de NANA para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 6 a cerca de 12; (c) uma área de teor de agregados de espécies de elevado peso molecular de CTLA4-Ig de menos de cerca de 3 por cento conforme determinado através de cromatografia por exclusão de tamanho e detecção espectrofotométrica; e (d) um teor de glicosilação no Domínios III, IV e V de pelo menos cerca de 29,8% a cerca de 50,1% de glicosilação N-ligada conforme determinado através de HPAEC. A invenção proporciona uma composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig caracterizada por: (a) uma proporção molar média de galactose para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 8 a cerca de 17; (b) uma proporção molar média de NANA para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 6 a cerca de 12; e (c) uma área de espécies de elevado peso molecular de CTLA4-Ig de menos de cerca de 3 por cento conforme determinado através de cromatografia por exclusão de tamanho e detecção espectrofotométrica. Em uma modalidade, as moléculas são ainda caracterizadas por uma proporção molar média de NANA para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 8 a cerca de 12.

Em uma modalidade, as moléculas são ainda caracterizadas por: (a) cerca de 80 % glicosilação N-ligada bi-anténaria; (b) cerca de 14 % glicosilação N-ligada tri-anténaria; e (c) cerca de 6 % glicosilação N-ligada tetra-anténaria. Em uma modalidade, as moléculas ainda compreendem qualquer combinação de um ou mais de: (a) a seqüência de aminoácido de SEQ ID NO: 10 (metionina na posição de aminoácido 27 e glicina na posição de aminoácido 382 de SEQ ID NO: 2); (b) a seqüência de aminoácido de SEQ ID NO: 7 (metionina na posição de aminoácido 27 e lisina na posição de aminoácido 383 de SEQ ID NO: 2); (c) a seqüência de aminoácido de SEQ ID NO: 9 (alanina na posição de aminoácido 26 e glicina na posição de aminoácido 382 de SEQ ID NO: 2); e (d) a seqüência de aminoácido de SEQ

ID NO: 6 (alanina na posição de aminoácido 26 e lisina na posição de aminoácido 383 de SEQ ID NO: 2). Em uma modalidade, (a) cerca de 90% das moléculas compreendem a seqüência de aminoácido de SEQ ID NO: 2 começando com a metionina no resíduo 27; (b) cerca de 10% das moléculas compreendem a seqüência de aminoácido de SEQ ID NO: 2 começando com a alanina no resíduo número 26; (c) cerca de 4% das moléculas compreendem a seqüência de aminoácido de SEQ ID NO: 2 terminando com a lisina no resíduo número 383; e (d) cerca de 96% das moléculas compreendem a seqüência de aminoácido de SEQ ID NO: 2 terminando com a glicina no resíduo número 382. A invenção proporciona uma composição compreendendo polipeptídeos de CTLA4-Ig, em que: (a) cerca de 80 % dos polipeptídeos têm glicosilação N-ligada bi-antênária; (b) cerca de 14 % dos polipeptídeos têm glicosilação N-ligada tri-antênária; (c) cerca de 6 % dos polipeptídeos têm glicosilação N-ligada tetra-antênária; e (d) uma proporção molar média de NGNA para moléculas de CTLA4-Ig de menos de ou igual a 1,5. A invenção proporciona uma composição compreendendo polipeptídeos de CTLA4-Ig, em que: (a) cerca de 80 % dos polipeptídeos têm glicosilação N-ligada bi-antênária; (b) cerca de 14 % dos polipeptídeos têm glicosilação N-ligada tri-antênária; (c) cerca de 6 % dos polipeptídeos têm glicosilação N-ligada tetra-antênária; e (d) uma proporção molar média de GlcNAc para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 15 a cerca de 35. A invenção proporciona uma composição compreendendo polipeptídeos de CTLA4-Ig, em que: (a) cerca de 80 % dos polipeptídeos têm glicosilação N-ligada bi-antênária; (b) cerca de 14 % dos polipeptídeos têm glicosilação N-ligada tri-antênária; (c) cerca de 6 % dos polipeptídeos têm glicosilação N-ligada tetra-antênária; e (d) uma proporção molar média de GalNAc para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 1,7 a cerca de 3,6. A invenção proporciona uma composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig caracterizada por: (a) uma proporção molar média de galactose para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 11 a cerca de 13; e (b) uma proporção molar média de ácido siálico para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 5,5 a cerca de 9,5.

A invenção proporciona uma composição compreendendo molé-

culas de CTLA4-Ig caracterizada por: (a) uma proporção molar média de galactose para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 11 a cerca de 13; (b) uma proporção molar média de ácido siálico para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 5,5 a cerca de 9,5; e (c) uma área de espécies de elevado peso molecular de CTLA4-Ig de menos de cerca de 5 por cento conforme determinado através de cromatografia por exclusão de tamanho e detecção espectrofotométrica. A invenção proporciona uma composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig caracterizada por: (a) uma proporção molar média de galactose para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 11 a cerca de 13; (b) uma proporção molar média de ácido siálico para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 5,5 a cerca de 9,5; (c) uma área de teor de espécies de elevado peso molecular de CTLA4-Ig de menos de cerca de 5 por cento conforme determinado através de cromatografia por exclusão de tamanho e detecção espectrofotométrica; e (d) um perfil de carboidrato substancialmente o mesmo conforme aquele da Figura 68. A invenção proporciona uma composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig caracterizada por: (a) uma proporção molar média de galactose para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 11 a cerca de 13; (b) uma proporção molar média de ácido siálico para moléculas de CTLA4-Ig de 5,5 a cerca de 9,5; (c) uma área de teor de espécies de elevado peso molecular de CTLA4-Ig de menos de cerca de 5 por cento conforme determinado através de cromatografia por exclusão de tamanho e detecção espectrofotométrica; e (d) um teor de glicosilação no Domínios III, IV e V de pelo menos cerca de 29,8% a cerca de 50,1% de glicosilação N-ligada conforme determinado através de HPAEC.

A invenção proporciona uma composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig caracterizada por: (a) uma proporção molar média de galactose para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 11 a cerca de 13; (b) uma proporção molar média de ácido siálico para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 5,5 a cerca de 9,5; e (c) uma área de teor de espécies de elevado peso molecular de CTLA4-Ig de menos de cerca de 5 por cento conforme determinado através de cromatografia por exclusão de tamanho e detecção espectrofotométrica. Em uma modalidade, as moléculas são ainda caracteri-

zadas por: (a) cerca de 80 % glicosilação N-ligada bi-anténaria; (b) cerca de 14 % glicosilação N-ligada tri-anténaria; e (c) cerca de 6 % glicosilação N-ligada tetra-anténaria, em outra modalidade, as moléculas ainda compreendem qualquer combinação de um ou mais de: (a) a seqüência de aminoácido de SEQ ID NO: 16 (metionina na posição de aminoácido 27 e glicina na posição de aminoácido 382 de SEQ ID NO: 4); (b) a seqüência de aminoácido de SEQ ID NO: 13 (metionina na posição de aminoácido 27 e lisina na posição de aminoácido 383 de SEQ ID NO: 4); (c) a seqüência de aminoácido de SEQ ID NO: 15 (alanina na posição de aminoácido 26 e glicina na posição de aminoácido 382 de SEQ ID NO: 4); e (d) a seqüência de aminoácido de SEQ ID NO: 12 (alanina na posição de aminoácido 26 e lisina na posição de aminoácido 383 de SEQ ID NO: 4), em outra modalidade, (a) cerca de 90% das moléculas compreendem a seqüência de aminoácido de SEQ ID NO: 4 começando com a metionina no resíduo 27; (b) cerca de 10% das moléculas compreendem a seqüência de aminoácido de SEQ ID NO: 4 começando com a alanina no resíduo número 26; (c) cerca de 4% das moléculas compreendem a seqüência de aminoácido de SEQ ID NO: 4 terminando com a lisina no resíduo número 383; e (d) cerca de 96% das moléculas compreendem a seqüência de aminoácido de SEQ ID NO: 4 terminando com a glicina no resíduo número 382. A invenção proporciona uma composição compreendendo polipeptídeos de CTLA4-Ig, em que: (a) cerca de 80 % dos polipeptídeos têm glicosilação N-ligada bi-anténaria; (b) cerca de 14 % dos polipeptídeos têm glicosilação N-ligada tri-anténaria; (c) cerca de 6 % dos polipeptídeos têm glicosilação N-ligada tetra-anténaria; e (d) uma proporção molar média de GlcNAc por mol de proteína de CTLA4-Ig de cerca de 24 a cerca de 28. A invenção proporciona uma composição compreendendo polipeptídeos de CTLA4-Ig, em que: (a) cerca de 80 % dos polipeptídeos têm glicosilação N-ligada bi-anténaria; (b) cerca de 14 % dos polipeptídeos têm glicosilação N-ligada tri-anténaria; (c) cerca de 6 % dos polipeptídeos têm glicosilação N-ligada tetra-anténaria; e (d) uma proporção molar média de GalNAc para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 2,7 a cerca de 3,6, em outra modalidade, a composição é a substancialmente purificada composição. A inven-

ção proporciona uma composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig, em que menos de ou igual a cerca de 2,5 % das moléculas de CTLA4-Ig são oxidadas. A invenção proporciona uma composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig, em que menos de ou igual a cerca de 2,0 % das moléculas de CTLA4-Ig são deamidadas. A invenção proporciona uma composição compreendendo dímeros de moléculas de CTLA4-Ig, em que pelo menos 0,5 % dos dímeros de moléculas de CTLA4-Ig são cisteinilados. Em uma modalidade, pelo menos 1,0% dos dímeros de moléculas de CTLA4-Ig são cisteinilados. A invenção proporciona uma população de moléculas de CTLA4-Ig, em que a população exibe um perfil de espectrometria de massa substancialmente o mesmo conforme na Figura 64, 65 ou 67. A invenção proporciona uma população de moléculas de CTLA4-Ig, em que a população exibe um perfil de eletroforese capilar substancialmente o mesmo conforme na Figura 48.

15 A invenção proporciona uma composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig, em que a composição é caracterizada por: (a) uma proporção molar média de GlcNAc para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 15 a cerca de 35; (b) uma proporção molar média de GalNAc para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 1,7 a cerca de 3,6; (c) uma proporção molar média de galactose para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 8 a cerca de 17; (d) uma proporção molar média de fucose para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 3,5 a cerca de 8,3; (e) uma proporção molar média de manose para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 7,2 a cerca de 22; (f) uma proporção molar média de ácido siálico para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 6 a cerca de 25 12; (g) um pI, conforme determinado a partir de visualização sobre um gel de focalização isoelétrica, em uma faixa de cerca de $2,4 \pm 0,2$ a cerca de $5,0 \pm 0,2$; (h) MCP-1 de menos de ou igual a 3 ppm; (i) uma área de menos de 2,5 por cento de espécies de elevado peso molecular conforme determinado através de cromatografia por exclusão de tamanho e detecção espectrofotométrica; (j) uma área de menos de 0,5 por cento de monômero conforme 30 determinado através de cromatografia por exclusão de tamanho e detecção espectrofotométrica; (k) polipeptídeos de CTLA4-Ig tendo um aminoácido

pelo menos 95% idêntica a qualquer uma de SEQ ID NOS: 5-10; (l) moléculas de CTLA4-Ig capaz de ligação a CD80 e CD86. A invenção proporciona uma composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig, em que a população de moléculas é caracterizada por: (a) uma proporção molar média de
5 GlcNAc para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 15 a cerca de 35; (b) uma proporção molar média de GalNAc para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 1,7 a cerca de 3,6; (c) uma proporção molar média de galactose para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 8 a cerca de 17; (d) uma proporção molar
10 média de fucose para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 3,5 a cerca de 8,3; (e) uma proporção molar média de manose para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 7,2 a cerca de 22; (f) uma proporção molar média de ácido siálico para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 6 a cerca de 12; (g) um pI, conforme determinado a partir de visualização sobre um gel de focalização isoe-
15 létrica, em uma faixa de cerca de $3,4 \pm 0,2$ a cerca de $5,0 \pm 0,2$; (h) MCP-1 de menos de ou igual a 5 ppm; (i) uma área de menos de 2,5 por cento de espécies de elevado peso molecular conforme determinado através de cromatografia por exclusão de tamanho e detecção espectrofotométrica; (j) uma
20 área de menos de 0,5 por cento de monômero conforme determinado através de cromatografia por exclusão de tamanho e detecção espectrofotométrica; (k) polipeptídeos de CTLA4-Ig tendo um aminoácido pelo menos 95% idêntica a qualquer uma de SEQ ID NOS: 5-10; (l) moléculas de CTLA4-Ig capaz de ligação a CD80 e CD86; ou equivalentes farmacêuticos dos mes-
mos.

A invenção proporciona uma composição isolada compreenden-
25 do moléculas de CTLA4-Ig tendo uma incidência de imunogenicidade de menos de ou igual a 7,4%. Em uma modalidade, a incidência de imunogenicidade é de cerca de 2,1% a cerca de 7,4%. Em uma modalidade, a incidência de imunogenicidade é menos de ou igual a 3,7%. Em uma modalidade, a incidência de imunogenicidade é menos de ou igual a 3,0%. Em uma moda-
30 lidade, a incidência de imunogenicidade é de cerca de 2,8% a cerca de 3,0%. A invenção proporciona uma composição isolada compreendendo moléculas de CTLA4-Ig em que, após administração da composição a seres

humanos, a produção de anticorpos que se ligam às moléculas de CTLA4-Ig ocorre em uma incidência, em seres humanos, de menos de ou igual a 7,4%. Em uma modalidade, a incidência é de cerca de 2,1% a cerca de 7,4%. Em uma modalidade, a incidência é menos de ou igual a 3,7%. Em 5 uma modalidade, a incidência é menos de ou igual a 3,0%. Em uma modalidade, a incidência é de cerca de 2,8% a cerca de 3,0%. A invenção proporciona uma composição isolada compreendendo moléculas de CTLA4-Ig em que, após administração da composição a seres humanos, a produção de anticorpos que se ligam às porções de CTLA4 das moléculas de CTLA4-Ig 10 ocorre, em seres humanos, em uma incidência de menos de ou igual a 4,9%. Em uma modalidade, a incidência é de cerca de 0,5% a cerca de 4,9%. Em uma modalidade, a incidência é menos de ou igual a 1,2%. Em uma modalidade, a incidência é menos de ou igual a 1,0%. Em uma modalidade, a incidência é de cerca de 0,9% a cerca de 1,0%. Em uma modalidade, a incidência é medida em um ensaio imunoabsorvente enzima-ligado 15 (ELISA). Em uma modalidade, em que a incidência é medida em um ensaio de eletroquimioluminescência (ECL).

A invenção proporciona uma composição isolada compreendendo moléculas de CTLA4-Ig, em que, após administração da composição a 20 seres humanos, a produção de anticorpos que neutralizam as moléculas de CTLA4-Ig ocorre em uma incidência de menos de ou igual a 75% dos seres humanos tendo anticorpos que se ligam à porção de CTLA4 da molécula de CTLA4-Ig. Em uma modalidade, a incidência é 40-75%. Em uma modalidade, a incidência é menos de ou igual a 40%. Em uma modalidade, a incidência é medida em um ensaio repórter de luciferase célula-baseado. 25

A invenção proporciona um método para produção de proteína de CTLA4-Ig, o método compreendendo: (a) expansão de células de mamífero que produzem proteína de CTLA4-Ig, em que a expansão é de uma cultura originária para uma cultura líquida de pelo menos 10.000 L até a proteína de CTLA4-Ig ser produzida em um rendimento de pelo menos cerca de 30 0,5 gramas de proteína de CTLA4-Ig por litro de cultura líquida, conforme determinado através de ensaio de uma alíquota da cultura líquida; e (b) iso-

lamente da proteína de CTLA4-Ig de uma cultura líquida de pelo menos 10.000 L, em que o isolamento ocorre quando a cultura líquida exibe mais de ou igual a cerca de 6,0 moles de NANA por mol de dímero de CTLA4-Ig ou para molécula de CTLA4-Ig, conforme determinado através de ensaio de

5 uma alíquota da cultura líquida. O método também proporciona um método para produção de proteína de CTLA4-Ig, o método compreendendo: (a) expansão de células de mamífero que produzem proteína de CTLA4-Ig, em que a expansão é de uma cultura originária para uma cultura líquida de pelo menos 10.000 L até a proteína de CTLA4-Ig ser produzida em um rendimento

10 de pelo menos cerca de 0,5 gramas de proteína de CTLA4-Ig por litro de cultura líquida, conforme determinado através de ensaio de uma alíquota da cultura líquida; e (b) isolamento da proteína de CTLA4-Ig de uma cultura líquida de pelo menos 10.000 L, em que o isolamento ocorre quando a cultura líquida exibe de cerca de 5,2 a cerca de 7,6 moles de ácido siálico por mol

15 de dímero de CTLA4-Ig ou para molécula de CTLA4-Ig, conforme determinado através de ensaio de uma alíquota da cultura líquida. O método também proporciona um método para produção de proteína de CTLA4-Ig, o método compreendendo: (a) expansão de células de mamífero que produzem proteína de CTLA4-Ig, em que a expansão é de uma cultura originária para

20 uma cultura líquida de pelo menos 10.000 L até a proteína de CTLA4-Ig ser produzida em um rendimento de pelo menos cerca de 0,5 gramas de proteína de CTLA4-Ig por litro de cultura líquida, conforme determinado através de ensaio de uma alíquota da cultura líquida; e (b) isolamento da proteína de CTLA4-Ig de uma cultura líquida de pelo menos 10.000 L, em que o isolamento

25 ocorre quando a cultura líquida tem uma densidade celular de cerca de 33×10^5 células viáveis por mL de cultura líquida a cerca de 79×10^5 células por mL de cultura líquida. A invenção também proporciona um método para produção de proteína de CTLA4-Ig, o método compreendendo: (a) expansão de células de mamífero que produzem proteína de CTLA4-Ig, em

30 que a expansão é de uma cultura originária para uma cultura líquida de pelo menos 10.000 L até a proteína de CTLA4-Ig ser produzida em um rendimento de pelo menos cerca de 0,5 gramas de proteína de CTLA4-Ig por litro de

cultura líquida, conforme determinado através de ensaio de uma alíquota da cultura líquida; e (b) isolamento da proteína de CTLA4-Ig de uma cultura líquida de pelo menos 10.000 L, em que o isolamento ocorre quando a viabilidade celular na cultura líquida não é menos de cerca de 38%. A invenção

5 também proporciona um método para produção de proteína de CTLA4-Ig, o método compreendendo: (a) expansão de células de mamífero que produzem proteína de CTLA4-Ig, em que a expansão é de uma cultura originária para uma cultura líquida de pelo menos 10.000 L até a proteína de CTLA4-Ig ser produzida em um rendimento de pelo menos cerca de 0,5 gramas de

10 proteína de CTLA4-Ig por litro de cultura líquida, conforme determinado através de ensaio de uma alíquota da cultura líquida; e (b) isolamento da proteína de CTLA4-Ig de uma cultura líquida de pelo menos 10.000 L, em que o isolamento ocorre quando a viabilidade celular na cultura líquida não é menos de cerca de 37%. O método também proporciona um método para produção de proteína de CTLA4-Ig, o método compreendendo: (a) expansão de

15 células de mamífero que produzem proteína de CTLA4-Ig, em que a expansão é de uma cultura originária para uma cultura líquida de pelo menos 10.000 L até a proteína de CTLA4-Ig ser produzida em um rendimento de pelo menos cerca de 0,5 gramas de proteína de CTLA4-Ig por litro de cultura

20 líquida, conforme determinado através de ensaio de uma alíquota da cultura líquida; e (b) isolamento da proteína de CTLA4-Ig de uma cultura líquida de pelo menos 10.000 L, em que o isolamento ocorre quando a endotoxina é menos de ou igual a cerca de 76,8 EU por mL de cultura líquida, conforme determinado através de ensaio de uma alíquota da cultura líquida. O método

25 também proporciona um método para produção de proteína de CTLA4-Ig, o método compreendendo: (a) expansão de células de mamífero que produzem proteína de CTLA4-Ig, em que a expansão é de uma cultura originária para uma cultura líquida de pelo menos 10.000 L até a proteína de CTLA4-Ig ser produzida em um rendimento de pelo menos cerca de 0,5 gramas de

30 proteína de CTLA4-Ig por litro de cultura líquida, conforme determinado através de ensaio de uma alíquota da cultura líquida; e (b) isolamento da proteína de CTLA4-Ig de uma cultura líquida de pelo menos 10.000 L, em que o

isolamento ocorre quando a endotoxina é menos de ou igual a cerca de 4,8 EU por mL de cultura líquida, conforme determinado através de ensaio de uma alíquota da cultura líquida. A invenção também proporciona um método para produção de proteína de CTLA4-Ig, o método compreendendo: (a) expansão de células de mamífero que produzem proteína de CTLA4-Ig, em que a expansão é de uma cultura originária para uma cultura líquida de pelo menos 10.000 L até a proteína de CTLA4-Ig ser produzida em um rendimento de pelo menos cerca de 0,5 gramas de proteína de CTLA4-Ig por litro de cultura líquida, conforme determinado através de ensaio de uma alíquota da cultura líquida; e (b) isolamento da proteína de CTLA4-Ig de uma cultura líquida de pelo menos 10.000 L, em que o isolamento ocorre apenas quando a biocarga é menos de 1 unidade de formação de colônia por mL de cultura líquida, conforme determinado através de ensaio de uma alíquota da cultura líquida. A invenção também proporciona um método para produção de proteína de CTLA4-Ig, o método compreendendo: (a) expansão de células de mamífero que produzem proteína de CTLA4-Ig, em que a expansão é de uma cultura originária para uma cultura líquida de pelo menos 10.000 L até a proteína de CTLA4-Ig ser produzida em um rendimento de pelo menos cerca de 0,5 gramas de proteína de CTLA4-Ig por litro de cultura líquida, conforme determinado através de ensaio de uma alíquota da cultura líquida; e (b) isolamento da proteína de CTLA4-Ig de uma cultura líquida de pelo menos 10.000 L, em que o isolamento ocorre quando pelo menos duas das seguintes condições são reunidas: (i) a cultura líquida contém mais de ou igual a cerca de 6,0 moles de NANA por mol de dímero de CTLA4-Ig ou para molécula de CTLA4-Ig; (ii) a cultura líquida tem uma densidade celular de cerca de 33×10^5 células viáveis por mL de cultura líquida a cerca de 79×10^5 células viáveis por mL de cultura líquida; (iii) a viabilidade celular na cultura líquida não é menos de cerca de 38%; ou (iv) o rendimento de proteína de CTLA4-Ig é mais de cerca de 0,5 gramas de proteína de CTLA4-Ig por litro de cultura líquida, em que a concentração de NANA em (i) e o rendimento em (iv) são determinados através de ensaio de uma alíquota da cultura líquida. A invenção também proporciona um método para produção de proteína

de CTLA4-Ig, o método compreendendo: (a) expansão de células de mamífero que produzem proteína de CTLA4-Ig, em que a expansão é de uma cultura originária para uma cultura líquida de pelo menos 10.000 L até a proteína de CTLA4-Ig ser produzida em um rendimento de pelo menos cerca de 0,5 gramas de proteína de CTLA4-Ig por litro de cultura líquida, conforme determinado através de ensaio de uma alíquota da cultura líquida; e (b) isolamento da proteína de CTLA4-Ig de uma cultura líquida de pelo menos 10.000 L, em que o isolamento ocorre quando pelo menos duas das seguintes condições são reunidas: (i) a cultura líquida contém de cerca de 5,2 a cerca de 7,6 moles de ácido siálico por mol de dímero de CTLA4-Ig ou para molécula de CTLA4-Ig; (ii) a viabilidade celular na cultura líquida não é menos de cerca de 37%; ou (iii) o rendimento de proteína de CTLA4-Ig é mais de cerca de 0,5 gramas de proteína de CTLA4-Ig por litro de cultura líquida, em que o teor de ácido siálico em (i) e o rendimento em (iii) são determinados através de ensaio de uma alíquota da cultura líquida.

Seqüências:

SEQ ID NO: 1 [Seqüência de nucleotídeo de CTLA4-Ig, veja Fig. 1]

SEQ ID NO: 2 [Seqüência de aminoácido de CTLA4-Ig, veja Fig. 1]

SEQ ID NO: 3 [Seqüência de nucleotídeo de CTLA4^{A29YL104E}-Ig compreende nucleotídeos 79 a 1149 da seqüência de ácido nucleico mostrado em Fig. 2]

SEQ ID NO: 23 é a seqüência de nucleotídeo de comprimento total mostrada em Fig. 2. Essa seqüência de nucleotídeo inclui a seqüência de codificação para a pró-seqüência.

SEQ ID NO: 4 [Seqüência de aminoácido CTLA4^{A29YL104E}-Ig, Fig. 3, sem a pró-seqüência]

SEQ ID NO: 5 [aminoácidos 25-383 de SEQ ID NO: 2]
 MAMHVAQPAVVLASSRGIASFVCEYASPGKATEVRVTVLRQADSQVTEVC
 AATYMMGNELTFLDDSICTGTSSGNQVNLTIQGLRAMDTGLYICKVELMYP
 PPYYLGIGNGTQIYVIDPEPCPDSQEPKSSDKTHTSPSPAPPELLGGSSVF

LFPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR
 EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP
 REPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT
 PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS
 5 PGK

SEQ ID NO: 6 [aminoácidos 26-383 de SEQ ID NO: 2]

AMHVAQPAVVLASSRGIASFVCEYASPGKATEVRVTVLRQADSQVTEVCA
 ATYMMGNELTFLDDSICTGTSSGNQVNLTIQGLRAMDTGLYICKVELMYPP
 PYYLGIGNGTQIYVIDPEPCPDSQEPKSSDKTHTSPPSPAPPELLGGSSVFL
 10 FPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR
 EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP
 REPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT
 PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS
 PGK

15 SEQ ID NO: 7 [aminoácidos 27-383 de SEQ ID NO: 2]

MHVAQPAVVLASSRGIASFVCEYASPGKATEVRVTVLRQADSQVTEVCAAT
 YMMGNELTFLDDSICTGTSSGNQVNLTIQGLRAMDTGLYICKVELMYPPPY
 YLGIGNGTQIYVIDPEPCPDSQEPKSSDKTHTSPPSPAPPELLGGSSVFLFP
 PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
 20 QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE
 PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPP
 VLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
 K

SEQ ID NO: 8 [aminoácidos 25-382 de SEQ ID NO: 2]

MAMHVAQPAVVLASSRGIASFVCEYASPGKATEVRVTVLRQADSQVTEVC
 AATYMMGNELTFLDDSICTGTSSGNQVNLTIQGLRAMDTGLYICKVELMYP
 PPYYLGIGNGTQIYVIDPEPCPDSQEPKSSDKTHTSPPSPAPPELLGGSSVF
 LFPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR
 EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP
 30 REPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT
 PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS
 PG

SEQ ID NO: 9 [aminoácidos 26-382 de SEQ ID NO: 2]

AMHVAQPAVVLASSRGIASFVCEYASPGKATEVRVTVLRQADSQVTEVCA
 ATYMMGNELTFLDDSICTGTSSGNQVNLTIQGLRAMDTGLYICKVELMYPP
 PYYLGIGNGTQIYVIDPEPCPDSQEPKSSDKTHTSPPSPAPPELLGGSSVFL
 5 FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR
 EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP
 REPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT
 PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLS
 PG

10 SEQ ID NO: 10 [aminoácidos 27-382 de SEQ ID NO: 2]

MHVAQPAVVLASSRGIASFVCEYASPGKATEVRVTVLRQADSQVTEVCAAT
 YMMGNELTFLDDSICTGTSSGNQVNLTIQGLRAMDTGLYICKVELMYPPPY
 YLGIGNGTQIYVIDPEPCPDSQEPKSSDKTHTSPPSPAPPELLGGSSVFLFP
 PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
 15 QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE
 PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPP
 VLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

SEQ ID NO: 11 [aminoácidos 25-383 de SEQ ID NO: 4]

MAMHVAQPAVVLASSRGIASFVCEYASPGKYTEVRVTVLRQADSQVTEVC
 20 AATYMMGNELTFLDDSICTGTSSGNQVNLTIQGLRAMDTGLYICKVELMYP
 PYYEGIGNGTQIYVIDPEPCPDSQEPKSSDKTHTSPPSPAPPELLGGSSVF
 LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR
 EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP
 REPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT
 25 PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLS
 PGK

SEQ ID NO: 12 [aminoácidos 26-383 de SEQ ID NO: 4]

AMHVAQPAVVLASSRGIASFVCEYASPGKYTEVRVTVLRQADSQVTEVCA
 ATYMMGNELTFLDDSICTGTSSGNQVNLTIQGLRAMDTGLYICKVELMYPP
 30 PYYEGIGNGTQIYVIDPEPCPDSQEPKSSDKTHTSPPSPAPPELLGGSSVFL
 FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR
 EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP

REPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT
 PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS
 PGK

SEQ ID NO: 13 [aminoácidos 27-383 de SEQ ID NO: 4]

5 MHVAQPAVVLASSRGIASFVCEYASPGKYTEVRVTVLRQADSQVTEVCAAT
 YMMGNELTFLDDSICTGTSSGNQVNLTIQGLRAMDTGLYICKVELMYPPPY
 YEGIGNGTQIYVIDPEPCPDSQEPKSSDKTHTSPPSPAPPELLGGSSVFLFP
 PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
 QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE
 10 PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPP
 VLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
 K

SEQ ID NO: 14 [aminoácidos 25-382 de SEQ ID NO: 4]

MAMHVAQPAVVLASSRGIASFVCEYASPGKYTEVRVTVLRQADSQVTEVC
 15 AATYMMGNELTFLDDSICTGTSSGNQVNLTIQGLRAMDTGLYICKVELMYP
 PYYEGIGNGTQIYVIDPEPCPDSQEPKSSDKTHTSPPSPAPPELLGGSSVF
 LFPPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR
 EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP
 REPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT
 20 PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS
 PG

SEQ ID NO: 15 [aminoácidos 26-382 de SEQ ID NO: 4]

AMHVAQPAVVLASSRGIASFVCEYASPGKYTEVRVTVLRQADSQVTEVCA
 ATYMMGNELTFLDDSICTGTSSGNQVNLTIQGLRAMDTGLYICKVELMYPP
 25 PYYEGIGNGTQIYVIDPEPCPDSQEPKSSDKTHTSPPSPAPPELLGGSSVFL
 FPPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR
 EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP
 REPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT
 PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS
 30 PG

SEQ ID NO: 16 [aminoácidos 27-382 de SEQ ID NO: 4]

MHVAQPAVVLASSRGIASFVCEYASPGKYTEVRVTVLRQADSQVTEVCAAT

YMMGNELTFLDDSICTGTSSGNQVNLTIQGLRAMDTGLYICKVELMYPPPY
 YEGIGNGTQIYVIDPEPCPDSQEPKSSDKTHTSPPSPAPPELLGGSSVFLFP
 PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
 QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE
 5 PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP
 VLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

SEQ ID NO: 17

SEQ ID NO: 18 [domínio extracelular da seqüência de CTLA4]

MHVAQPAVVLASSRGIASFVCEYASPGKYTEVRVTVLRQADSQVTEVCAAT
 10 YMMGNELTFLDDSICTGTSSGNQVNLTIQGLRAMDTGLYICKVELMYPPPY
 YEGIGNGTQIYVIDPEPCPDS

SEQ ID NO: 19

5'-AGAAAAGGGGCTGGAGAGATGGCTCAGTGGTTAAGAGCA-3'

SEQ ID NOS: 20-22

15 SEQ ID NO: 20 -- 5'-GTACTCAGG

SEQ ID NO: 21 -- AGTCAGAGAC

SEQ ID NO: 22 -- CGGCAGATCTCTGTGAGTTTGAGGC-
 CAGCCTGG TCTACAAAGCAAGTT-3'

Monômeros e Multímeros de CTLA4-Ig

20 Em determinadas modalidades, a invenção proporciona uma
 linhagem de células tendo um cassete de expressão que compreende SEQ
 ID NO: 1 (FIG. 1A). Tal cassete de expressão, quando expresso em células
 de mamífero, incluindo células CHO, pode resultar na produção de variantes
 N- e C- terminais, de modo que a proteínas produzidas a partir do cassete
 25 de expressão podem ter a seqüência de aminoácido de resíduos: (i) 26-383
 de SEQ ID NO: 2, (ii) 26-382 de SEQ ID NO: 2; (iii) 27-383 de SEQ ID NO: 2
 ou (iv) 27-382 de SEQ ID NO: 2 ou opcionalmente (v) 25-382 de SEQ ID NO:
 2 ou (vi) 25-383 de SEQ ID NO: 2 (FIG. 1A). Essas proteínas podem ser re-
 feridas aqui como "monômeros de SEQ ID NO: 2" ou monômeros "tendo a
 30 seqüência SEQ ID NO: 2." Esses monômeros de SEQ ID NO: 2 podem di-
 merizar, de modo que combinações de dímero podem incluir, por exemplo:
 (i) e (i); (i) e (ii); (i) e (iii); (i) e (iv); (i) e (v); (i) e (vi); (ii) e (ii); (ii) e (iii); (ii) e

(iv); (ii) e (v); (ii) e (vi); (iii) e (iii); (iii) e (iv); (iii) e (v); (iii) e (vi); (iv) e (iv); (iv) e (v); (iv) e (vi); (v) e (v); (v) e (vi); e (vi) e (vi). Essas diferentes combinações de dímero podem também se associar umas com as outras para formar moléculas de CTLA4-Ig tetraméricas. Esses monômeros, dímeros, tetrâmeros e outros multímeros podem ser referidos aqui como "proteínas de SEQ ID NO: 2" ou proteínas "tendo a seqüência SEQ ID NO: 2". Embora a linhagem de células possa produzir essas variantes imediatamente quando de tradução, as variantes podem, mais tipicamente, ser um produto de ações pós-traducionais nas células. A linhagem de célula também secreta moléculas de CTLA4-Ig. Abatacept se refere à proteínas de SEQ ID NO: 2.

Moléculas de CTLA4-Ig podem incluir, por exemplo, proteínas de CTLA4-Ig nas formas de monômero, dímero, trímero, tetrâmero, pentâmero, hexâmero ou outras multiméricas. Moléculas de CTLA4-Ig podem compreender uma fusão de proteína com pelo menos um domínio extracelular de CTLA4 e uma região constante de imunoglobulina. Moléculas de CTLA4-Ig podem ter seqüências do tipo silvestre ou mutantes, por exemplo, com relação ao domínio extracelular de CTLA4 e seqüências de região constante de imunoglobulina. Monômeros de CTLA4-Ig, sozinhos ou na forma de dímero, tetrâmero ou outro multímero, podem ser glicosilados.

Em algumas modalidades, a invenção proporciona uma população de moléculas de CTLA4-Ig que têm pelo menos um determinado percentual de dímero ou outras moléculas multiméricas. Por exemplo, a invenção proporciona populações de moléculas de CTLA4-Ig que são mais de 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou 99,5% de dímeros de CTLA4-Ig. Em uma modalidade, a invenção proporciona uma população de moléculas de CTLA4-Ig que compreende cerca de 95% a cerca de 99,5% de dímero de CTLA4-Ig e de cerca de 0,5% a cerca de 5% de tetrâmero de CTLA4-Ig. Em outra modalidade, a população de moléculas de CTLA4-Ig compreende cerca de 98 % de dímero de CTLA4-Ig, cerca de 1,5% de tetrâmero de CTLA4-Ig e cerca de 0,5% monômero de CTLA4-Ig.

Em uma modalidade, a invenção proporciona uma população de moléculas de CTLA4-Ig em que a população é substancialmente isenta de

monômeros de moléculas de CTLA4-Ig. Substancialmente isenta de monômeros de moléculas de CTLA4-Ig pode se referir a uma população de moléculas de CTLA4-Ig que têm menos de 1%, 0,5% ou 0,1% de monômeros.

5 Em uma modalidade, a invenção proporciona uma população de moléculas de CTLA4-Ig, em que a população é substancialmente isenta de multímeros de CTLA4-Ig que são maiores do que dímeros, tais como tetrâmeros, hexâmeros, etc. (por exemplo, espécies de elevado peso molecular). Substancialmente isenta de moléculas multiméricas de CTLA4-Ig maiores do que dímeros pode se referir a uma população de moléculas de CTLA4-Ig
10 que têm menos de 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5% ou 0,1% de multímeros de CTLA4-Ig (por exemplo, espécies de elevado peso molecular) maiores do que a forma dimérica.

Um monômero de molécula de CTLA4-Ig pode ter, por exemplo, a seqüência de aminoácido de: (i) 26-383 de SEQ ID NO: 2, (ii) 26-382 de
15 SEQ ID NO: 2 (iii) 27-383 de SEQ ID NO: 2 ou (iv) 27-382 de SEQ ID NO: 2 ou opcionalmente (v) 25-382 de SEQ ID NO: 2 ou (vi) 25-383 de SEQ ID NO: 2. Quando um cassete de expressão compreendendo a seqüência de ácido nucleico de SEQ ID NO: 1 é expresso em células CHO, a forma monomérica predominante expressa tem o resíduo de aminoácido metionina no N-
20 término (resíduo 27 de SEQ ID NO: 2), o qual corresponde ao resíduo de aminoácido no N-término da CTLA4 humana do tipo silvestre. Contudo, em virtude do fato de SEQ ID NO: 1 também incluir a seqüência de codificação para uma seqüência sinalizadora de oncostatina M (nucleotídeos 11-88 de SEQ ID NO: 1), a proteína expressa de SEQ ID NO: 1 contém uma seqüên-
25 cia sinalizadora de oncostatina M. A seqüência sinalizadora é clivada da proteína expressa durante o processo de exportação de proteína do citoplasma ou secreção da célula. Mas clivagem pode resultar em variantes N-terminais, tal como clivagem entre resíduos de aminoácido 25 e 26 de SEQ ID NO. 2 (resultando em um N-término de resíduo 26, isto é, a "variante Ala") ou entre
30 resíduos de aminoácido 24 e 25 de SEQ ID NO. 2 (resultando em um N-término de resíduo 25, isto é, a "variante Met-Ala"), em oposição à clivagem entre resíduos de aminoácido 26 e 27 de SEQ ID NO. 2 (resultando em um

N-término de resíduo 27). Por exemplo, a variante Met-Ala pode estar presente em uma mistura de moléculas de CTLA4-Ig em cerca de 1% e a variante Ala pode estar presente em uma mistura de moléculas de CTLA4-Ig em cerca de 8-10%. Além disso, a proteína expressa de SEQ ID NO: 1 pode ter
 5 variantes C-terminais em virtude de processamento incompleto. O C-término predominante é a glicina no resíduo 382 de SEQ ID NO: 2. Em uma mistura de moléculas de CTLA4-Ig, monômeros tendo lisina no C-término (resíduo 383 de SEQ ID NO: 2) podem estar presentes, por exemplo, em cerca de 4-5%.

10 Em uma modalidade, a molécula de CTLA4-Ig tem a seqüência de aminoácido de **SEQ ID NO: 5** como segue (a qual é a mesma conforme os aminoácidos 25-383 de SEQ ID NO: 2):

[SEQ ID NO: 5]

MAMHVAQPAVVLASSRGIASFVCEYASPGKATEVRVTVLRQADSQVTEVC
 15 AATYMMGNELTFLDDSICTGTSSGNQVNLTIQGLRAMDTGLYICKVELMYP
 PYYLGIGNGTQIYVIDPEPCPDSQEPKSSDKTHTSPPSPAPPELLGGSSVF
 LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR
 EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP
 REPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT
 20 PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS
 PGK.

Em outra modalidade, a molécula de CTLA4-Ig tem a seqüência de aminoácido de **SEQ ID NO: 6** como segue (a qual é a mesma conforme os aminoácidos 26-383 de SEQ ID NO: 2):

25 **[SEQ ID NO: 6]**

AMHVAQPAVVLASSRGIASFVCEYASPGKATEVRVTVLRQADSQVTEVCA
 ATYMMGNELTFLDDSICTGTSSGNQVNLTIQGLRAMDTGLYICKVELMYP
 PYYLGIGNGTQIYVIDPEPCPDSQEPKSSDKTHTSPPSPAPPELLGGSSVFL
 FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR
 30 EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP
 REPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT
 PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS

PGK.

Em outra modalidade, a molécula de CTLA4-Ig tem a seqüência de aminoácido de **SEQ ID NO: 7** como segue (a qual é a mesma conforme os aminoácidos 27-383 de SEQ ID NO: 2):

5 **[SEQ ID NO: 7]**

MHVAQPAVVLASSRGIASFVCEYASPGKATEVRVTVLRQADSQV
 TEVCAATYMMGNELTFLDDSICTGTSSGNQVNLTIQGLRAMDTGLYICKVEL
 MYPPPYLIGINGTQIYVIDPEPCPDSQEPKSSDKTHTSPPSPAPPELLGG
 SSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK
 10 TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA
 KGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN
 NYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQK
 SLSLSPGK.

Em outra modalidade, a molécula de CTLA4-Ig tem a seqüência de aminoácido de **SEQ ID NO: 8** como segue (a qual é a mesma conforme os aminoácidos 25-382 de SEQ ID NO: 2):

[SEQ ID NO: 8]

MAMHVAQPAVVLASSRGIASFVCEYASPGKATEVRVTVLRQADS
 QVTEVCAATYMMGNELTFLDDSICTGTSSGNQVNLTIQGLRAMDTGLYICK
 20 VELMYPPPYLIGINGTQIYVIDPEPCPDSQEPKSSDKTHTSPPSPAPPELL
 GGSSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH
 NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI
 SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ
 PENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHY
 25 TQKSLSLSPG;

Em uma modalidade, a molécula de CTLA4-Ig tem a seqüência de aminoácido de **SEQ ID NO: 9** como segue (a qual é a mesma conforme os aminoácidos 26-382 de SEQ ID NO: 2):

[SEQ ID NO: 9]

30 AMHVAQPAVVLASSRGIASFVCEYASPGKATEVRVTVLRQADSQ
 VTEVCAATYMMGNELTFLDDSICTGTSSGNQVNLTIQGLRAMDTGLYICKV
 ELMYPPPYLIGINGTQIYVIDPEPCPDSQEPKSSDKTHTSPPSPAPPELLG

GSSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN
 AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS
 KAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP
 ENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYT
 5 QKSLSLSPG.

Em uma modalidade, a molécula de CTLA4-Ig tem a sequência de aminoácido de **SEQ ID NO: 10** como segue (a qual é a mesma conforme os aminoácidos 27-382 de SEQ ID NO: 2):

[**SEQ ID NO: 10**]

10 MHVAQPAVVLASSRGIASFVCEYASPGKATEVRVTVLRQADS
 QVTEVCAATYMMGNELTFLDDSICTGTSSGNQVNLTIQGLRAMDTGLYICK
 VELMYPPPYLIGINGTQIYVIDPEPCPDSQEPKSSDKTHTSPPSPAPPELL
 GGSSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH
 NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI
 15 SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ
 PENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHY
 TQKSLSLSPG.

Um monômero de molécula de CTLA4-Ig podem compreender um domínio extracelular de CTLA4 humana. Em uma modalidade, o domínio extracelular pode compreender a sequência de nucleotídeo dos nucleotídeos 89-463 de SEQ ID NO: 1 que codifica os aminoácidos 27-151 de SEQ ID NO: 2. Em outra modalidade, o domínio extracelular pode compreender sequências de CTLA4 humana mutante. Em outra modalidade, o domínio extracelular pode compreender alterações de nucleotídeo para os nucleotídeos 25 89-463 de SEQ ID NO: 1, de modo que alterações conservativas de aminoácido sejam feitas. Em outra modalidade, o domínio extracelular pode compreender uma sequência de nucleotídeo que é pelo menos 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% idêntica aos nucleotídeos 89-463 de SEQ ID NO: 1.

30 Um monômero de molécula de CTLA4-Ig pode compreender uma região constante de uma imunoglobulina humana. Essa região constante pode ser uma porção de uma região constante; essa região constante po-

de ter uma seqüência do tipo silvestre ou mutante. A região constante pode ser de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA1, IgA2, IgD ou IgE humana. A região constante pode ser de uma cadeia leve ou uma cadeia pesada de uma imunoglobulina. Onde a região constante é de uma molécula de IgG, IgD ou IgA. A região constante pode compreender um ou mais dos seguintes domínios de região constante: C_L, CH1, dobradiça, CH2 ou CH3. Onde a região constante é de IgM ou IgE, a região constante pode compreender um ou mais dos seguintes domínios de região constante: C_L, C_H1, C_H2, C_H3 ou C_H4. Em uma modalidade, a região constante pode compreender um ou mais domínios de domínios de região constante de IgG, IgD, IgA, IgM ou IgE.

Em uma modalidade, dímeros de CTLA4-Ig são compreendidos de dois monômeros, em que cada monômero pode ter a mesma ou uma seqüência de aminoácido diferente e onde a seqüência pode ser a seqüência de aminoácido de: (i) 26-383 de SEQ ID NO: 2, (ii) 26-382 de SEQ ID NO: 2, (iii) 27-383 de SEQ ID NO: 2, (iv) 27-382 de SEQ ID NO: 2, (v) 25-382 de SEQ ID NO: 2 e (vi) 25-383 de SEQ ID NO: 2. Tais monômeros de CTLA4-Ig podem dimerizar através do domínio extracelular da CTLA4 humana via um resíduo de aminoácido de cisteína na posição 146 de SEQ ID NO: 2.

A molécula de CTLA4-Ig pode multimerizar através da interação dos domínios de região constante de IgM ou IgA com uma proteína de cadeia J. IgM e IgA são usualmente produzidas como multímeros em associação com uma cadeia polipeptídica adicional, a cadeia J. Em IgM pentamérica, os monômeros são ligados cruzadamente através de ligações de dissulfeto uns aos outros no domínio CH3 e à cadeia J através do domínio CH4. IgM pode também formar hexâmeros que carecem de uma cadeia J, onde multimerização é obtida através de ligações de dissulfeto uns aos outros. Em IgA dimérica, os monômeros têm ligações de dissulfeto a uma cadeia J via seu domínio CH3 e não uns aos outros. Assim, em uma modalidade, a invenção proporciona multímeros de CTLA4-Ig, incluindo dímeros, pentâmeros e hexâmeros, em que a porção de Ig compreende uma região constante de IgM ou porção da mesma ou uma região constante de IgA ou porção da

mesma. Tais multímeros de CTLA4-Ig baseados em IgM ou IgA podem incluir a cadeia J.

5 Em uma modalidade, um monômero de molécula de CTLA4-Ig (No. de Acesso da CTLA4 ao GenBank I13253) compreende uma região de dobradiça de IgG1 humana modificada (nucleotídeos 464-508 de SEQ ID NO: 1; aminoácidos 152-166 de SEQ ID NO: 2) em que as serinas nos resíduos de aminoácido 156, 162 e 165 de SEQ ID NO: 2 foram manipuladas das cisteínas presentes na seqüência do tipo silvestre.

10 Em uma modalidade, um monômero de molécula de CTLA4-Ig compreende uma região CH2 de IgG1 humana modificada e uma região CH3 do tipo silvestre (o domínio C_H2 de IgG1 humana modificado tendo os nucleotídeos 509-838 de SEQ ID NO: 1 e aminoácidos 167-276 de SEQ ID NO: 2; o domínio C_H3 de IgG1 tendo os nucleotídeos 839-1159 de SEQ ID NO: 1 e aminoácidos 277-383 de SEQ ID NO: 2).

15 Em uma modalidade, uma população de moléculas de CTLA4-Ig compreende monômeros tendo uma seqüência mostrado em qualquer uma ou mais das Figuras 7, 8 ou 9 do pedido de Patente U.S. publicado como Publicação No. US 2002/0182211 A1 e nos pedidos de Patente U.S. publicados como Publicações Nos. US20030083246 e US20040022787, cada um dos quais é incorporado aqui por referência em sua totalidade.

20 Em uma modalidade, um tetrâmero de molécula de CTLA4-Ig compreende dois pares ou dois dímeros de polipeptídeos de CTLA4-Ig, em que cada polipeptídeo tem uma das seguintes seqüências de aminoácido: (i) 26-383 de SEQ ID NO: 2, (ii) 26-382 de SEQ ID NO: 2, (iii) 27-383 de SEQ ID NO: 2, (iv) 27-382 de SEQ ID NO: 2, (v) 25-382 de SEQ ID NO: 2 e (vi) 25-383 de SEQ ID NO: 2. Cada membro do par de polipeptídeos ou dímero é covalentemente ligado ao outro membro e os dois pares de polipeptídeos são não covalentemente associados um ao outro, desse modo, formando um tetrâmero. Tais moléculas tetraméricas são capazes de ligação ao CD80 ou CD86. Em outra modalidade, tais moléculas tetraméricas podem se ligar ao CD80 ou CD86 com uma avidéz que é pelo menos 2 vezes mais a avidéz de ligação de um dímero de CTLA4-Ig (cujos monômeros têm uma das seqüên-

30

5 cias de aminoácido acima) ao CD80 ou CD86. Em outra modalidade, tais moléculas tetraméricas podem se ligar ao CD80 ou CD86 com uma avidéz que é pelo menos 2 vezes mais a afinidade ou avidéz de ligação da CTLA4 do tipo silvestre ao CD80 ou CD86. Essa maior avidéz pode contribuir para maior eficácia no tratamento de distúrbios imunes e outras doenças conforme descrito abaixo, bem como em inibição rejeições a transplante de tecido e/ou órgão sólido. Além disso, avidéz maior ou aperfeiçoada pode produzir o resultado de maior potência de um fármaco. Por exemplo, uma composição

10 e, portanto, maior potência do que a mesma quantidade de uma composição terapêutica tendo monômero de CTLA4-Ig. Em outra modalidade, tais moléculas tetraméricas podem ter pelo menos uma inibição 2 vezes maior sobre a proliferação de células T quando comparado com um dímero de CTLA4-Ig (cujos monômeros têm uma das seqüências de aminoácido acima). Em outra

15 modalidade, tais moléculas tetraméricas podem ter pelo menos uma inibição 2 vezes maior sobre a proliferação de células T quando comparado com uma molécula de CTLA4 do tipo silvestre.

Monômeros, Dímeros e Multímeros de CTLA4^{A29YL104E}-Ig

20 CTLA4^{A29YL104E}-Ig são formas modificadas de CTLA4-Ig (FIG. 1A; SEQ ID NOS: 1-2). A modificação consiste de mutações de ponto que resultam em duas substituições de aminoácido (L104E e A29Y) conforme mostrado na FIG. 2 (correspondendo às posições de aminoácido 55 e 130 na FIG. 3; SEQ ID NO: 4). Com relação à CTLA4-Ig, CTLA4^{A29YL104E}-Ig (por exemplo, SEQ ID NOS: 5-10) se liga ao CD80 (B7-1) com avidéz aproximadamente 2 vezes aumentada e se liga CD86 (B7-2) com avidéz aproximadamente 4 vezes aumentada. CTLA4^{A29YL104E}-Ig são aproximadamente 10

25 vezes mais eficaz do que a CTLA4-Ig na inibição de proliferação de células T, produção de citocina e morte CD28-dependente de células alvo por células assassinas naturais. CTLA4^{A29YL104E}-Ig causa inibição modesta de proliferação de células T B7-1-mediada, mas é acentuadamente mais potente do

30 que CTLA4-Ig no bloqueio de proliferação de células T B7-2-mediada. A potência aumentada é comparável, quer através de bloqueio de B7-2 apenas

ou bloqueio de B7-1 e B7-2, sugerindo que a atividade imunomodulatória intensificada de CTLA4^{A29YL104E}-Ig pode mais provavelmente ser à potência intensificada para bloqueio de B7-2.

5 CTLA4^{A29YL104E}-Ig é uma proteína de fusão geneticamente modificada, a qual consiste do domínio de ligação funcional da CTLA-4 humana modificada e o domínio Fc da imunoglobulina humana da classe IgG1 (FIG. 3A-B). Duas substituições de aminoácido foram feitas na região de ligação a B7 do domínio de CTLA-4 (L104E e A29Y) para gerar uma molécula de CTLA4^{A29YL104E}-Ig. Um dímero de CTLA4^{A29YL104E}-Ig é compreendido de duas
10 cadeias de CTLA4^{A29YL104E}-Ig glicosiladas. Ela existe como um dímero covalente ligado através de uma ligação de dissulfeto inter-cadeia. Um modelo molecular de uma molécula de CTLA4^{A29YL104E}-Ig é mostrado na FIG. 4. Uma molécula de CTLA4^{A29YL104E}-Ig tem uma massa média de aproximadamente
15 desabsorção-ionização a laser matriz-assistida *time-of-flight* (MALDI-TOF).

Em determinadas modalidades, a invenção proporciona uma linhagem de células tendo um cassete de expressão que compreende SEQ ID NO: 3. Tal cassete de expressão, quando expresso em células de mamífero, por exemplo, células CHO, pode resultar na produção de Variantes N- e
20 C-terminais, de modo que os polipeptídeos produzidos a partir do cassete de expressão podem ter a seqüência de aminoácido de resíduos: (i) 26-383 de SEQ ID NO: 4, (ii) 26-382 de SEQ ID NO: 4; (iii) 27-383 de SEQ ID NO: 4 ou (iv) 27-382 de SEQ ID NO: 4 ou opcionalmente (v) 25-382 de SEQ ID NO: 4 ou (vi) 25-383 de SEQ ID NO: 4. Esses polipeptídeos podem ser referidos
25 aqui como "monômeros de SEQ ID NO: 4" ou monômeros "tendo a seqüência SEQ ID NO: 4".

Esses monômeros de SEQ ID NO: 4 podem dimerizar, de modo que combinações de dímero podem incluir, por exemplo: (i) e (i); (i) e (ii); (i) e (iii); (i) e (iv); (i) e (v); (i) e (vi); (ii) e (ii); (ii) e (iii); (ii) e (iv); (ii) e (v); (ii) e (vi); (iii) e (iii); (iii) e (iv); (iii) e (v); (iii) e (vi); (iv) e (iv); (iv) e (v); (iv) e (vi); (v) e (v); (v) e (vi); e (vi) e (vi). Essas diferentes combinações de dímero podem
30 também se associar umas com as outras para formar moléculas tetraméricas

de CTLA4^{A29YL104E}-Ig. Esses monômeros, dímeros, tetrâmeros e outros multímeros podem ser referidos aqui como "polipeptídeos de SEQ ID NO: 4" ou polipeptídeos "tendo a seqüência SEQ ID NO: 4". Embora a linhagem de células possa produzir essas variantes imediatamente quando de tradução, as variantes podem, mais tipicamente, ser um produto de ações pós-traducionais nas células. Dímeros pode ser covalentemente unidos juntos, não covalentemente unidos juntos ou ambos. A invenção proporciona composições que consistem essencialmente de dímeros que são covalentemente ligados juntos. Por exemplo, a invenção proporciona composições onde pelo menos 50% dos dímeros de CTLA4-Ig são compostos de monômeros covalentemente unidos. A invenção também proporciona composições onde pelo menos 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou 100% dos dímeros de CTLA4-Ig são compostos de monômeros covalentemente unidos. A invenção também proporciona composições de moléculas de CTLA4-Ig, em que as moléculas estão predominantemente na forma de dímero e os dímeros são predominantemente formados através de ligações covalentes. Por exemplo, a invenção proporciona uma composição em que a maioria dos dímeros de CTLA4-Ig são covalentemente unidos. É possível que alguma fração dos dímeros de CTLA4-Ig na composição sejam unidos não covalentemente.

Moléculas de CTLA4^{A29YL104E}-Ig podem incluir, por exemplo, CTLA4^{A29YL104E}-Ig nas formas de monômero, dímero, trímero, tetrâmero, pentâmero, hexâmero ou outras multiméricas. Moléculas de CTLA4^{A29YL104E}-Ig podem compreender uma fusão de proteína com pelo menos um domínio extracelular de modificada CTLA4 (SEQ ID NO: 18) e uma região constante de imunoglobulina. Moléculas de CTLA4^{A29YL104E}-Ig podem ter seqüências mutantes, por exemplo, com relação ao domínio extracelular modificado de CTLA4 e seqüências de região constante de imunoglobulina. Monômeros de CTLA4^{A29YL104E}-Ig, sozinhos ou na forma de dímero, tetrâmero ou outro multímero, podem ser glicosilados.

Em algumas modalidades, a invenção proporciona uma população de moléculas de CTLA4^{A29YL104E}-Ig que têm pelo menos um determinado

percentual de dímero ou outras moléculas multiméricas. Por exemplo, a invenção proporciona populações de moléculas de CTLA4^{A29YL104E}-Ig que são mais de 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou 99,5% de dímeros de CTLA4^{A29YL104E}-Ig. Em uma modalidade, a invenção proporciona uma população de moléculas de CTLA4^{A29YL104E}-Ig que compreende cerca de 95% a cerca de 99,5% de dímeros de CTLA4^{A29YL104E}-Ig e de cerca de 0,5% a cerca de 5% de tetrâmeros de CTLA4^{A29YL104E}-Ig. Em uma outra modalidade, a invenção proporciona uma população de moléculas de CTLA4^{A29YL104E}-Ig que compreende cerca de 95% a cerca de 99,5% de dímeros de CTLA4^{A29YL104E}-Ig, de cerca de 0,5% a cerca de 2,5% de monômeros de CTLA4^{A29YL104E}-Ig e de cerca de 0,5% a cerca de 5% de tetrâmeros de CTLA4^{A29YL104E}-Ig. Em outra modalidade, a população de moléculas de CTLA4^{A29YL104E}-Ig compreende cerca de 96% de dímeros de CTLA4^{A29YL104E}-Ig, cerca de 2,5% de tetrâmeros de CTLA4^{A29YL104E}-Ig e cerca de 0,5% de monômeros de CTLA4^{A29YL104E}-Ig.

Em uma modalidade, a invenção proporciona uma população de moléculas de CTLA4^{A29YL104E}-Ig em que a população é substancialmente isenta de monômeros de CTLA4^{A29YL104E}-Ig. Substancialmente isenta de monômeros de CTLA4^{A29YL104E}-Ig pode se referir a uma população de moléculas de CTLA4^{A29YL104E}-Ig que têm menos de 1%, 0,5% ou 0,1% de monômeros.

Em outra modalidade, a invenção proporciona uma população de moléculas de CTLA4^{A29YL104E}-Ig em que a população é substancialmente isenta de multímeros de CTLA4^{A29YL104E}-Ig que são maiores do que dímeros, tais como tetrâmeros, hexâmeros, etc. Substancialmente isenta de multímeros de CTLA4^{A29YL104E}-Ig maiores do que dímeros pode se referir a uma população de moléculas de CTLA4^{A29YL104E}-Ig que têm menos de 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5% ou 0,1% de multímeros de CTLA4^{A29YL104E}-Ig maiores do que dímeros.

Um monômero de CTLA4^{A29YL104E}-Ig pode ter, por exemplo, a seqüência de aminoácido de: (i) 26-383 de SEQ ID NO: 4, (ii) 26-382 de SEQ ID NO: 4 (iii) 27-383 de SEQ ID NO: 4 ou (iv) 27-382 de SEQ ID NO: 4 ou opcionalmente (v) 25-382 de SEQ ID NO: 4 ou (vi) 25-383 de SEQ ID NO:

4, Quando um cassete de expressão compreendendo a seqüência de ácido nucleico de SEQ ID NO: 3 ou 23 é expresso em células CHO, a forma monomérica predominante expressa tem o resíduo de aminoácido metionina no N-término (resíduo 27 de SEQ ID NO: 4), o qual corresponde ao resíduo de aminoácido no N-término de CTLA4 humana. Contudo, em virtude do fato de SEQ ID NO: 23 também inclui a seqüência de codificação para uma seqüência sinalizadora de oncostatina M (nucleotídeos 11-88 de SEQ ID NO: 23), a proteína expressa de SEQ ID NO: 23 contém uma seqüência sinalizadora de oncostatina M.

10 A seqüência sinalizadora é clivada da proteína expressa durante o processo de exportação de proteína do citoplasma ou secreção da célula, mas clivagem pode resultar em variantes N-terminais, tais como clivagem entre resíduos de aminoácido 25 e 26 de SEQ ID NO: 4 (resultando em um N-término de resíduo 26, isto é, a "variante Ala") ou entre resíduos de aminoácido 24 e 25 SEQ ID NO: 4 (resultando em um N-término de resíduo 25, isto é, a "variante Met-Ala"), em oposição à clivagem entre resíduos de aminoácido 26 e 27 SEQ ID NO: 4 (resultando em um N-término começando com o resíduo de Met na posição de aminoácido 27). Por exemplo, a variante Met-Ala pode estar presente em uma mistura de moléculas de CTLA4^{A29YL104E}-Ig em cerca de 1% e a variante Ala pode estar presente em uma mistura de moléculas de CTLA4^{A29YL104E}-Ig em cerca de 10-20%.

25 Além disso, a proteína expressa a partir de um ácido nucleico compreendendo SEQ ID NO: 3 pode ter variantes C-terminais em virtude de processamento incompleto. O C-término predominante é a glicina no resíduo 382 de SEQ ID NO: 4. Em uma mistura de moléculas de CTLA4^{A29YL104E}-Ig, monômeros tendo lisina no C-término (resíduo 383 de SEQ ID NO: 4) podem estar presente, por exemplo, em cerca de 4-8%.

30 Em uma modalidade, uma molécula de CTLA4^{A29YL104E}-Ig compreende a seqüência de aminoácido de SEQ ID NO: 11 como segue (a qual é a mesma conforme os aminoácidos 25-383 de SEQ ID NO: 4):

[SEQ ID NO: 11]

MAMHVAQPAVV LASSRGIASFVCEYASPGKYTEVRVTVLRQADS

QVTEVCAATYMMGNELTFLDDSICTGTSSGNQVNLTIQGLRAMDTGLYICK
 VELMYPPYYEGIGNGTQIYVIDPEPCPDSQEPKSSDKTHTSPPSPAPPELL
 GGSSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH
 NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI
 5 SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ
 PENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHY
 TQKSLSLSPGK.

Em outra modalidade, uma molécula de CTLA4^{A29YL104E}-Ig com-
 preende a seqüência de aminoácido de **SEQ ID NO: 12** como segue (a qual
 10 é a mesma conforme os aminoácidos 26-383 de SEQ ID NO: 4):

[SEQ ID NO: 12]

MHVAQPAVVLASSRGIASFVCEYASPGKYTEVRVTVLRQADSQV
 TEVCAATYMMGNELTFLDDSICTGTSSGNQVNLTIQGLRAMDTGLYICKVEL
 MYPPPYEYEGIGNGTQIYVIDPEPCPDSQEPKSSDKTHTSPPSPAPPELLGG
 15 SSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK
 TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA
 KGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN
 NYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK
 SLSLSPGK.

20 Em uma outra modalidade, uma molécula de CTLA4^{A29YL104E}-Ig
 compreende a seqüência de aminoácido de **SEQ ID NO: 13** como segue (a
 qual é a mesma conforme os aminoácidos 27-383 de SEQ ID NO: 4):

[SEQ ID NO: 13]

MHVAQPAVVLASSRGIASFVCEYASPGKYTEVRVTVLRQADSQV
 25 TEVCAATYMMGNELTFLDDSICTGTSSGNQVNLTIQGLRAMDTGLYICKVEL
 MYPPPYEYEGIGNGTQIYVIDPEPCPDSQEPKSSDKTHTSPPSPAPPELLGG
 SSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK
 TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA
 KGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN
 30 NYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK
 SLSLSPGK.

Em outra modalidade, uma molécula de CTLA4^{A29YL104E}-Ig com-

preende a seqüência de aminoácido de **SEQ ID NO: 14** como segue (a qual é a mesma conforme os aminoácidos 25-382 de SEQ ID NO: 4):

[SEQ ID NO: 14]

MAMHVAQPAVV LASSRG IAS FVCEYASPGKYTEVRVTVLRQADS
 5 QVTEVCAATYMMGNELTFLDDSICTGTSSGNQVNLTIQGLRAMDTGLYICK
 VELMYPPPYE GIGNGTQIYVIDPEPCPDS DQEPKSSDKTHTSPPSPAPPELL
 GGSSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH
 NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI
 SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ
 10 PENNYKTTTPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHY
 TQKSLSLSPG.

Em uma modalidade, uma molécula de CTLA4^{A29YL104E}-Ig tem a seqüência de aminoácido de **SEQ ID NO: 15** como segue (a qual é a mesma conforme os aminoácidos 26-382 de SEQ ID NO: 4):

[SEQ ID NO: 15]

AMHVAQPAVV LASSRG IAS FVCEYASPGKYTEVRVTVLRQADSQ
 VTEVCAATYMMGNELTFLDDSICTGTSSGNQVNLTIQGLRAMDTGLYICKV
 ELMYPPPYE GIGNGTQIYVIDPEPCPDS DQEPKSSDKTHTSPPSPAPPELLG
 GSSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN
 20 AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS
 KAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP
 ENNYKTTTPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYT
 QKSLSLSPG.

Em uma outra modalidade, uma molécula de CTLA4^{A29YL104E}-Ig
 25 tem a seqüência de aminoácido de **SEQ ID NO: 16** como segue (a qual é a mesma conforme os aminoácidos 27-382 de SEQ ID NO: 4):

[SEQ ID NO: 16]

MHVAQPAVV LASSRG IAS FVCEYASPGKYTEVRVTVLRQADSQV
 TEVCAATYMMGNELTFLDDSICTGTSSGNQVNLTIQGLRAMDTGLYICKVEL
 30 MYPPPYE GIGNGTQIYVIDPEPCPDS DQEPKSSDKTHTSPPSPAPPELLGG
 SSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK
 TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA

KGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN
 NYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQK
 SLSLSPG.

Um monômero de CTLA4^{A29YL104E}-Ig compreende um domínio
 5 extracelular de CTLA4 humana, em que duas substituições de aminoácido
 foram feitas no domínio de CTLA-4 (L104E e A29Y) (FIG. 5). Em uma moda-
 lidade, o domínio extracelular pode compreender a seqüência de nucleotídeo
 dos nucleotídeos 89-463 de SEQ ID NO: 23 que codificam os aminoácidos
 27-151 de SEQ ID NO: 4. Em outra modalidade, o domínio extracelular pode
 10 compreender seqüências de CTLA4 humana mutante (tais como mutantes
 em um único, em dois e três sítios nos aminoácidos 27-151 de SEQ ID NO:
 4). Em outra modalidade, o domínio extracelular pode compreender altera-
 ções de nucleotídeo para os nucleotídeos 89-463 de SEQ ID NO: 23, de
 modo que alterações conservativas de aminoácido sejam feitas. Em uma
 15 outra modalidade, o domínio extracelular pode compreender alterações de
 nucleotídeo para os nucleotídeos 89-463 de SEQ ID NO: 23, de modo que
 alterações não conservativas de aminoácido sejam feitas. Em outra modali-
 dade, o domínio extracelular pode compreender uma seqüência de nucleotí-
 deo que é pelo menos 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99%
 20 idêntica aos nucleotídeos 89-463 de SEQ ID NO: 23.

Um monômero de CTLA4^{A29YL104E}-Ig pode compreender uma
 região constante de uma imunoglobulina humana. Essa região constante
 pode ser uma porção de uma região constante. Essa região constante tam-
 bém pode ter uma seqüência do tipo silvestre ou mutante. A região constan-
 25 te pode ser de IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgM, IgA₁, IgA₂, IgD ou IgE humana. A
 região constante pode ser de uma cadeia leve ou uma cadeia pesada de
 uma imunoglobulina. Onde a região constante é de uma molécula de IgG,
 IgD ou IgA, a região constante pode compreender um ou mais dos seguintes
 domínios de região constante: C_L, C_{H1}, dobradiça, C_{H2} ou C_{H3}. Onde a regi-
 30 ão constante é de IgM ou IgE, a região constante pode compreender um ou
 mais dos seguintes domínios de região constante: C_L, C_{H1}, C_{H2}, C_{H3} ou
 C_{H4}. Em uma modalidade, a região constante pode compreender um ou

mais domínios de região constante de IgG, IgD, IgA, IgM ou IgE.

Em uma modalidade, dímeros de CTLA4^{A29YL104E}-Ig são compreendidos de dois monômeros, em que cada monômero pode ter a mesma ou uma seqüência de aminoácido diferente e onde a seqüência pode ser a seqüência de aminoácido de: (i) 26-383 de SEQ ID NO: 4, (ii) 26-382 de SEQ ID NO: 4, (iii) 27-383 de SEQ ID NO: 4, (iv) 27-382 de SEQ ID NO: 4, (v) 25-382 de SEQ ID NO: 4 e (vi) 25-383 de SEQ ID NO: 4. Tais monômeros de CTLA4^{A29YL104E}-Ig podem dimerizar através do domínio extracelular da seqüência de CTLA4 humana via um resíduo de aminoácido de cisteína na posição 146 de SEQ ID NO: 4 (ou resíduo de aminoácido de cisteína na posição 120 da FIG. 5).

Uma molécula de CTLA4^{A29YL104E}-Ig pode multimerizar através da interação de domínios de região constante de IgM ou IgA com uma proteína de cadeia J. IgM e IgA são usualmente produzidas como multímeros em associação com uma cadeia polipeptídica adicional, a cadeia J. Em IgM pentamérica, os monômeros são ligados cruzadamente através de ligações de dissulfeto uns aos outros no domínio C_H3 e a uma cadeia J através do domínio C_H4. IgM também pode formar hexâmeros que carecem de uma cadeia J, onde multimerização é obtida através de ligações de dissulfeto uns aos outros. Em IgA dimérica, os monômeros têm ligações de dissulfeto à cadeia J via seu domínio C_H3 e não uns aos outros. Assim, em uma modalidade, a invenção proporciona multímeros de CTLA4^{A29YL104E}-Ig, incluindo dímeros, pentâmeros e hexâmeros, em que a porção de Ig compreende uma região constante de IgM ou porção da mesma ou uma região constante de IgA ou porção da mesma. Tais multímeros de CTLA4^{A29YL104E}-Ig baseados em IgM ou IgA podem incluir a cadeia J.

Em uma modalidade, um monômero de CTLA4^{A29YL104E}-Ig compreende uma região de dobradiça de IgG1 humana modificada (nucleotídeos 464-508 de SEQ ID NO: 23; aminoácidos 152-166 de SEQ ID NO: 4) em que os resíduos de serina nas posições 156, 162 e 165 de SEQ ID NO: 4 foram manipulados com relação aos resíduos de cisteína presentes na seqüência do tipo silvestre.

Em uma modalidade, um monômero de CTLA4^{A29YL104E}-Ig compreende uma região CH2 de IgG1 humana modificada e uma região CH3 do tipo silvestre (o domínio C_H2 de IgG1 humana modificado tendo os nucleotídeos 509-838 de SEQ ID NO: 1 e aminoácidos 167-276 de SEQ ID NO: 2; o

5 domínio C_H3 de IgG1 humana modificado tendo os nucleotídeos 839-1159 de SEQ ID NO: 1 e aminoácidos 277-383 de SEQ ID NO: 2).

Em uma modalidade, uma população de moléculas de CTLA4^{A29YL104E}-Ig compreende monômeros tendo uma seqüência mostrada nas Publicações de Pedido de Patente U.S. Nos. U.S. 2002/0039577, U.S. 2003/0007968, U.S. 2004/0022787, U.S. 2005/0019859 e U.S. 2005/0084933 e Patente U.S. No. 7,094,874, cada uma das quais é incorporada aqui por referência em sua totalidade.

10

Em uma modalidade, um tetrâmero de CTLA4^{A29YL104E}-Ig compreende dois pares ou dois dímeros de moléculas de CTLA4^{A29YL104E}-Ig, em que cada polipeptídeo tem uma das seguintes seqüências de aminoácido: (i) 26-383 de SEQ ID NO: 4, (ii) 26-382 de SEQ ID NO: 4, (iii) 27-383 de SEQ ID NO: 4, (iv) 27-382 de SEQ ID NO: 4, (v) 25-382 de SEQ ID NO: 4 e (vi) 25-383 de SEQ ID NO: 4. Cada membro do par de polipeptídeos ou dímero é covalentemente ligado ao outro membro e os dois pares de polipeptídeos são não covalentemente associados um ao outro desse modo, formando um tetrâmero. Tais moléculas tetraméricas são capazes de ligação ao CD80 ou CD86. Em outra modalidade, tais moléculas tetraméricas podem se ligar ao CD80 ou CD86 com uma avides que é pelo menos 2 vezes maior do que a avides de ligação de um dímero de CTLA4^{A29YL104E}-Ig (cujos monômeros têm

20

25 uma das seqüências de aminoácido acima) ao CD80 ou CD86.

Essa maior avides pode contribuir para maior eficácia no tratamento de distúrbios imunes e outras doenças conforme descrito abaixo, bem como em inibição rejeições a transplante de tecido e/ou órgão sólido. Além disso, avides maior ou aperfeiçoada pode produzir o resultado de maior potência de um fármaco. Por exemplo, uma composição terapêutica compreendendo tetrâmero de CTLA4^{A29YL104E}-Ig teria uma maior avides e, portanto, maior potência do que a mesma quantidade de uma composição terapêutica

30

tendo monômero de CTLA4^{A29YL104E}-Ig. Em outra modalidade, tais moléculas tetraméricas podem ter pelo menos uma inibição 2 vezes maior sobre a proliferação de células T quando comparado com um dímero de CTLA4^{A29YL104E}-Ig (cujos monômeros têm uma das seqüências de aminoácido acima). Em
 5 outra modalidade, tais moléculas tetraméricas pode ter pelo menos uma inibição 2 vezes maior sobre a proliferação de células T quando comparado com um tetrâmero de molécula de CTLA4-Ig.

Caracterização de moléculas de CTLA4-Ig e CTLA4^{A29YL104E}-Ig

10 A proliferação de células T pode ser medida usando ensaios padrões conhecidos na técnica. Por exemplo, uma das formas mais comuns para avaliar a proliferação de células T é estimular células T via um antígeno ou anticorpos agonísticos ao TCR e medir, por exemplo, a incorporação de timidina tritiada (³H-TdR) em células T em proliferação ou a quantidade de
 15 citocinas liberadas por células T em proliferação em cultura. O efeito inibitório de moléculas de CTLA4-Ig ou CTLA4^{A29YL104E}-Ig sobre a ativação ou proliferação de células T pode, desse modo, ser medido.

A afinidade da molécula de CTLA4-Ig é a resistência de ligação da molécula a um único ligante, incluindo CD80, CD86 ou proteínas de fusão de CD80Ig ou CD86Ig. A afinidade de CTLA4-Ig ou CTLA4^{A29YL104E}-Ig a li-
 20 gantes pode ser medida, por exemplo, usando análise de interação de ligação (BIA) baseada na técnica de plasmônio em superfície. Além de medição da resistência de ligação, ela permite determinação em tempo real da cinética de ligação, tal como constantes de associação e dissociação. Um chip
 25 sensor, consistindo de uma lâmina de vidro revestida com um filme fino de metal, ao qual uma matriz de superfície está covalentemente presa, é revestido com um dos agentes de interação, isto é, CTLA4-Ig, CTLA4^{A29YL104E}-Ig ou um dos ligantes. Uma solução contendo o outro agente de interação é deixada fluir sobre sua superfície. Um feixe de luz contínuo é dirigido contra
 30 o outro lado da superfície e seu ângulo de reflexão é medido. Quando de ligação de CTLA4-Ig ou CTLA4^{A29YL104E}-Ig ao ligante, o ângulo de ressonância das alterações do feixe de luz (uma vez que ele depende do índice refra-

tivo do meio próximo ao lado reativo do sensor o qual, por sua vez, está diretamente correlacionado à concentração do material dissolvido no meio). Ela é subseqüentemente analisada como o auxílio de um computador.

Em uma modalidade, experimentos de ligação de CTLA4-Ig podem ser realizados através de ressonância de plasmônio em superfície (SPR) sobre um instrumento bacuri (BIAcore AG, Uppsala, Suécia). CTLA4-Ig pode ser covalentemente acoplada, através de grupos amina primária, a uma matriz de dextrana carbóximetilada sobre um chip sensor BIAcore, desse modo, imobilizando a CTLA4-Ig ao chip sensor. Alternativamente, um anticorpo anti-região constante pode ser usado para imobilizar CTLA4-Ig indiretamente à superfície do sensor via o fragmento de Ig. Após o que, os ligantes são adicionados ao chip para medir a ligação de CTLA4-Ig aos ligantes. Medições de afinidade podem ser realizadas, por exemplo, conforme descrito em van der Merwe, P. e colaboradores, *J. Exp. Med.* (1997) 185 (3): 393-404, o qual é incorporado aqui por referência em sua totalidade. Em outra modalidade, experimentos de ligação de CTLA4^{A29YL104E}-Ig podem ser realizados usando a tecnologia de ressonância de plasmônio em superfície (SPR) conforme descrito acima (FIG. 6; veja Exemplo 21).

A avidéz de moléculas de CTLA4-Ig ou CTLA4^{A29YL104E}-Ig pode também ser medida. A avidéz pode ser definida como a soma total da resistência de ligação de duas moléculas ou células umas às outras em múltiplos sítios. A avidéz é distinta de afinidade, a qual é a resistência de ligação de um sítio sobre uma molécula a seu ligante. Sem estar preso pela teoria, maior avidéz de moléculas de CTLA4-Ig ou CTLA4^{A29YL104E}-Ig pode levar à potência aumentada de inibição por moléculas de CTLA4-Ig ou CTLA4^{A29YL104E}-Ig sobre a proliferação e ativação de células T. A avidéz pode ser medida, por exemplo, através de duas categorias de ensaios em fase sólida: a) ensaios de inibição competitiva e b) ensaios de eluição, em ambos os quais o ligante é preso a um suporte sólido. No ensaio de ligação competitiva, moléculas de CTLA4-Ig ou CTLA4^{A29YL104E}-Ig são, então, adicionadas em solução em uma concentração fixa, junto com ligante livre, em diferentes concentrações e a quantidade de ligante a qual inibe a ligação em fase sólí-

da em 50%, é determinada. Quanto menos ligante necessário, mais forte a avides. Em ensaios de eluição, o ligante é adicionado em solução. Após obtenção de um estado de equilíbrio, um caotrope ou agente desnaturante (por exemplo isotiocianato, uréia ou dietilamina) é adicionado em diferentes concentrações para romper interações CTLA4-Ig/ligante ou interações CTLA4^{A29YL104E}-Ig /ligante. A quantidade de CTLA4-Ig ou CTLA4^{A29YL104E}-Ig que resiste à eluição é determinada, após o que, com um ELISA. Quanto maior a avides, mais agente caotrópico é necessário para eluir uma determinada quantidade de CTLA4-Ig ou CTLA4^{A29YL104E}-Ig. A avides relativa de uma mistura heterogênea de moléculas de CTLA4-Ig ou CTLA4^{A29YL104E}-Ig pode ser expressa como o índice de avides (AI), igual à concentração de agente de eluição necessário para eluir 50% das moléculas de CTLA4-Ig ou CTLA4^{A29YL104E}-Ig ligadas. Análise refinada de dados pode ser realizada através de determinação dos percentuais de CTLA4-Ig ou CTLA4^{A29YL104E}-Ig eluída em diferentes concentrações do agente de eluição.

Um processo de cromatografia em coluna de Fluxo Rápida em fenil Sepharose 4, Cromatografia de interação hidrofóbica (HIC), pode ser usado para reduzir a quantidade de espécies de elevado peso molecular de CTLA4-Ig eluídas em uma etapa de purificação por HIC (veja Exemplo 15). Portanto, o pico de clarificação da coluna de HIC é enriquecido em espécies de CTLA4-Ig de HMW. Por exemplo, SEC HPLC em coluna preparativa única ou aleatória pode ser empregada para purificar as sub-populações de dímero, tetrâmero e multímero do material de pico de clarificação por HIC. Em uma modalidade, os componentes purificados são dímeros, tetrâmeros e hexâmeros de CTLA4-Ig. Caracterização de componentes de espécies de elevado peso molecular de CTLA4-Ig presentes em um pico de clarificação por HIC pode ser feita através de técnicas de dispersão estática e dinâmica de luz. Amostras tomadas em uma etapa de processo de cromatografia de interação hidrofóbica (HIC) revelaram a presença de dímeros, tetrâmeros e multímeros em vários pontos de amostragem. Espécies de hexâmero podem ser detectadas apenas em amostras correspondendo ao "início do pico de clarificação" e "OD máxima de pico de clarificação". Espécies decaméricas

foram detectadas na "OD máxima de pico de clarificação. A massa molar e formação de raio dinâmico podem ser determinadas através de fracionamento via cromatografia por exclusão de tamanho (SEC) empregando dispersão de luz em múltiplos ângulos (MALS) acoplada com detecção por dispersão de luz *quasi* elástica (QELS).

Com relação à moléculas de CTLA4-Ig produzidas a partir de uma linhagem de célula, SEC mostra um eluato de proteína A que é uma mistura de componentes de multímero, tetrâmero e dímero. Fracionamento dessa mistura sobre uma coluna de SEC aleatória preparativa permite isolamento de quantidades de espécies multiméricas, tetraméricas e diméricas. A recuperação de área percentual para cada componente em análise por SEC das frações isoladas resulta em 93-98% de homogeneidade para cada fração. Em um aspecto, purificação dos componentes individuais permite comparação das propriedades físico-químicas de componentes de material de CTLA4-Ig de HMW daqueles de dímeros de CTLA4-Ig. A FIG. 7 mostra os pesos moleculares evidentes, os quais correspondem às frações de multímero, tetrâmero e dímero do pico de clarificação de CTLA4-Ig por HIC, conforme determinado através de SEC com detecção por dispersão dinâmica de luz (DSL) e tempo de retenção sobre SEC. Em uma modalidade, a atividade de ligação bio-específica de componentes purificados do pico de clarificação por HIC é comparável à atividade de ligação determinada através de um ensaio de ligação de B7-Ig imobilizado baseado em BIAcore. Em outro aspecto, a proporção molar de ácido siálico para componentes isolados do pico de clarificação por HIC está na faixa de 4,9 a 7,6, enquanto que a proporção molar de ácido siálico de moléculas ou dímeros de CTLA4-Ig (não no pico de clarificação por HIC) está na faixa de 8- 10. Análise em um gel de IEF indica mobilidade reduzida de isoformas de CTLA4-Ig purificadas de um pico de clarificação por HIC comparado com a migração de dímeros de CTLA4-Ig. Isso é consistente com menores proporções de ácido siálico observadas para as frações de pico de clarificação por HIC de CTLA4-Ig (FIG. 8).

A escolha das condições de cultura de células pode influenciar a formação de espécies com cadeia simples (isto é, monômeros) e de elevado

peso molecular (isto é, dímeros, tetrâmeros, etc.) de um produto de proteína recombinante. Condições de crescimento também incluindo, mas não limitado a, composição do meio, são fatores que podem afetar a formação de cadeia simples e o nível de cisteinilação. Isso é, provavelmente, o resultado da presença de agentes que levam à redução da ligação de dissulfeto. A suplementação de cisteína diretamente ou meio contendo cisteína à células que secretam CTLA4-Ig ou CTLA4^{A29YL104E}-Ig pode resultar em uma rápida formação de espécies de cadeia simples e de elevado peso molecular. A taxa é proporcional à quantidade de cisteína adicionada. Em outra modalidade, a suplementação de iodoacetamida, um composto que reage com as sulfidrilas livres, bloqueia a formação de espécies de elevado peso molecular de CTLA4-Ig ou CTLA4^{A29YL104E}-Ig que são dependentes de ligações de dissulfeto.

Por exemplo, a via de espécies de elevado peso molecular sensíveis e não-sensíveis à iodoacetamida destaca dois mecanismos principais e distintamente diferentes pelos quais espécies de elevado peso molecular podem se formar em CTLA4-Ig. A suplementação de altas concentrações de sal (0,5M) às soluções de CTLA4-Ig resulta em uma taxa rápida, sustentada de formação de espécies de elevado peso molecular. EDTA, ConAcidSol II e isolados de levedo aumentam a formação de cadeia simples (veja Exemplo 5).

Em determinadas modalidades, a invenção proporciona métodos para a geração de populações de espécies de elevado peso molecular de CTLA4-Ig, em que misturas contendo predominantemente monômeros ou dímeros de CTLA4-Ig são suplementadas com alta concentração de sal, de modo que a mistura tem uma concentração de sal de mais de cerca de 0,3, 0,4, 0,45, 0,5 ou 0,6M. Em uma modalidade, tais métodos geram uma mistura compreendendo uma população de CTLA4-Ig que tem pelo menos 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% ou 95% de moléculas tetraméricas de CTLA4-Ig.

Em uma modalidade, a invenção proporciona uma população de espécies de CTLA4-Ig com cadeia simples contendo uma modificação sobre

a Cys¹⁴⁶, de modo que ela é cisteinilada (veja Exemplo 4). Cisteinilação é uma modificação pós-traducional em que a cisteína dentro de uma cadeia polipeptídica é modificada através da fixação de outra cisteína via uma ligação de dissulfeto. Cisteinilação de proteínas implica em modificação de bioatividade da proteína, incluindo imunogenicidade e antigenicidade de determinantes virais restritas à Classe I do MHC. Em uma modalidade, a invenção proporciona uma composição que compreende pelo menos 1, 5, 10, 15, 20, 25, 50, 75, 90 ou 95% de moléculas de CTLA4-Ig cisteiniladas com cadeia simples. Em outra modalidade da invenção, uma população de CTLA4-Ig tem não mais do que cerca de 1% de monômeros de moléculas de CTLA4-Ig ou, em outra modalidade, menos de 0,6% de monômeros de CTLA4-Ig.

A presente invenção proporciona uma composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig, em que as moléculas de CTLA4-Ig têm uma proporção molar média de ácido siálico para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 5 a cerca de 18. Em algumas modalidades, a proporção molar média de ácido siálico para moléculas de CTLA4-Ig está entre de cerca de X a cerca de Y, inclusive de X e Y, onde X é cerca de 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 ou 17 e Y é cerca de 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 ou 18. Em outras modalidades a proporção molar média de ácido siálico para moléculas de CTLA4-Ig está entre de cerca de X a cerca de Y, inclusive de X e Y, onde X é cerca de 4,0, 4,5, 5,0, 5,5 ou 6,0 e Y é cerca de 8,0, 8,5, 9,0, 9,5 ou 10,0. Em outras modalidades, a proporção molar média de ácido siálico para moléculas de CTLA4-Ig está entre de cerca de X a cerca de Y, inclusive de X e Y, onde X é cerca de 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5 ou 9,0 e Y é cerca de 11,0, 11,5, 12,0, 12,5 ou 13,0. Em outras modalidades, a proporção molar média de ácido siálico para moléculas de CTLA4-Ig é de cerca de 6 a cerca de 14, de cerca de 7 a cerca de 13, de cerca de 8 a cerca de 12 ou de cerca de 9 a cerca de 11. Em outras modalidades, a proporção molar média de ácido siálico para moléculas de CTLA4-Ig é de cerca de 5 a cerca de 9, de cerca de 5,5 a cerca de 9,5, de cerca de 6 a cerca de 9, de cerca de 6 a cerca de 10 ou de cerca de 7 a cerca de 10. Em outras modalidades, a proporção molar média de ácido siálico para moléculas de CTLA4-Ig é mais de

ou igual a 5 ou mais de ou igual a 8. Em determinadas modalidades, o ácido siálico é ácido N-acetil neuramínico (NANA).

5 A presente invenção proporciona uma composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig, em que as moléculas de CTLA4-Ig têm uma proporção molar média de ácido N-glicolil neuramínico (NGNA) para moléculas de CTLA4-Ig de menos de ou igual a 2,5, menos de ou igual a 2,0, menos de ou igual a 1,5, menos de ou igual a 1,0 ou menos de ou igual a 0,5.

10 A presente invenção proporciona uma composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig, em que as moléculas de CTLA4-Ig são mais de ou igual a uma área de 93,0 por cento, mais de ou igual a uma área de 93,5 por cento, mais de ou igual a uma área de 94,0 por cento, mais de ou igual a uma área de 94,5 por cento, mais de ou igual a uma área de 95,0 por cento, mais de ou igual a uma área de 95,5 por cento, mais de ou igual a uma área de 96,0 por cento, mais de ou igual a uma área de 96,5 por cento
15 ou mais de ou igual a uma área de 97,0 por cento de dímeros de CTLA4-Ig, conforme determinado através de cromatografia por exclusão de tamanho e detecção espectrofotométrica. Em algumas modalidades, a composição compreende moléculas de CTLA4-Ig, em que as moléculas de CTLA4-Ig são mais de ou igual a uma área de 95,0 por cento dímeros de CTLA4-Ig e menos de ou igual a uma área de 4,0 por cento de espécies de elevado peso molecular, conforme determinado através de cromatografia por exclusão de tamanho e detecção espectrofotométrica. Em algumas modalidades, a composição compreende moléculas de CTLA4-Ig, em que as moléculas de CTLA4-Ig são mais de ou igual a uma área de 95,0 por cento dímeros de CTLA4-Ig e menos de ou igual a uma área de 5,0 por cento de espécies de elevado peso molecular, conforme determinado através de cromatografia por
20 exclusão de tamanho e detecção espectrofotométrica.

25 A presente invenção proporciona uma composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig, em que as moléculas de CTLA4-Ig são de uma área de menos de ou igual a 2,0 por cento, uma área de menos de ou igual a 1,5 por cento, uma área de menos de ou igual a 1,0 por cento ou uma área de menos de ou igual a 0,5 por cento para monômeros de CTLA4-Ig
30

(isto é, cadeia simples), conforme determinado através de cromatografia por exclusão de tamanho e detecção espectrofotométrica.

A presente invenção proporciona uma composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig, em que as moléculas de CTLA4-Ig são uma
5 área de menos de ou igual a 5,0 por cento, uma área de menos de ou igual a 4,5 por cento, uma área de menos de ou igual a 4,0 por cento, uma área de menos de ou igual a 3,5 por cento, uma área de menos de ou igual a 3,0 por cento, uma área de menos de ou igual a 2,5 por cento, uma área de menos de ou igual a 2,0 por cento, uma área de menos de ou igual a 1,5 por cento,
10 uma área de menos de ou igual a 1,0 por cento ou uma área de menos de ou igual a 0,5 por cento de espécies de elevado peso molecular de CTLA4-Ig (por exemplo, tetrâmero), conforme determinado através de cromatografia por exclusão de tamanho e detecção espectrofotométrica. Em algumas modalidades, especialmente aquelas envolvendo composições concentradas
15 compreendendo moléculas de CTLA4-Ig (tais como, por exemplo, aquelas para administração subcutânea), as moléculas de CTLA4-Ig são de uma área de menos de ou igual a 10 por cento, uma área de menos de ou igual a 9 por cento, uma área de menos de ou igual a 8 por cento, uma área de menos de ou igual a 7 por cento, uma área de menos de ou igual a 6 por cento
20 de espécies de elevado peso molecular de CTLA4-Ig, conforme determinado através de cromatografia por exclusão de tamanho e detecção espectrofotométrica.

A presente invenção proporciona uma composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig, em que a composição compreende uma
25 quantidade de MCP-1 ou material semelhante à MCP-1 de menos de ou igual a 50 ppm, menos de ou igual a 40 ppm, menos de ou igual a 38 ppm, menos de ou igual a 30 ppm menos de ou igual a 20 ppm, menos de ou igual a 10 ppm, 5 ppm, menos de ou igual a 4 ppm, menos de ou igual a menos de ou igual a 3 ppm, menos de ou igual a 2 ppm ou menos de ou igual a 1
30 ppm. A presente invenção proporciona uma composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig, em que a composição compreende MCP-1 ou material semelhante à MCP-1 em menos de ou igual a 50 ng/mg de moléculas de

CTLA4-Ig, menos de ou igual a 40 ng/mg de moléculas de CTLA4-Ig, menos de ou igual a 38 ng/mg de moléculas de CTLA4-Ig, menos de ou igual a 30 ng/mg de moléculas de CTLA4-Ig, menos de ou igual a 20 ng/mg de moléculas de CTLA4-Ig, menos de ou igual a 10 ng/mg de moléculas de CTLA4-Ig, menos de ou igual a 5 ng/mg, menos de ou igual a 4 ng/mg de moléculas de CTLA4-Ig, menos de ou igual a 3 ng/mg de moléculas de CTLA4-Ig, menos de ou igual a 2 ng/mg de moléculas de CTLA4-Ig ou menos de ou igual a 1 ng/mg de moléculas de CTLA4-Ig. A presente invenção proporciona uma composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig e uma quantidade de MCP-1 (incluindo a ausência de MCP-1) em que a referida composição é uma composição farmacologicamente aceitável.

A presente invenção proporciona uma composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig, em que as moléculas de CTLA4-Ig têm uma proporção molar média de galactose para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 6 a cerca de 19. Em algumas modalidades, a proporção molar média de ácido siálico para moléculas de CTLA4-Ig é de cerca de X a cerca de Y, onde X é cerca de 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 ou 18 e Y é cerca de 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 ou 19. Em outras modalidades, a proporção molar média de galactose para moléculas de CTLA4-Ig está entre de cerca de X para Y, inclusive de X e Y, onde X é cerca de 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0, 9,5 ou 10,0 e Y é cerca de 12,0, 12,5, 13,0, 13,5, 14,0, 14,5, 15,0, 15,5 ou 16,0. Em outras modalidades, a proporção molar média de galactose para moléculas de CTLA4-Ig está entre de cerca de X a cerca de Y, inclusive de X e Y, em que X é cerca de 6,0, 6,5, 7,0, 7,5 ou 8,0 e Y é cerca de 15,0, 15,5, 16,0, 16,5, 17,0, 17,5, 18,0, 18,5 ou 19,0. Em outras modalidades, a proporção molar média de galactose para moléculas de CTLA4-Ig é de cerca de 7 a cerca de 15, de cerca de 8 a cerca de 14, de cerca de 9 a cerca de 13, de cerca de 10 a cerca de 12. Em outras modalidades, a proporção molar média de galactose para moléculas de CTLA4-Ig é de cerca de 7 a cerca de 18, de cerca de 8 a cerca de 17, de cerca de 9 a cerca de 17, de cerca de 9 a cerca de 16 ou de cerca de 10 a cerca de 15. Em outras modalidades, a proporção molar média de galactose

para moléculas de CTLA4-Ig é mais de ou igual a 8.

A presente invenção proporciona uma composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig, em que as moléculas de CTLA4-Ig têm uma proporção molar média de fucose para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de

5 0,5 a cerca de 12. Em algumas modalidades, a proporção molar média de ácido siálico para moléculas de CTLA4-Ig está entre de cerca de X a cerca de Y, inclusive de X e Y, onde X é cerca de 0,5, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5 ou 4,5 e Y é cerca de 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0, 9,5, 10,0 ou 10,5. Em outras modalidades, a proporção molar média de fucose para moléculas de CTLA4-Ig

10 está entre de cerca de X para Y, inclusive de X e Y, onde X é cerca de 2,9, 3,1, 3,3, 3,5, 3,7, 3,9 ou 4,1 e Y é cerca de 7,9, 8,1, 8,3, 8,5, 8,7, 8,9 ou 9,1. Em outras modalidades, a proporção molar média de fucose para moléculas de CTLA4-Ig está entre de cerca de X para Y, inclusive de X e Y, em que X é cerca de 1,0, 1,5, 1,7, 1,9, 2,1, 2,3 ou 2,5 e Y é cerca de 8,7, 8,9, 9,1, 9,3,

15 9,6, 9,9, 10,1, 10,3 ou 10,5. Em outras modalidades, a proporção molar média de fucose para moléculas de CTLA4-Ig é de cerca de cerca de 3,3 a cerca de 8,5, de cerca de 3,5 a cerca de 8,3, de cerca de 3,7 a cerca de 8,1, de cerca de 3,9 a cerca de 7,9. Em outras modalidades, a proporção molar média de fucose para moléculas de CTLA4-Ig é de cerca de 1,5 a cerca de 9,5,

20 de cerca de 1,7 a cerca de 9,3, de cerca de 1,9 a cerca de 9,1 ou de cerca de 2,1 a cerca de 8,9. Em outras modalidades, a proporção molar média de fucose para moléculas de CTLA4-Ig é mais de ou igual a 1,7.

A presente invenção proporciona uma composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig, em que as moléculas de CTLA4-Ig têm uma

25 proporção molar média de manose para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 5 a cerca de 25. Em algumas modalidades, a proporção molar média de ácido siálico para moléculas de CTLA4-Ig está entre de cerca de X a cerca de Y, inclusive de X e Y, onde X é cerca de 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 ou 21 e Y é cerca de 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16,

30 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 ou 24. Em outras modalidades, a proporção molar média de manose para moléculas de CTLA4-Ig está entre de cerca de X para Y, inclusive de X e Y, onde X é cerca de 6,5, 7,0, 7,5, 7,7, 7,9, 8,1, 8,3,

8,5, 9,0, 9,5, 10,0, 10,5, 11,0, 11,5 ou 12,0 e Y é cerca de 17,0, 17,5, 18,0, 18,5, 19,0, 19,5, 20,0, 20,5, 21,0, 21,5, 22,0, 22,5, 23, 23,5 ou 24,0. Em outras modalidades, a proporção molar média de manose para moléculas de CTLA4-Ig está entre de cerca de X para Y, inclusive de X e Y, onde X é cerca de 8, 8,5, 9,0, 9,5 10,0 ou 11,0 e Y é cerca de 17,0, 17,5, 18,0, 18,5, 19,0, 19,5 ou 20,0. Em outras modalidades, a proporção molar média de manose para moléculas de CTLA4-Ig é de cerca de cerca de 6 a cerca de 23, de cerca de 7 a cerca de 22, de cerca de 7,7 a cerca de 22, de cerca de 8 a cerca de 21, de cerca de 9 a cerca de 20, de cerca de 10 a cerca de 19, de cerca de 11 a cerca de 19 e de cerca de 11 a cerca de 17. Em outras modalidades, a proporção molar média de manose para moléculas de CTLA4-Ig é de cerca de 8 a cerca de 19, de cerca de 9 a cerca de 18, de cerca de 10 a cerca de 17 ou de cerca de 11 a cerca de 16. Em outras modalidades, a proporção molar média de manose para moléculas de CTLA4-Ig é mais de ou igual a 7.

15 A presente invenção proporciona uma composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig, em que as moléculas de CTLA4-Ig são de uma área de menos de ou igual a 5,0 por cento, uma área de menos de ou igual a 4,5 por cento, uma área de menos de ou igual a 4,0 por cento, uma área de menos de ou igual a 3,5 por cento, uma área de menos de ou igual a 3,0 por cento, uma área de menos de ou igual a 2,5 por cento, uma área de menos de ou igual a 2,0 por cento, uma área de menos de ou igual a 1,5 por cento, uma área de menos de ou igual a 1,0 por cento ou uma área de menos de ou igual a 0,5 por cento de espécies oxidadas. A presente invenção proporciona uma composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig, em que as moléculas de CTLA4-Ig são de uma área de menos de ou igual a 5,0 por cento, uma área de menos de ou igual a 4,5 por cento, uma área de menos de ou igual a 4,0 por cento, uma área de menos de ou igual a 3,5 por cento, uma área de menos de ou igual a 3,0 por cento, uma área de menos de ou igual a 2,5 por cento, uma área de menos de ou igual a 2,0 por cento, uma área de menos de ou igual a 1,5 por cento, uma área de menos de ou igual a 1,0 por cento ou uma área de menos de ou igual a 0,5 por cento de espécies deamidadas. Em algumas modalidades, a composição compreen-

20

25

30

de moléculas de CTLA4-Ig, em que as moléculas de CTLA4-Ig são de uma área de menos de ou igual a 3,5 por cento de espécies oxidadas e uma área de menos de ou igual a 2,5 por cento de espécies deamidadas.

5 A presente invenção proporciona uma composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig, em que a composição compreende endotoxina bacterianas LAL em menos de ou igual a 0,7 EU/mg de moléculas de CTLA4-Ig, menos de ou igual a 0,6 EU/mg de moléculas de CTLA4-Ig, menos de ou igual a 0,5 EU/mg de moléculas de CTLA4-Ig, menos de ou igual a 0,42 EU/mg de moléculas de CTLA4-Ig, menos de ou igual a 0,4 EU/mg de
10 moléculas de CTLA4-Ig, menos de ou igual a 0,35 EU/mg de moléculas de CTLA4-Ig, menos de ou igual a 0,3 EU/mg de moléculas de CTLA4-Ig, menos de ou igual a 0,25 EU/mg de moléculas de CTLA4-Ig, menos de ou igual a 0,20 EU/mg de moléculas de CTLA4-Ig, menos de ou igual a 0,15 EU/mg de moléculas de CTLA4-Ig ou menos de ou igual a 0,05 EU/mg de moléculas
15 de CTLA4-Ig.

A presente invenção proporciona uma composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig, em que a composição compreende uma biocarga em menos de ou igual a 2 CFU/10 mL, menos de ou igual a 1,5 CFU/10 mL, menos de ou igual a 1 CFU/10 mL ou menos de ou igual a 0,5
20 CFU/10 mL.

A presente invenção proporciona uma composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig, em que a composição compreende DNA em menos de ou igual a 25 pg/mg de moléculas de CTLA4-Ig, menos de ou igual a 20 pg/mg de moléculas de CTLA4-Ig, menos de ou igual a 15 pg/mg
25 de moléculas de CTLA4-Ig, menos de ou igual a 10 pg/mg de moléculas de CTLA4-Ig, menos de ou igual a 5,0 pg/mg de moléculas de CTLA4-Ig, menos de ou igual a 4,0 pg/mg de moléculas de CTLA4-Ig, menos de ou igual a 3,5 pg/mg de moléculas de CTLA4-Ig, menos de ou igual a 3,0 pg/mg de moléculas de CTLA4-Ig, menos de ou igual a 2,5 pg/mg de moléculas de CTLA4-Ig, menos de ou igual a 1,5 pg/mg de moléculas de CTLA4-Ig, menos de ou
30 igual a 1,0 pg/mg de moléculas de CTLA4-Ig ou menos de ou igual a 0,5 pg/mg de moléculas de CTLA4-Ig ou menos de ou igual a 0,20 pg/ml molé-

culas de CTLA4-Ig.

A presente invenção proporciona uma composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig, em que a composição compreende proteína celular (por exemplo, proteína CHO ou CHOP) em menos de ou igual a 200
5 ng/mg de moléculas de CTLA4-Ig, menos de ou igual a 150 ng/mg de moléculas de CTLA4-Ig, menos de ou igual a 125 ng/mg de moléculas de CTLA4-Ig, menos de ou igual a 100 ng/mg de moléculas de CTLA4-Ig, menos de ou igual a 90 ng/mg de moléculas de CTLA4-Ig, menos de ou igual a 80 ng/mg de moléculas de CTLA4-Ig, 70 ng/mg de moléculas de CTLA4-Ig, menos de
10 ou igual a 60 ng/mg de moléculas de CTLA4-Ig, menos de ou igual a 50 ng/mg de moléculas de CTLA4-Ig, menos de ou igual a 40 ng/mg de moléculas de CTLA4-Ig, menos de ou igual a 30 ng/mg de moléculas de CTLA4-Ig, menos de ou igual a 25 ng/mg de moléculas de CTLA4-Ig, menos de ou igual a 20 ng/mg de moléculas de CTLA4-Ig, menos de ou igual a 15 ng/mg
15 de moléculas de CTLA4-Ig, menos de ou igual a 10 ng/mg de moléculas de CTLA4-Ig ou menos de ou igual a 5 ng/mg de moléculas de CTLA4-Ig. A presente invenção proporciona uma composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig, em que a composição compreende proteína celular em menos de ou igual a 200 ppm, menos de ou igual a 150 ppm, menos de ou igual a
20 125 ppm, menos de ou igual a 100 ppm, menos de ou igual a 90 ppm, menos de ou igual a 80 ppm, 70 ppm, menos de ou igual a 60 ppm, menos de ou igual a 50 ppm, menos de ou igual a 40 ppm, menos de ou igual a 30 ppm, menos de ou igual a 25 ppm, menos de ou igual a 20 ppm, menos de ou igual a 15 ppm, menos de ou igual a 10 ppm ou menos de ou igual a 5
25 ppm.

A presente invenção proporciona uma composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig, em que a composição compreende Triton-X (por exemplo, Triton X-100) em menos de ou igual a 4,0 ng/mg de moléculas de CTLA4-Ig, menos de ou igual a 3,5 ng/mg de moléculas de CTLA4-Ig,
30 menos de ou igual a 3,0 ng/mg de moléculas de CTLA4-Ig, menos de ou igual a 2,5 ng/mg de moléculas de CTLA4-Ig, menos de ou igual a 2,0 ng/mg de moléculas de CTLA4-Ig, menos de ou igual a 1,5 ng/mg de moléculas de

CTLA4-Ig, menos de ou igual a 1,0 ng/mg de moléculas de CTLA4-Ig ou menos de ou igual a 0,5 ng/mg de moléculas de CTLA4-Ig. A presente invenção proporciona uma composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig, em que a composição compreende Triton-X em menos de ou igual a 4,0 ppm, menos de ou igual a 3,5 ppm, menos de ou igual a 3,0 ppm, menos de ou igual a 2,5 ppm, menos de ou igual a 2,0 ppm, menos de ou igual a 1,5 ppm, menos de ou igual a 1,0 ppm ou menos de ou igual a 0,5 ppm.

A presente invenção proporciona uma composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig, em que a composição compreende Proteína A em menos de ou igual a 8,0 ng/mg de moléculas de CTLA4-Ig, menos de ou igual a 7,5 ng/mg de moléculas de CTLA4-Ig, menos de ou igual a 7,0 ng/mg de moléculas de CTLA4-Ig, menos de ou igual a 6,5 ng/mg de moléculas de CTLA4-Ig, menos de ou igual a 6,0 ng/mg de moléculas de CTLA4-Ig, menos de ou igual a 5,5 ng/mg de moléculas de CTLA4-Ig, menos de ou igual a 5,0 ng/mg de moléculas de CTLA4-Ig, menos de ou igual a 4,5 ng/mg de moléculas de CTLA4-Ig, menos de ou igual a 4,0 ng/mg de moléculas de CTLA4-Ig, menos de ou igual a 3,5 ng/mg de moléculas de CTLA4-Ig, menos de ou igual a 3,0 ng/mg de moléculas de CTLA4-Ig, menos de ou igual a 2,5 ng/mg de moléculas de CTLA4-Ig, menos de ou igual a 2,0 ng/mg de moléculas de CTLA4-Ig, menos de ou igual a 1,5 ng/mg de moléculas de CTLA4-Ig, menos de ou igual a 1,0 ng/mg de moléculas de CTLA4-Ig ou menos de ou igual a 0,5 ng/mg de moléculas de CTLA4-Ig. A presente invenção proporciona uma composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig, em que a composição compreende Proteína A em menos de ou igual a 8,0 ppm, menos de ou igual a 7,5 ppm, menos de ou igual a 7,0 ppm, menos de ou igual a 6,5 ppm, menos de ou igual a 6,0 ppm, menos de ou igual a 5,5 ppm, menos de ou igual a 5,0 ppm, menos de ou igual a 4,5 ppm, menos de ou igual a 4,0 ppm, menos de ou igual a 3,5 ppm, menos de ou igual a 3,0 ppm, menos de ou igual a 2,5 ppm, menos de ou igual a 2,0 ppm, menos de ou igual a 1,5 ppm, menos de ou igual a 1,0 ppm ou menos de ou igual a 0,5 ppm.

A presente invenção proporciona uma composição compreen-

dendo moléculas de CTLA4-Ig, em que as moléculas de CTLA4-Ig têm uma proporção molar média de GlcNAc para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 10 a cerca de 40. Em algumas modalidades, a proporção molar média de GlcNAc para moléculas de CTLA4-Ig está entre de cerca de X a cerca de Y, inclusive de X e Y, onde X é qualquer número inteiro entre 10 e 39 e Y é qualquer número inteiro entre 11 e 40. Em outras modalidades, a proporção molar média de GlcNAc para moléculas de CTLA4-Ig está entre de cerca de X para Y, inclusive de X e Y, onde X é cerca de 12, 14, 14, 15, 16 ou 17 e Y é cerca de 32, 33, 34, 35, 36 ou 37. Em outras modalidades, a proporção molar média de GlcNAc para moléculas de CTLA4-Ig é de cerca de 12 a cerca de 35, de cerca de 13 a cerca de 35, de cerca de 14 a cerca de 35, de cerca de 15 a cerca de 35.

A presente invenção proporciona uma composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig, em que as moléculas de CTLA4-Ig têm uma proporção molar média de GalNAc para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 0,5 a cerca de 7,0. Em algumas modalidades, a proporção molar média de GalNAc para moléculas de CTLA4-Ig está entre de cerca de X a cerca de Y, inclusive de X e Y, onde X é 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 ou 2,0 e Y é 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, 5,0, 6,0, 7,0 ou 8,0. Em outras modalidades, a proporção molar média de GalNAc para moléculas de CTLA4-Ig está entre de cerca de X para Y, inclusive de X e Y, onde X é cerca de 0,6, 0,7, 0,8, 0,9 ou 1,0 e Y é cerca de 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4,0, 4,1 ou 4,2. Em outras modalidades, a proporção molar média de GalNAc para moléculas de CTLA4-Ig é de cerca de 0,7 a cerca de 4,1, de cerca de 0,8 a cerca de 4,0, de cerca de 0,9 a cerca de 3,9 ou cerca de 1,0 a cerca de 3,8 ou cerca de 1,1 a cerca de 3,7. Em outras modalidades, a proporção molar média de GalNAc para moléculas de CTLA4-Ig é de cerca de 1,6 a cerca de 3,7, de cerca de 1,7 a cerca de 3,6, de cerca de 1,8 a cerca de 3,5 ou cerca de 1,9 a cerca de 3,4.

A invenção proporciona uma composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig, em que a composição de CTLA4-Ig exibe bandas em

faixas de pI conforme determinado sobre um gel de focalização isoeletrica (IEF gel) como segue : de cerca de 10 a cerca de 22 bandas na faixa de pI de cerca de 4,3 a cerca de 5,6; intensidade de banda cumulativa de cerca de 90% a cerca de 110% em uma faixa de pI de cerca de 4,3 a cerca de 5,3 e

5 cerca de 3m, bandas principais em uma faixa de pI de cerca de 4,5 a cerca de 5,2. Em uma modalidade, as bandas na faixa de cerca de 4,3 a cerca de 5,6 são de cerca de 5 a cerca de 30, de cerca de 6 a cerca de 29, de cerca de 7 a cerca de 28, de cerca de 8 a cerca de 27, de cerca de 9 a cerca de 26, de cerca de 10 a cerca de 25, de cerca de 11 a cerca de 24, de cerca de

10 12 a cerca de 23, de cerca de 13 a cerca de 22, de cerca de 14 a cerca de 21, de cerca de 15 a cerca de 20, de cerca de 16 a cerca de 19, de cerca de 17 a cerca de 20, de cerca de 18 a cerca de 19.

Moléculas de CTLA4-Ig e CTLA4^{A29YL104E}-Ig Glicosiladas e Populações das Mesmas

15 Sem limitação, glicosilação pode se referir à adição de estruturas de oligossacarídeo complexas a uma proteína em sítios específicos dentro da cadeia polipeptídica. Glicosilação de proteínas e o subsequente processamento de carboidratos adicionados pode afetar a duplicação e estrutura de proteína, estabilidade de proteína, incluindo meia-vida da proteína e propriedades funcionais de uma proteína. A glicosilação de proteína pode ser

20 dividida em duas classes em virtude do contexto de seqüência onde a modificação ocorre, glicosilação O-ligada e glicosilação N-ligada. Polissacarídeos O-ligados são ligados a um grupo hidroxila, usualmente ao grupo hidroxila de um resíduo de serina ou treonina. O-glicanas não são adicionadas a cada

25 resíduo de serina e treonina. Oligossacarídeos O-ligados são usualmente mono ou bi-antênários, isto é, eles compreendem uma ou no máximo duas ramificações (antenas) e compreendem de um a quatro tipos diferentes de resíduos de açúcar, os quais são adicionados um a um.

Polissacarídeos N-ligados são presos ao nitrogênio da amida de

30 uma asparagina. Apenas asparaginas que são parte de uma de duas seqüências tripeptídicas, quer asparagina-X-serina ou asparagina-X-treonina (onde X é qualquer aminoácido, exceto prolina), são alvos para glicosilação.

Oligossacarídeos N-ligados pode ter de uma a quatro ramificações referidas como mono-, bi-, tri- e tetra-antênárias. As estruturas de resíduos de açúcar encontrados em oligossacarídeos N- e O-ligados são diferentes. A despeito dessa diferença, o resíduo terminal sobre cada ramificação de polissacarídeos N- e O-ligados podem ser modificados através de uma molécula de ácido siálico, uma modificação referida como revestimento de ácido siálico. O ácido siálico é um nome comum para uma família de monossacarídeos com nove carbonos únicos, os quais podem ser ligados a outros oligossacarídeos. Dois membros na família são ácido N-acetil neuramínico, abreviado como Neu5Ac ou NANA e ácido N-glicolil neuramínico, abreviado como Neu5Gc ou NGNA.

A forma mais comum de ácido siálico em seres humanos é NANA. Ácido N-acetil neuramínico (NANA) é a espécie de ácido siálico primária presente em moléculas de CTLA4-Ig. Contudo, deve ser notado que níveis mínimos, mas detectáveis, de ácido N-glicolil neuramínico (NGNA) também estão presentes em moléculas de CTLA4-Ig. Além disso, o método descrito aqui pode ser usado para determinar o número de moles de ácido siálico para NANA e NGNA e, portanto, os níveis de NANA e NGNA são determinados e reportados para moléculas de CTLA4-Ig. Oligossacarídeos N- e O-ligados têm diferentes números de ramificações, as quais proporcionam diferentes números de posições às quais moléculas de ácido siálico podem ser presas. Oligossacarídeos N-ligados podem proporcionar até quatro posições de fixação para ácidos siálicos, enquanto que oligossacarídeos O-ligados podem proporcionar dois sítios para fixação de ácido siálico.

Proteínas glicosiladas (glicoproteínas), muitas das quais foram produzidas através de métodos de tecnologia de DNA recombinante, são de grande interesse como agentes diagnósticos e terapêuticos. Muitas proteínas transmembrana eucariotas destinadas a uma superfície celular e proteínas secretadas são pós-traducionalmente modificadas para incorporar grupos carboidrato N-ligado e O-ligado. Oligossacarídeos N-ligados são presos a resíduos de asparagina quando eles são parte do motivo peptídico Asn-X-Ser/Thr, onde X pode ser qualquer aminoácido, exceto prolina. Oligossacari-

deos O-ligados são presos a resíduos de serina ou treonina. As estruturas de oligossacarídeos N-ligados e O-ligados, bem como os resíduos de açúcar encontrados em cada um podem ser diferentes. Um tipo de açúcar que é comumente encontrado em ambos é ácido N-acetil neuramínico (NANA; aqui 5 depois referido como ácido siálico). Usualmente, ácido siálico é o resíduo terminal de oligossacarídeos N-ligados e O-ligados. A glicoproteína, em virtude de sua carga negativa, pode exibir propriedades ácidas.

Supõe-se que proteínas glicosiladas são exercem papéis em duplicação aumentada de proteína, regulação de seleção e tráfego celular, 10 prevenção de agregação de proteína, mediação de adesão célula-célula e aumento de resistência à proteólise. Em organismos eucariotas, a natureza e extensão de glicosilação pode ter a impacto profundo sobre a meia-vida em circulação e bioatividade de produtos terapêuticos de glicoproteína através de processos os quais envolvem endocitose e *clearance* receptor- 15 mediada. Acredita-se que sistemas receptor-mediados exerçam um papel principal na eliminação de glicoproteínas no soro através de reconhecimento de vários componentes de anticorpo do oligossacarídeo. O grupo ácido siálico terminal de uma glicoproteína pode afetar a absorção, meia-vida e *clearance* no soro. Assim, estratégias de produção de glicoproteína, as quais 20 mantêm o componente ácido siálico terminal da proteína glicosilada, podem aumentar a biodisponibilidade e meia-vida no soro de uma proteína. Vários parâmetros de processo de produção foram investigados referentes à síntese de glicoproteína, especialmente o efeito da composição do meio e desvios de temperatura em várias estratégias de produção.

25 Dímeros de CTLA4-Ig composta de monômeros tendo a sequência de aminoácido de resíduos (i) 26-383 de SEQ ID NO: 2, (ii) 26-382 de SEQ ID NO: 2, (iii) 27-383 de SEQ ID NO: 2, (iv) 27-382 de SEQ ID NO: 2, (v) 25-382 de SEQ ID NO: 2 ou (vi) 25-383 de SEQ ID NO: 2 podem ter um MW teórico previsto de cerca de 78.000 a cerca de 79.000 Dáltons. Contudo, o MW para tais dímeros obtidos através de MALDI-TOF é de aproxima- 30 damente 91.000 Dáltons. Essa diferença no MW de aproximadamente 13.000-14.000 Dáltons é em virtude, pelo menos em parte, de glicosilação a

qual, em uma modalidade, responde por aproximadamente 15% da massa desse monômero de molécula de CTLA4-Ig em particular. Os monômeros especificados acima têm três sítios de glicosilação N-ligada que foram confirmados, através de mapeamento peptídico, como ocorrendo em asparaginas nos resíduos 102, 134 e 233 de SEQ ID NO: 2. Moléculas de carboidrato que são ligadas através de asparagina pode ser clivadas seletivamente usando a enzima Glicosidase F de Peptídeo-N (PNGase F). Em um caso, tratamento do monômero tendo a seqüência 27-383 de SEQ ID NO: 2 com PNGase F resultou em uma espécie com um MW de aproximadamente 80.200 Dáltons e, em virtude do fato de o MW teórico desse monômero ser cerca de 80.200, o tratamento sugeriu que os 1.400 Dáltons não contados ($80.200 - 78.800 = 1.400$) podem ser em virtude de glicosilação O-ligada. Embora existam números resíduos de serina e treonina que têm o potencial de ser sítios de glicosilação, apenas dois sítios O-ligados foram identificados: Ser¹⁵⁵ e Ser¹⁶⁵ de SEQ ID NO: 2. Em uma modalidade, a glicana predominante presa nesses dois sítios é HexNAc-Hex-NeuAc.

Por exemplo, a FIG. 9 apresenta uma visão geral das estruturas de carboidrato N-ligadas e O-ligadas sobre moléculas de CTLA4-Ig compreendidas de monômeros tendo uma seqüência de SEQ ID NO: 2 (isto é, um monômero tendo uma das seguintes seqüências: (i) 26-383 de SEQ ID NO: 2, (ii) 26-382 de SEQ ID NO: 2, (iii) 27-383 de SEQ ID NO: 2, (iv) 27-382 de SEQ ID NO: 2), (v) 25-382 de SEQ ID NO: 2 ou (vi) 25-383 de SEQ ID NO: 2 em que, em uma modalidade, tais moléculas com as características de carboidrato mostradas são produzidas através de uma linhagem de célula da invenção ou prole da mesma de acordo com o método de produção descrito nos Exemplos 14-15 e também mostrada na FIG. 10. As principais estruturas listadas para cada sítio são baseadas em técnicas ortogonais (veja aqui). Para cada estrutura, é estimado um percentual dessa estrutura observada durante esses experimentos. Esses percentuais representam as melhores estimativas a partir de técnicas ortogonais.

Dímeros de CTLA4^{A29YL104E}-Ig compostos de monômeros tendo a seqüência de aminoácido de resíduos (i) 26-383 de SEQ ID NO: 4, (ii) 26-

382 de SEQ ID NO: 4, (iii) 27-383 de SEQ ID NO: 4, (iv) 27-382 de SEQ ID NO: 4, (v) 25-382 de SEQ ID NO: 4 ou (vi) 25-383 de SEQ ID NO: 4 podem ter um MW teórico previsto de cerca de 78,000 a cerca de 79.000 Dáltons. Contudo, o MW para tais dímeros obtidos através de MALDI-TOF é de aproximadamente 91.500 Dáltons. Essa diferença no MW de aproximadamente 12.000-13.000 Dáltons é em virtude, pelo menos em parte, de glicosilação. Os monômeros especificados acima têm três sítios de glicosilação N-ligada que foram confirmados através de mapeamento por peptídeo como ocorrendo nas asparaginas nos resíduos 102, 134 e 233 de SEQ ID NO: 4 (N76, N108 e N207 da FIG. 4). Moléculas de carboidrato que são ligadas através de asparagina podem ser clivadas seletivamente usando a enzima Glicosidase F de Peptídeo-N (PNGase F). Embora existam números resíduos de serina e treonina que têm o potencial de ser sítios de glicosilação, apenas três sítios O-ligados foram identificados: Ser149, Ser155 e Ser165 de SEQ ID NO: 4 (veja Tabela 25 no EXEMPLO 22). Em uma modalidade, a glicana predominante presa a esses sítios é HexNAc-Hex-NeuAc.

Em determinadas modalidades, moléculas de CTLA4-Ig ou CTLA4^{A29YL104E}-Ig são glicoproteínas que podem ser produzidas através dos métodos de cultura da invenção. Em uma modalidade, glicoproteínas de CTLA4-Ig são modificadas com oligossacarídeos que representam aproximadamente 15% (peso/peso) da molécula. Esses oligossacarídeos podem exercer um papel importante nos parâmetros farmacocinéticos (PK) de uma glicoproteína de CTLA4-Ig ou CTLA4^{A29YL104E}-Ig. Além disso, diferentes perfis de oligossacarídeo podem influenciar a estabilidade e degradação de proteínas. Por exemplo, oligossacarídeos O-ligados podem intensificar a estabilidade de moléculas de CTLA4^{A29YL104E}-Ig impedindo a auto-lise na região de dobradiça da região constante de imunoglobulina.

A distribuição de oligossacarídeo sobre uma população de moléculas de CTLA4-Ig ou CTLA4^{A29YL104E}-Ig pode ser de natureza heterogênea em virtude da complexidade da cultura de célula e processos. A heterogeneidade pode estar presente em virtude de sítios de glicosilação sendo completamente ocupados e não ocupados e do fato de que qualquer sítio espe-

cífico pode ser habitado com muitas estruturas de oligossacarídeo diferentes, as quais podem ainda mostrar variação no padrão de modificação de ácido siálico.

Em uma modalidade, a porção ácido siálico primária sobre moléculas de CTLA4-Ig ou CTLA4^{A29YL104E}-Ig é ácido N-acetil neuramínico (NeuAc, NANA) e a porção ácido siálico secundária é ácido N-glicolil neuramínico (NGNA). A natureza carregada do ácido siálico e as estruturas complexas contendo ácido siálico podem resultar em múltiplas isoformas de CTLA4-Ig ou CTLA4^{A29YL104E}-Ig, respectivamente, onde tais isoformas podem ser evidentes em um perfil de focalização isoelétrica (IEF). Por exemplo, veja FIG. 11 e Exemplo 3 para perfil de IEF de CTLA4-Ig. Adicionalmente, veja FIG. 12 e EXEMPLO 22 para perfil de IEF de CTLA4^{A29YL104E}-Ig.

Em uma modalidade, a invenção proporciona uma população de moléculas de CTLA4-Ig que têm uma isoforma de CTLA4-Ig dominante tendo um ponto isoelétrico (pI) que é menos de ou igual a 5,1 ou 5,0, o qual pode ser determinado, por exemplo, através de IEF. Em outra modalidade, é proporcionada uma população de moléculas de CTLA4^{A29YL104E}-Ig que tem isoformas de CTLA4^{A29YL104E}-Ig dominantes tendo um ponto isoelétrico (pI) que é menos de ou igual a 5,5, o qual pode ser determinado, por exemplo, através de IEF (FIG. 12).

Em uma modalidade, a invenção proporciona uma população de moléculas de CTLA4-Ig que têm um pI de cerca de 4,2 a cerca de 5,7, de cerca de 4,25 a cerca de 5,5, de cerca de 4,3 a cerca de 5,3 ou de cerca de 4,5 a cerca de 5,2. Em outra modalidade, a invenção proporciona uma população de moléculas de CTLA4-Ig que têm um pI de cerca de 4,45 a cerca de 5,30. Em uma outra modalidade, a invenção proporciona uma população de moléculas de CTLA4-Ig que têm um pI de cerca de 4,3 a cerca de 5,1. Em uma modalidade em particular, a invenção proporciona uma população de moléculas de CTLA4-Ig que têm um pI de cerca de 4,45 a cerca de 5,0. Em uma modalidade, a invenção proporciona uma população de moléculas de CTLA4-Ig onde pelo menos 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% ou 95% das moléculas na população exibem um ponto isoelétrico de menos de ou igual a

cerca de 5,7, 5,6, 5,5, 5,4, 5,3, 5,2, 5,1, 5,0, 4,9, 4,8, 4,7, 4,6, 4,5, 4,4, 4,3, 4,2, 4,1, 4,0, 3,9, 3,8, 3,7, 3,6, 3,5, 3,4, 3,3, 3,2, 3,1, 3,0, 2,9, 2,8, 2,7, 2,6, 2,5, 2,4, 2,3, 2,2, 2,1 ou 2,1 conforme determinado através de IEF (esses valores podem ter um desvio padrão de $\pm 0,2$). Em uma modalidade, a invenção proporciona um método para preparo de uma população de moléculas de CTLA4-Ig tendo um pI de cerca de 4,45 a cerca de 5,30 ou de cerca de 4,45 a cerca de 5,1 ou de cerca de 4,45 a cerca de 5,0, em que o método envolve sujeição de uma população de moléculas de CTLA4-Ig à eletroforese em gel de IEF, em que uma única banda sobre o gel representa a sub-população de moléculas de CTLA4-Ig tendo um pI em particular e isolamento da sub-população de moléculas de CTLA4-Ig tendo o pI em particular através de excisão da banda do gel e subsequente purificação das proteínas da banda de gel excisada.

Em outras modalidades, a invenção proporciona uma população de moléculas de CTLA4^{A29YL104E}-Ig que têm um pI de cerca de 4,5 a cerca de 5,2. Em outras modalidades, a invenção proporciona uma população de moléculas de CTLA4^{A29YL104E}-Ig que têm um pI de cerca de 4,7 a cerca de 5,1. Em outra modalidade, a invenção proporciona uma população de moléculas de CTLA4^{A29YL104E}-Ig que têm um pI de cerca de 2,0 a cerca de 5,2. Em uma modalidade, a invenção proporciona uma população de moléculas de CTLA4^{A29YL104E}-Ig onde pelo menos 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% ou 95% das moléculas na população exibem um ponto isoelétrico de menos de ou igual a cerca de 5,5, 5,4, 5,3, 5,2, 5,1, 5,0, 4,9, 4,8, 4,7, 4,6, 4,5, 4,4, 4,3, 4,2, 4,1, 4,0, 3,9, 3,8, 3,7, 3,6, 3,5, 3,4, 3,3, 3,2, 3,1 ou 3,0 conforme determinado através de IEF (esses valores podem ter um desvio padrão de $\pm 0,2$). Em uma modalidade, a invenção proporciona um método para preparo de uma população de moléculas de CTLA4^{A29YL104E}-Ig tendo um pI de cerca de 4,5 a cerca de 5,2; de cerca de 4,7 a cerca de 5,1; de cerca de 2,0 a cerca de 5,2, em que o método envolve sujeição de uma população de moléculas de CTLA4^{A29YL104E}-Ig à eletroforese em gel de IEF, em que uma única banda sobre o gel representa uma sub-população de moléculas de CTLA4^{A29YL104E}-Ig tendo um pI em particular e isolamento da sub-população

de moléculas de CTLA4^{A29YL104E}-Ig tendo o pl em particular através de excisão da banda do gel e subsequente purificação das proteínas da banda de gel excisada.

Em determinadas modalidades, a invenção proporciona uma população de moléculas de CTLA4-Ig tendo uma proporção molar média de moles grupos ácido siálico para moles de moléculas de CTLA4-Ig de: cerca de 6 a cerca de 32, cerca de 8 a cerca de 32, cerca de 11 a cerca de 30, cerca de 12 a cerca de 20, cerca de 13 a cerca de 19, cerca de 14 a cerca de 18, cerca de 15 a cerca de 17, cerca de 6 a cerca de 16, cerca de 8 a
10 cerca de 16, cerca de 8 a cerca de 14, cerca de 8 a cerca de 12.

Em algumas modalidades, um máximo permissível de proteína de célula hospedeira CHO de \square 25 ppm a \square 10 ng/mg caracteriza a composição de moléculas de CTLA4-Ig. Em outra modalidade, a composição de moléculas de CTLA4-Ig é caracterizada por DNA de célula hospedeira em
15 um nível de \square 2,5 pg/mg a \square 1,0 pg/mg. Em outra modalidade, a composição de moléculas de CTLA4-Ig é caracterizada por Triton X-100 em um nível de \square 1,0 ng/mg ou \square 1,0 ppm. A concentração de Triton X-100 pode ser determinada através de extração do Triton X-100 usando extração em fase sólida sobre Waters OASIS-HLB, seguido por lavagem com água para remover a
20 proteína residual. O Triton X-100 ligado é removido através de eluição com acetonitrilo. O eluato de acetonitrilo é analisado através de cromatografia de fase reversa usando uma coluna SAS Hypersil de 5 μ m e uma fase móvel consistindo de acetonitrilo: água (80: 20). Detecção é através de absorbância de UV a 225 nm. Em uma modalidade, a composição de moléculas de
25 CTLA4-Ig é caracterizada por \leq uma área de oxidação 2,5% e \leq uma área de deamidação 2,0%. Em outra modalidade, a composição de moléculas de CTLA4-Ig é caracterizada por \leq uma área de oxidação 3,0% e \leq uma área de deamidação 2,5%. O método de mapeamento com peptídeo triptico foi usado para quantificação de oxidação e deamidação. Os dados de oxidação
30 percentual foram determinados através do uso de um ensaio de mapeamento triptico por RP-HPLC que quantifica a área de oxidação percentual de Met85 na proteína de CTLA4-Ig em sulfóxido de metionina. A oxidação per-

centual no método é obtida através de medição por UV das áreas de pico no mapeamento tríptico por RP-HPLC para o peptídeo tríptico T6, compreendido dos resíduos 84-93 contendo Met85 e o peptídeo tríptico oxidado correspondente T6ox, contendo Met(O)85. A área de oxidação percentual de Met85 em Met(O)85 é proporcional à área percentual do pico de T6ox: Oxidação percentual = $100 * AT6ox / (AT6ox + AT6)$, onde, AT6 = área de pico para peptídeo tríptico T6, (84-93). AT6ox = área de pico para peptídeo tríptico T6ox, Met(O)85(84-93). Os dados de deamidação percentual, adquiridos através de uso de um ensaio de mapeamento tríptico por RP-HPLC que quantifica a área de oxidação e deamidação percentual, é obtida através de medição por UV das áreas de pico no mapeamento tríptico por RP-HPLC para o peptídeo tríptico T26, compreendido dos resíduos 281-302 contendo Asn294 e o peptídeo tríptico deamidado correspondente T26deam1, contendo isoAsp294. A área percentual de deamidação de Asn294 em isoAsp294, então, é proporcional à área percentual do pico de T26deam1: onde, AT26 = área de pico para T26, (281-302), AT26deam1 = área de pico para T26deam1, isoAsp294(281-302). AT26deam2 = área de pico para T26deam2, Asp299(281-302). AT26deam3 = área de pico para T26deam3, Asp294(281-302). AT26deam4 = área de pico para T26deam4, Asu294(281-302).

Em outra modalidade, a composição de moléculas de CTLA4-Ig é caracterizada por N-Acetil glicosamina (GlcNAc) de 15 a 35 Moles: Mol de proteína de CTLA4-Ig ou N-Acetil galactosamina (GalNAc) de 1,7 a 3,6 Moles: Mol de proteína de CTLA4-Ig. Os amino monossacarídeos são quantificados através de eletroforese capilar (CE) após liberação da proteína através de hidrólise ácida. Os amino monossacarídeos liberados são reacetilados e fluorescentemente rotulados com ácido aminopireno tri-sulfônico (APTS) para facilitar sua detecção e quantificação. N-Acetil manosamina é adicionada à amostra e padrões de amino monossacarídeo para servir como um padrão interno. As áreas de pico dos amino monossacarídeos nas amostras são normalizados usando o padrão interno e quantificados através de comparação com sua respectiva área de pico de amino monossacarídeos

normalizada no padrão. A proporção molar de cada monossacarídeo com relação à molécula de CTLA4-Ig é então, calculada.

Em uma modalidade, a composição de moléculas de CTLA4-Ig é caracterizada pelas seguintes especificações de perfil de oligossacarídeo N-

5 ligado:

Especificações de perfil de Oligossacarídeo N-ligado

	diferença % Domínio I	diferença % Domínio II	diferença % Domínio III
diferença %	19-31	7 – 19	-6 – -18
Desvio padrão (diferença % da especificação acima)	□ 29	□ 27	□ 25

Em uma modalidade, a composição de moléculas de CTLA4-Ig é caracterizada por monossacarídeos neutros onde a composição tem proporções de cerca de:

10

Galactose: 8,0 a 17 Moles: Mol de proteína de CTLA4-Ig

Fucose: 3,5 a 8,3 Moles: Mol de proteína de CTLA4-Ig

Manose: 7,7 a 22 Moles: Mol de proteína de CTLA4-Ig ou

Galactose: 9,0 a 17 Moles: Mol de proteína de CTLA4-Ig

Manose: 11 a 19 Moles: Mol de proteína de CTLA4-Ig.

Composição ilustrativa de Monossacarídeo neutro: Moles: Mol de Proteína de Galactose, Fucose e Manose

Monossacarídeo neutro	Processo W (n=34)		Processo CD-CHO1 (n=109)	
	Média (SD)	Min, Max	Média (SD)	Min, Max
Galactose	13,9 (1,1)	12,0, 16,0	12,6 (1,0)	10,0, 16,0
Fucose	5,8 (1,0)	4,2, 7,7	5,6 (0,7)	4,5, 7,6
Manose	15,3 (1,0)	13,0, 17,0	15,4 (1,0)	13,0, 18,0
Ácido siálico ilustrativo (NANA: Mol de Proteína)				
Ácido siálico	Processo W (n=34)		Processo CD-CHO1 (n=109)	
	Média (SD)	Min, Max	Média (SD)	Min, Max
NANA	10,2 (0,6)	9,3, 11,6	9,7 (0,6)	8,2, 11,5

15

Em outra modalidade, a faixa de proporção molar de monossacarídeo para uma composição de CTLA4^{A29YL104E}-Ig é como segue : manose de cerca de 10 – 20 moles/mol de proteína; fucose de cerca de 4,2 -7,0 moles/mol de proteína; e galactose de cerca de 9,2 –17 moles/mol de proteína.

Em outra modalidade, a composição de CTLA4^{A29YL104E}-Ig é caracterizada por uma proporção molar de NANA de cerca de 5,0 – 10,0 mole de NANA/mol de proteína. Em outra modalidade, a composição de CTLA4^{A29YL104E}-Ig é caracterizada por uma proporção molar de NGNA de < 1,5 mole NGNA/mol de proteína. Em algumas modalidades, o desvio % da proporção molar para ácido siálico é □ 15% ou □ 20% ou □ 30%.

Em uma modalidade, uma população de moléculas de CTLA4-Ig pode compreender monômeros de CTLA4-Ig que cada um tem pelo menos 3 grupos ácido siálico. Em outra modalidade, uma população de moléculas de CTLA4-Ig compreende monômeros de CTLA4-Ig que cada um tem de 3 a 8 grupos ácido siálico.

Em uma modalidade, a invenção proporciona uma população de moléculas de CTLA4-Ig onde pelo menos 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% ou 95% das moléculas na população exibem um ponto isoelétrico de menos de ou igual a cerca de 5,7, 5,6, 5,5, 5,4, 5,3, 5,2, 5,1, 5,0, 4,9, 4,8, 4,7, 4,6, 4,5, 4,4, 4,3, 4,2, 4,1, 4,0, 3,9, 3,8, 3,7, 3,6, 3,5, 3,4, 3,3, 3,2, 3,1 ou 3,0.

Em algumas modalidades, a invenção proporciona uma população de moléculas de CTLA4-Ig tendo uma proporção molar média de moles NANA para moles de moléculas de CTLA4-Ig ou dímero de: cerca de 6 a cerca de 16, cerca de 6 a cerca de 14, cerca de 6 a cerca de 12, cerca de 8 a cerca de 12, cerca de 8 a cerca de 14, cerca de 8 a cerca de 16.

Em outras modalidades, a invenção proporciona uma população de moléculas de CTLA4-Ig tendo uma proporção molar média de moles NGNA para moles de moléculas de CTLA4-Ig ou dímero de menos de ou igual a cerca de 2, 1,8, 1,6, 1,5, 1,4, 1,0, 0,8 ou 0,5.

Em modalidades particulares, a invenção proporciona uma população de moléculas de CTLA4^{A29YL104E}-Ig tendo uma proporção molar média de moles de grupos ácido siálico para moles de moléculas ou dímeros de CTLA4^{A29YL104E}-Ig de cerca de 5,5 a cerca de 8,5. Em outra modalidade, a invenção proporciona uma população de moléculas de CTLA4^{A29YL104E}-Ig tendo uma proporção molar média de moles de grupos ácido siálico para moles de moléculas ou dímeros de CTLA4^{A29YL104E}-Ig de cerca de 5 a cerca

de 10.

Em uma modalidade, uma população de moléculas de CTLA4^{A29YL104E}-Ig pode compreender monômeros de CTLA4^{A29YL104E}-Ig que têm, cada um, pelo menos 2,5 grupos ácido siálico. Em outra modalidade, uma população de moléculas de CTLA4^{A29YL104E}-Ig compreende monômeros de CTLA4^{A29YL104E}-Ig que têm, cada um, de 2,5 a 5 grupos ácido siálico.

Em outras modalidades, a invenção proporciona uma população de moléculas de CTLA4-Ig que se distinguem por uma proporção molar média da população de moles de amino monossacarídeos e/ou monossacarídeos neutros e/ou ácido siálicos para moles de moléculas ou dímeros de CTLA4-Ig. Em modalidades particulares, a invenção proporciona uma população de moléculas de CTLA4^{A29YL104E}-Ig que se distinguem por uma proporção molar média da população de moles de amino monossacarídeos e/ou monossacarídeos neutros e/ou ácido siálicos para moles de moléculas ou dímeros de CTLA4^{A29YL104E}-Ig. Amino monossacarídeos incluem N-acetil galactosamina (GalNAc) e N-acetil glicosamina (GlcNAc). Monossacarídeos neutros incluem manose, fucose e galactose. Ácidos siálicos incluem ácido N-acetil neuramínico (NANA) e ácido N-glicolil neuramínico (NGNA).

Em uma modalidade, a invenção proporciona uma população de moléculas de CTLA4-Ig que são caracterizadas por uma proporção molar média de moles de GlcNAc por mol de dímero de CTLA4-Ig ou para molécula de CTLA4-Ig que é de cerca de 10 a cerca de 40, de cerca de 15 a cerca de 35, de cerca de 15 a cerca de 25 ou de cerca de 15 a cerca de 20. Em outra modalidade, a invenção proporciona uma população de moléculas de CTLA4-Ig onde pelo menos 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% ou 95% das moléculas na população são caracterizadas por uma proporção molar média de moles de GlcNAc por mol de dímero de CTLA4-Ig ou para molécula de CTLA4-Ig que é menos de ou igual a cerca de 40, 38, 35, 30, 25, 20, 18 ou 15.

Em outra modalidade, a invenção proporciona uma população de moléculas de CTLA4-Ig que são caracterizadas por uma proporção molar média de moles de GalNAc por mol de dímero de CTLA4-Ig ou para molécula

la de CTLA4-Ig que é de cerca de 1,5 a cerca de 8,5, de cerca de 1,7 a cerca de 3,0, de cerca de 1,7 a cerca de 4,0, de cerca de 1,7 a cerca de 5,0, de cerca de 1,7 a cerca de 6,0, de cerca de 1,7 a cerca de 7,0, de cerca de 1,7 a cerca de 8,0 ou de cerca de 1,7 a cerca de 8,3. Em outra modalidade, a invenção proporciona uma população de moléculas de CTLA4-Ig onde pelo menos 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% ou 95% das moléculas na população são caracterizadas por uma proporção molar média de moles de GalNAc por mol de dímero de CTLA4-Ig ou para molécula de CTLA4-Ig que é menos de ou igual a cerca de 8,5, 8, 7,5, 7, 6,5, 6, 5,5, 5, 4,5, 4,0, 3,8, 3,6, 3,5, 3,0, 2,5, 2,0, 1,7 ou 1,5.

Em uma outra modalidade, a invenção proporciona uma população de moléculas de CTLA4-Ig que são caracterizadas por uma proporção molar média de moles de galactose por mol de dímero de CTLA4-Ig ou para molécula de CTLA4-Ig que é de cerca de 7,5 a cerca de 20,0, de cerca de 8,0 a cerca de 19,0, de cerca de 8 a cerca de 18,0, de cerca de 8,0 a cerca de 17,0, de cerca de 8,5 a cerca de 17,0 ou de cerca de 9,0 a cerca de 17,0. Em outra modalidade, a invenção proporciona uma população de moléculas de CTLA4-Ig onde pelo menos 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% ou 95% das moléculas na população são caracterizadas por uma proporção molar média de moles de galactose por mol de dímero de CTLA4-Ig ou para molécula de CTLA4-Ig que é menos de ou igual a cerca de 20,0, 19,0, 18,0, 17,0, 16,0, 15,0, 14,0, 13,0, 12,0, 11,0, 10,0, 9,0, 8,5, 8,0 ou 7,5.

Em uma outra modalidade, a invenção proporciona uma população de moléculas de CTLA4-Ig que são caracterizadas por uma proporção molar média de moles de fucose por mol de dímero de CTLA4-Ig ou para molécula de CTLA4-Ig que é de cerca de 3 a cerca de 8,5, de cerca de 3,5 a cerca de 8,5, de cerca de 3,5 a cerca de 8,3, de cerca de 3,5 a cerca de 8,0, de cerca de 3,5 a cerca de 7,5 ou de cerca de 3,5 a cerca de 7,0. Em outra modalidade, a invenção proporciona uma população de moléculas de CTLA4-Ig onde pelo menos 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% ou 95% das moléculas na população são caracterizadas por uma proporção molar média de moles de fucose por mol de dímero de CTLA4-Ig ou para molécula de C-

TLA4-Ig que é menos de ou igual a cerca de 8,5, 8,3, 8,0, 7,5, 7,0, 6,5, 6,0, 5,5, 5,0, 4,5, 4,0, 3,5, 3,2 ou 3,0.

Em uma outra modalidade, a invenção proporciona uma população de moléculas de CTLA4-Ig que são caracterizadas por uma proporção molar média de moles de manose por mol de dímero de CTLA4-Ig ou para molécula de CTLA4-Ig que é de cerca de 7 a cerca de 23, de cerca de 7,5 a cerca de 23, de cerca de 7,7 a cerca de 23, de cerca de 7,7 a cerca de 22,5, de cerca de 7,7 a cerca de 22, de cerca de 7,7 a cerca de 20, de cerca de 7,7 a cerca de 18, de cerca de 7,7 a cerca de 16, de cerca de 8,0 a cerca de 16,0, de cerca de 9,0 a cerca de 17,0, de cerca de 10 a cerca de 19,0 ou de cerca de 11 a cerca de 19,0. Em outra modalidade, a invenção proporciona uma população de moléculas de CTLA4-Ig onde pelo menos 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% ou 95% das moléculas na população são caracterizadas por uma proporção molar média de moles de manose por mol de moléculas ou dímeros de CTLA4-Ig ou para molécula de CTLA4-Ig que é menos de ou igual a cerca de 23, 22,5, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9,5, 9, 8,5, 8, 7,7, 7,5, 7,3 ou 7.

Em uma modalidade, a invenção proporciona uma população glicosilada de CTLA4-Ig que exibe valores de PK aumentados, tal como exposição aumentada conforme medido através da área sob a curva (AUC), tal como resultante de ou conforme demonstrado pela *clearance* diminuída do soro, ao mesmo tempo em que retém a bioatividade. Em outra modalidade, a invenção proporciona uma população de CTLA4^{A29YL104E}-Ig glicosilada que exibe valores de farmacocinética (PK) aumentados conforme demonstrado através da *clearance* diminuída do soro, ao mesmo tempo em que retém a bioatividade.

Em algumas modalidades, a invenção proporciona análogos de moléculas solúveis de CTLA4-Ig, as quais têm sítios de glicosilação adicionais. Em outras modalidades, a invenção proporciona análogos de moléculas solúveis de CTLA4^{A29YL104E}-Ig, as quais têm sítios de glicosilação adicionais. Sítios de glicosilação adicionais proporcionam pontos de fixação para estruturas de carboidrato adicionais que podem ser sialiladas. Teor aumen-

tado de ácido siálico pode levar a valores de PK aumentados e/ou estabilidade aumentada da glicoproteína. Maior teor de ácido siálico é benéfico. Métodos de pós-purificação *in vitro* que usam enzimas para adicionar mais ácido siálicos podem ser realizados para produzir outras modalidades das moléculas de CTLA4-Ig ou CTLA4^{A29YL104E}-Ig da invenção.

As modalidades da invenção incluem qualquer uma das faixas divulgadas aqui em combinação com qualquer uma ou mais faixas divulgadas aqui. As modalidades da invenção incluem qualquer característica ou propriedade de CTLA4-Ig divulgadas aqui em combinação com qualquer uma ou mais características ou propriedades de CTLA4-Ig divulgadas aqui.

Métodos para análise e Isolamento de glicoproteínas de CTLA4-Ig e CTLA4^{A29YL104E}-Ig

Os métodos descritos aqui a seguir podem ser usados para distinguir, identificar ou isolar populações de moléculas de CTLA4-Ig ou CTLA4^{A29YL104E}-Ig em particular com base em vários perfis de açúcar incluindo, mas não limitado a, uma proporção molar média da população de moles de amino monossacarídeos e/ou monossacarídeos neutros e/ou ácidos siálicos por mol moléculas ou dímeros de CTLA4-Ig ou CTLA4^{A29YL104E}-Ig.

Uma glicoproteína que é secretada de células cultivadas pode ser isolada do meio de cultura ou sobrenadante. A glicoproteína produzida pelas células é coletada, recuperada, isolada e/ou purificada ou substancialmente purificada, conforme desejado, ao final do período de cultura de célula total usando métodos de isolamento e purificação conforme conhecido e praticado na técnica ou conforme descrito aqui. Em uma modalidade, uma glicoproteína da invenção, a qual é expressa pela célula mas não secretada pela célula, ainda pode ser recuperada das células, por exemplo, fazendo lisatos de célula e isolando a glicoproteína e/ou usando métodos que são conhecidos e praticados na técnica e conforme ainda descritas abaixo.

A glicoproteína produzida através de um processo de cultura de célula da presente invenção compreende carboidratos complexos que podem ser analisados através de várias técnicas de análise de carboidrato. Por exemplo, técnicas tais como blotting de lectina, bem conhecidos na técnica,

revelam proporções de manose terminal ou outros açúcares, tal como galactose. Término de oligossacarídeos mono-, bi-, tri- ou tetra-antenários por ácidos siálicos pode ser confirmado através de liberação de açúcares da proteína usando hidrazina anídrica ou métodos enzimáticos e fracionamento de oligossacarídeos através de cromatografia de troca de íons, cromatografia por exclusão de tamanho ou outros métodos que são conhecidos na técnica.

Existem dois tipos principais de ligações glicosídicas encontradas em glicoproteínas, N- e O-ligação. N-glicosilações são criadas através da ligação covalente da glicana ao nitrogênio da amida de um resíduo de asparagina. Ligações O-glicosídicas são criadas através da ligação covalente do grupo hidroxila de serina, treonina, hidróxilisina ou hidróxiprolina à glicana. As porções de carboidrato de glicoproteínas estão envolvidas em numerosos fenômenos de reconhecimento molecular, incluindo interações hospedeiro-patógeno, *clearance* do soro e objetivação de diferentes tecidos. Com relação à moléculas de CTLA4-Ig e CTLA4^{A29YL104E}-Ig, porções de carboidrato podem afetar pelo menos a ligação entre moléculas de CTLA4-Ig e CD80 ou CD86 ou entre moléculas de CTLA4^{A29YL104E}-Ig e CD80 ou CD86.

Estruturas de carboidrato ocorrem, tipicamente, sobre uma proteína expressa como carboidratos N-ligados ou O-ligados. Os carboidratos N-ligados e O-ligados diferem primariamente quanto às suas estruturas centrais. glicosilação N-ligada se refere à fixação da porção de carboidrato, via GlcNAc, a um resíduo de asparagina na cadeia peptídica. Em uma modalidade, os carboidratos N-ligados contêm todos uma estrutura central de Man₁-6(Man₁-3)Man₁-4Glc-NAc₁-4GlcNAc-R em comum, onde R nessa estrutura central representa um resíduo de asparagina. A seqüência peptídica da proteína produzida conterá uma asparagina-X-serina, asparagina-X-treonina e asparagina-X-cisteína, em que X é qualquer aminoácido, exceto prolina.

Em contraste, carboidratos O-ligados são caracterizados por uma estrutura central em comum, a qual contém GalNAc presa ao grupo hidroxila da treonina ou serina. Dos carboidratos N-ligados e O-ligados, os mais importantes são os carboidratos N- e O-ligados complexos. Tais car-

boidratos complexos contêm várias estruturas antenárias. As estruturas mono-, bi-, tri-, e tetra-antenárias são importantes para a adição de ácidos siálicos terminais. Tais estruturas de cadeia externa proporcionam sítios adicionais para os açúcares específicos e ligações que compreendem os carboidratos de um produto de proteínas.

5 Glicoproteínas terapêuticas são freqüentemente produzidas usando técnicas de cultura de células de DNA recombinante. A distribuição de glicosilação de proteína em cultura de células pode ser afetada por variações no pH, densidade celular, concentrações de nutriente e concentrações de metabólito. A sensibilidade de distribuições de glicana a efeitos ambientais torna necessário monitorar cuidadosamente a distribuição de glicana durante desenvolvimento e produção de produto de forma a assegurar que um produto reproduzível é fabricado.

10 O desenvolvimento de glicoproteínas recombinantes – derivadas para uso terapêutico levou a uma demanda crescente por métodos para caracterizar e obter um perfil de suas estruturas de carboidrato. Mapeamento de oligossacarídeos foi usado para caracterização inicial de proteínas recombinantes para comparação com a proteína nativa, para identificar estruturas de oligossacarídeos presentes, para monitorar a consistência da composição de oligossacarídeo, para avaliar alterações que podem resultar de uma mudança na cultura de células ou processo de produção e identificar alterações na glicosilação que ocorrem como um resultado de expressão em diferentes linhagens de células.

15 Uma variedade de técnicas estão disponíveis para avaliar distribuições estruturais de carboidrato. Essas incluem filtração em gel, técnicas de separação cromatográficas e eletroforéticas acopladas com uma ampla faixa de técnicas de detecção. Se as quantidades de amostra são limitadas, as glicoproteínas são, freqüentemente, derivatizadas com reagentes fluorescentes, tais como ácido 2-aminobenzóico e 2-aminopiridina de forma a melhorar a detecção. Contudo, derivatização e purificação dos derivados pode consumir tempo. Quando o tamanho de amostra não é um problema, avaliação direta de distribuições estruturais de carboidrato é possível.

Análise do teor de oligossacarídeo de uma glicoproteína

Uma glicoproteína em particular pode mostrar heterogeneidade de carboidratos. A heterogeneidade pode ser observada em vários níveis: sítios de glicosilação de completamente ocupados a desocupados e qual-
5 quer sítio específico pode ter uma população de muitas estruturas de oligossacarídeo diferentes, em que cada estrutura pode ser modificada por moléculas de ácido siálico, tais como NANA ou NGNA.

O teor de carboidrato da proteína da presente invenção pode ser analisado através de métodos conhecidos na técnica, incluindo métodos
10 descritos nos Exemplos aqui. Vários métodos são conhecidos na técnica para análise de glicosilação e são úteis no contexto da presente invenção. Esses métodos proporcionam informação com relação à identidade e a composição do oligossacarídeo preso ao peptídeo produzido. Métodos para
15 análise de carboidrato úteis com relação à presente invenção incluem, mas não estão limitados a, cromatografia de lecitina, cromatografia de troca de íons de elevado desempenho combinada com detecção amperométrica pulsada (HPAEC-PAD), a qual usa cromatografia de troca de ânions em pH elevado para separar oligossacarídeos baseado na carga; NMR; Espectrometria de Massa; HPLC; cromatografia em carbono grafítico poroso (GPC).

Métodos para liberação de oligossacarídeo são conhecidos. Esses métodos incluem 1) métodos enzimáticos, os quais são comumente realizados usando N-glicosidase F/ endo- α -galactosidase; 2) métodos de α -
20 eliminação, usando o ambiente rigoroso alcalino para liberar principalmente estruturas O-ligadas; e 3) métodos químicos usando hidrazina anídrica para liberar oligossacarídeos O-ligados e N-ligados. Métodos para análise podem
25 compreender as seguintes etapas: 1. diálise da amostra contra água desionizada para remover todos os sais de tampão, seguido por liofilização. 2. Liberação de cadeias de oligossacarídeos intactas com hidrazina anídrica. 3. tratamento das cadeias de oligossacarídeos intactas com HCl anídrico metanólico para liberar monossacarídeos individuais como derivados de O-
30 metila. 4. N-acetilação de quaisquer grupos amino primários. 5. Derivatização para proporcionar glicosídeos de per-O-trimetil-silil metila. 6. Separação

desses derivados através de cromatografia gasosa – líquido capilar (GLC) sobre uma coluna de CP-SILS. 7. Identificação de derivados de glicosídeo individuais através do tempo de retenção a partir de GLC e espectrometria de massa, comparado com padrões conhecidos. 8. Quantificação de derivados individuais através de FID com um padrão interno (triose –O- metil- D- glicose).

A presença açúcares neutros e amino açúcares pode ser determinada usando cromatografia de troca de ânions de elevado desempenho combinada com detecção amperométrica pulsada (HPAEC-PAD Carbohydrate System; Dionex Corp.). Por exemplo, açúcares podem ser liberados através de hidrólise em ácido trifluoroacético a 20% (v/v) a 100 °C durante 6 horas. Os hidrolisatos são, então, secos através de liofilização ou com um Speed-Vac (Savant Instruments). Resíduos são, então, dissolvidos em solução de trihidrato de acetato de sódio a 1% e analisados sobre uma coluna de HPLC-AS6 (conforme descrito por Anumula e colaboradores, 1991, Anal. Biochem., 195: 269-280).

Alternativamente, análise de carboidrato por imunoblot pode ser realizada, esse procedimento, carboidratos proteína-ligados são detectados usando um sistema de detecção de glicana comercial (Boehringer), o qual é baseado no procedimento de imunoblot oxidativa descrito por Haselbeck e colaboradores (1993, Glycoconjugate J., 7: 63). O protocolo de coloração recomendado pelo fabricante é seguido, exceto que a proteína é transferida para uma membrana de difluoreto de polivinilideno ao invés de uma membrana de nitrocelulose e os tampões de bloqueio contém albumina de soro bovino a 5% em tampão de Tris a 10 mM, pH de 7,4 com cloreto de sódio a 0,9%. Detecção é realizada com anticorpos anti-digoxigenina ligados com um conjugado de fosfatase alcalina (Boehringer), diluição a 1: 1000 em solução salina tamponada com Tris usando os substratos de fosfato, cloreto de 4-nitroblue tetrazólio, 0,03% (peso/v) e 5-bromo-4 cloro-3-indolil-fosfato 0,03% (peso/v) em tampão de TRIS a 100 mM, pH de 9,5, contendo cloreto de sódio a 100 mM e cloreto de magnésio a 50 mM. As bandas de bandas contendo carboidrato são, usualmente, visualizadas em cerca de 10 a 15

minutos.

Carboidratos associados à proteína também podem ser clivados através de digestão com peptídeo-N-glicosidase F. De acordo com esse procedimento, o resíduo é suspenso em 14 μ L de um tampão contendo SDS a 0,18%, beta-mercaptoetanol a 18 mM, fosfato a 90 mM, EDTA a 3,6 mM, em um pH de 8,6 e aquecido a 100°C durante 3 minutos. Após esfriar para temperatura ambiente, a mistura de reação é dividida em duas partes aproximadamente iguais. Uma parte, a qual ainda não foi tratada, serve como um controle. A outra parte é ajustada com detergente NP-40 a cerca de 1%, seguido pela adição de 0,2 unidades de peptídeo-N-glicosidase F (Boehringer). Ambas as partes são aquecidas a 37°C durante 2 horas e, então, analisadas através de eletroforese em gel de poliacrilamida - SDS.

Mapeamento de glicana de glicoproteínas têm se tornado crescentemente aceito. A metodologia descrita permite a rápida caracterização de oligossacarídeos em termos de tipo de glicana, extensão de sialilação e número de ramificações sobre a extremidade de não redução dos carboidratos. Assim, em determinadas modalidades, a invenção proporciona uma população de CTLA4-Ig caracterizada por perfis de oligossacarídeo em particular. Realização de perfil de oligossacarídeo é, tipicamente, feita através de separação cromatográfica dos oligossacarídeos, seguido por detecção e quantificação relativa. Uma alternativa à realização de perfil cromatográfica é a análise direta de oligossacarídeos através de infusão por ESI após dessalinização *online*.

Realização de perfil de oligossacarídeos através de PGC pode ser usada para caracterizar os oligossacarídeos N-ligados a partir de moléculas de CTLA4-Ig. Existem 31 classes estruturais de oligossacarídeos identificados a partir de moléculas de CTLA4-Ig (SEQ ID NO: 2), incluindo uma classe estrutural contendo grupos ácido siálico O-acetilados. Verificação da classe estrutural é obtido através do uso de MS/MS e MS no modo de íons positivo. Quantificação relativa de classes estruturais é possível através da integração do traço de UV a 206 nm. Comparação dos perfis de subpopulação a partir de sítios de N-ligação individuais é conhecida, revelando

diferenças significativas entre populações entre sítios de N-ligação. Realização de perfil de oligossacarídeo usando PGC proporciona uma alternativa rica em informação conveniente aos métodos de realização de perfil mais tradicionais, tal como HPAEC.

5 **Estruturas N-ligadas em moléculas de CTLA4-Ig compreendendo monômeros de SEQ ID NO: 2**

Existem três sítios de glicosilação N-ligada por cadeia (isto é, por monômero) sobre um multímero ou dímero de CTLA4-Ig, em que o monômero tem uma seqüência de SEQ ID NO: 2, por exemplo: (i) 26-383 de SEQ ID NO: 2, (ii) 26-382 de SEQ ID NO: 2, (iii) 27-383 de SEQ ID NO: 2, (iv) 27-382 de SEQ ID NO: 2, (v) 25-382 de SEQ ID NO: 2 ou (vi) 25-383 de SEQ ID NO: 2). As variações na glicosilação por sítio são analisados através de isolamento de fragmentos peptídicos contendo glicanas N-ligadas a partir de uma digestão tríptica da proteína. Os sítios de glicosilação N-ligada sobre uma proteína estão localizados em Asn¹⁰², Asn¹³⁴ e Asn²³³, contidos nos fragmentos trípticos 5, 7 e 14, respectivamente. Liberação enzimática de oligossacarídeos N-ligados a partir dos fragmentos peptídicos isolados, seguido por realização de perfil por PGC dos oligossacarídeos liberados, resulta nos perfis mostrados na FIG. 13. Está claro a partir do perfil das glicanas liberadas de Asn²³³ (fragmento tríptico 14, T14) que a população de oligossacarídeo é enriquecida nas estruturas de asialo (estruturas que não têm ácidos siálicos) os perfis de oligossacarídeos das glicanas presas em Asn¹⁰² e Asn¹³⁴ (T5 e T7) contêm o grosso das estruturas sialiladas.

Oligossacarídeos isolados liberados da glicoproteína saio diretamente injetados no sistema de LC/UV/MS de carbono grafítico poroso. As FIGS. 14 e 15 mostra os cromatogramas por TIC e UV de um perfil por PGC típico gerado através de gradientes de acetonitrilo contendo aditivos ácidos e básicos. Na maioria dos casos, os espectros de massa de um único pico cromatográfico contém picos de massa para um único oligossacarídeo. Trinta classes estruturais de oligossacarídeos são identificadas a partir do perfil de eluição contendo TFA. Apenas dezesseis classes estruturais de oligossacarídeos são identificadas a partir do perfil de eluição contendo NH₄OH.

Dentro de cada classe estrutural existem estruturas variantes contendo substituição de ácido N-glicolil neuramínico (NGNA) em lugar de ácido N-acetil neuramínico (NANA) bem como diferentes graus de acetilação de ácido siálico. Embora somente informação quantitativa possa ser obtida a partir de comparação das contagens de íons para as classes de oligossacarídeos, é evidente que as principais classes estruturais dentro de cada um dos quatro domínios são P2100, P2111, P2122 e P3133. Isso é consistente com os valores de integração obtidos a partir do traço de UV a 206 nm. Verificação estrutural adicional pode ser obtida a partir do espectrograma de massa de íons positivos. A ionização no modo de íons positivo promove uma fragmentação em fonte de oligossacarídeo, principalmente nas ligações glicosídicas. Em virtude do fato de haver boa separação de oligossacarídeos, conforme determinado através dos espectros de massa de íons negativos, os espectros fragmentados do modo de íons positivo imitam os espectros de MS/MS de íons positivos. O Domínio III (estruturas di-sialiladas) contém uma quantidade significativa de P2122-Ac O-acetilada. Dados de m/s de íons positivos sustentam a O-acetilação de um dos ácidos siálicos sobre a estrutura. O sítio de O-acetilação mais comum de resíduos de ácido siálico está nas posições C-7 e C-9 (Shi WX, Chammas R., Varki A., *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 15130-15188). Em uma pH extracelular fisiológico, O-acetil ésteres em C-7 migram espontaneamente para C-9. O sítio de O-acetilação mais provável é, portanto, C-9.

Análise do teor de oligossacarídeos N-ligados: As técnicas analíticas podem compreender clivagem e isolamento de oligossacarídeo N-ligados através de cromatografia em coluna a qual, em uma modalidade não limitativa, usa uma coluna Hypercarb. Glicanas submetidas à cromatografia em Hypercarb são isoladas e podem ser analisadas através de HPAEC-PAD, análise a qual determina os tipos de carboidratos que modificam uma glicoproteína em particular. Caracterização analítica dos oligossacarídeos N-ligados pode também ser obtida através de Cromatografia de Líquido/Espectrometria de Massa (LC/MS) usando um Carbono Grafítico Poroso (PGC). Análise de carboidrato pode também incluir mapeamento peptídico

com tripsina, Asp-N e Tripsina/Quimiotripsina para determinar os peptídeos os quais compreendem estruturas de carboidrato.

Estruturas de oligossacarídeo N-ligado podem ser analisadas usando uma série de técnicas de espectrometria de massa ortogonal e HPAEC-PAD (veja Exemplos). Essas técnicas incluem várias clivagens com endopeptidase, seguido por análise através de LC/MS/MS. Com relação a monômeros de CTLA4-Ig tendo uma seqüência de SEQ ID NO: 2, os três principais sítios de glicosilação N-ligada foram caracterizados usando LC/MS e ionização por eletropulverização LC/MS/MS e as principais estruturas em cada sítio de N-ligação foram determinadas. Esses dados são resumidos na FIG. 9. Existem pelo menos três pontos principais de fixação para oligossacarídeos N-ligados em Asn¹⁰², Asn¹³⁴ e Asn²³³. Além disso, descobriu-se que Asn²³³ contém uma população de estruturas N-ligadas que não contém grupos ácido siálico que ocorrem cerca de 80% das vezes.

Estruturas de oligossacarídeo N-ligado de CTLA4-Ig determinadas através de LC/MS dos glicopeptídeos, LC/MS dos oligossacarídeos e HPAEC-PAD: Os carboidratos N-ligados estão associados a um motivo de seqüência de consenso de Asn - X - Ser/Thr. Essa seqüência aparece três vezes sobre cadeias monoméricas de CTLA4-Ig tendo uma das seguintes seqüências: (i) 26-383 de SEQ ID NO: 2, (ii) 26-382 de SEQ ID NO: 2, (iii) 27-383 de SEQ ID NO: 2, (iv) 27-382 de SEQ ID NO: 2, (v) 25-382 de SEQ ID NO: 2 e (vi) 25-383 de SEQ ID NO: 2. O motivo de seqüência de consenso aparece em SEQ ID NO: 2 em: Asn¹⁰² Leu¹⁰³ Thr¹⁰⁴; Asn¹³⁴ Gly¹³⁵ Thr¹³⁶; e Asn²³³ Ser²³⁴ Thr²³⁵. Baseado na seqüência de consenso, existem seis sítios de carboidrato N-ligado por molécula dimérica que são formados de qualquer uma ou duas das seguintes seqüências monoméricas: (i) 26-383 de SEQ ID NO: 2, (ii) 26-382 de SEQ ID NO: 2, (iii) 27-383 de SEQ ID NO: 2, (iv) 27-382 de SEQ ID NO: 2, (v) 25-382 de SEQ ID NO: 2 e (vi) 25-383 de SEQ ID NO: 2.

Carboidratos N-ligados podem ser de três variedades gerais: com alto teor de manose, híbridos e/ou complexos. Uma técnica de LC/MS para a análise de glicopeptídeo foi desenvolvida. Clivagem de monômeros

endoproteolítica com tripsina (tendo uma das seqüências (i) 26-383 de SEQ ID NO: 2, (ii) 26-382 de SEQ ID NO: 2, (iii) 27-383 de SEQ ID NO: 2, (iv) 27-382 de SEQ ID NO: 2, (v) 25-382 de SEQ ID NO: 2 e (vi) 25-383 de SEQ ID NO: 2) resulta em três peptídeos que contêm glicosilação N-ligada. Todos os

5 três sítios de N-ligação têm uma população de estruturas de carboidrato. O fragmento tríptico T5, correspondendo aos aminoácidos 65-109 de SEQ ID NO: 2, contém uma glicosilação sobre Asn¹⁰². O fragmento tríptico T7, correspondendo aos aminoácidos 120-154 de SEQ ID NO: 2, contém uma glicosilação sobre Asn¹³⁴. O fragmento tríptico T14, correspondendo aos aminoácidos 229-237 de SEQ ID NO: 2, contém uma glicosilação sobre Asn²³³.

10

De forma a determinar os tipos específicos de glicosilação sobre cada sítio, carboidratos foram obtidos de cada sítio específico através de aumento da escala de digestão e separação de proteína, seguido por coleta dos peptídeos T5, T7 e T14. Os picos de peptídeo tríptico de interesse foram

15 tratados com PNGase F e processados para análise através de LC/MS sobre uma coluna Hypercarb. Os resultados mostraram uma população heterogênea de estruturas bi-, tri- e tetra-antenárias complexas em cada sítio. Essas podem ser observadas na FIG. 13, onde a cromatografia separa os açúcares em cinco domínios: estruturas asialo, mono-sialo, di-sialo, tri-sialo e tetra-sialo (referidos como Domínios I, II, III, IV e V, respectivamente). Um

20 cromatograma (FIG. 13, painel A) para os carboidratos Asn¹⁰² (T5) ilustra uma série de estruturas mono- e di-sialo no sítio. Um cromatograma (FIG. 13, painel B) para Asn¹³⁴ (T7) ilustra duas estruturas di-sialo principais com uma população de estruturas mono-sialo. Um cromatograma (FIG. 13, painel

25 C) para Asn²³³ (T14) ilustra pouca sialilação. Para cada um dos sítios de carboidrato N-ligado, um espectro por MS e estrutura correspondente são mostrados para o pico principal em cada cromatograma (veja FIG. 13, painéis E, F, H). Na FIG. 13, painel D, o perfil de carboidratos N-ligados totais de CTLA4-Ig é mostrado no cromatograma. A massa e estruturas de picos

30 selecionados são listados na Tabela 1. Os dados de LC/MS para oligossacárido foram sustentados através de análise em profundidade do mapeamento peptídico. Asn¹⁰² (peptídeo T5) tem o maior grau de heterogeneidade de

carboidrato oscilando de estruturas bi-anténárias, não-sialiladas à estruturas tetra-anténárias, tetra-sialiladas. Asn¹³⁴ (peptídeo T7) contém primariamente estruturas bi-anténárias. Esse sítio contém muito menos heterogeneidade do que o sítio Asn¹⁰². O sítio Asn²³³ (peptídeo T14) contém pouca sialilação.

- 5 Uma terceira técnica analítica, HPAEC-PAD, foi também empregada para sustentar duas descobertas por LC/MS ortogonal.

Tabela 1: As principais estruturas N-ligadas e estruturas complexas menores selecionadas observadas usando métodos de LC/MS

Estrutura	Massa teórica	Massa com deconvolução real
(GlcNAc) ₄ (Fuc)1 (Man) ₃	1462	1575*
(GlcNAc) ₄ (Fuc)1 (Man) ₃ (Gal) ₁	1624	1737*
(GlcNAc) ₄ (Fuc)1 (Man) ₃ (Gal) ₂	1786	1899*
(GlcNAc) ₄ (Fuc)1 (Man) ₃ (Gal) ₁ (NeuAc) ₁	1916	1916
(GlcNAc) ₄ (Fuc)1 (Man) ₃ (Gal) ₂ (NeuAc) ₁	2077	2077
(GlcNAc) ₅ (Fuc)1 (Man) ₃ (Gal) ₃ (NeuAc) ₁	2443	2442
(GlcNAc) ₄ (Fuc)1 (Man) ₃ (Gal) ₂ (NeuAc) ₂	2369	2368
(GlcNAc) ₅ (Fuc)1 (Man) ₃ (Gal) ₃ (NeuAc) ₂	2734	2734
(GlcNAc) ₅ (Fuc)1 (Man) ₃ (Gal) ₃ (NeuAc) ₃	3025	3025
(GlcNAc) ₆ (Fuc)1 (Man) ₃ (Gal) ₃ (NeuAc) ₃	3388	3388
(GlcNAc) ₆ (Fuc)1 (Man) ₃ (Gal) ₃ (NeuAc) ₄	3680	3680

*As espécies asialo são detectadas como adutos de TFA.

- 10 A população de carboidratos N-ligados totais foi analisada usando HPAEC-PAD. Os dados obtidos através desse método são listados nas Tabelas 2 e 3. Na Tabela 2, os percentuais de área relativa de domínios asialo a tri-sialo são listados dentro de cada sítio (Asn¹⁰², Asn¹³⁴ e Asn²³³ de SEQ ID NO: 2). Na Tabela 3, os percentuais de área de domínio de oligossacarídeo são listados como uma fração da população toda de oligossacarídeos.

15

Tabela 2: Os percentuais de área para cada domínio observado através de HPAEC-PAD

N ligado	Asialo	Mono	Di	Tri
N ¹⁰²	27	37	25	11
N ¹³⁴	25	38	28	8
N ²³³	82	12	5	1

Tabela 3: Os percentuais de área para cada domínio expressos como a média calculada ponderada sobre o conjunto de dados na

Tabela 2

N ligado	Asialo	Mono	Di	Tri
N ¹⁰²	9	12	8	4
N ¹³⁴	8	13	9	3
N ²³³	28	4	2	0
Total / Molécula	45	29	19	7

Admitindo glicosilação total.

- 5 **Estruturas de oligossacarídeo N-ligado de moléculas de CTLA4^{A29YL104E}-Ig determinadas através de LC/MS dos glicopeptídeos, LC/MS dos oligossacarídeos e HPAEC-PAD:** Os carboidratos N-ligados estão associados a um motivo de seqüência de consenso de Asn - X - Ser/Thr. Essa seqüência aparece três vezes sobre cadeias monoméricas de
- 10 CTLA4^{A29YL104E}-Ig tendo uma das seguintes seqüências: (i) 26-383 de SEQ ID NO: 4, (ii) 26-382 de SEQ ID NO: 4, (iii) 27-383 de SEQ ID NO: 4, (iv) 27-382 de SEQ ID NO: 4, (v) 25-382 de SEQ ID NO: 4 e (vi) 25-383 de SEQ ID NO: 4. O motivo de seqüência de consenso aparece em SEQ ID NO: 4 em: Asn¹⁰² Leu¹⁰³ Thr¹⁰⁴; Asn¹³⁴ Gly¹³⁵ Thr¹³⁶; e Asn²³³ Ser²³⁴ Thr²³⁵. Baseado na
- 15 seqüência de consenso, existem seis sítios de carboidrato N-ligado por molécula dimérica que são formados de qualquer uma ou duas das seguintes seqüências monoméricas: (i) 26-383 de SEQ ID NO: 4, (ii) 26-382 de SEQ ID NO: 4, (iii) 27-383 de SEQ ID NO: 4, (iv) 27-382 de SEQ ID NO: 4, (v) 25-382 de SEQ ID NO: 4 e (vi) 25-383 de SEQ ID NO: 4.
- 20 Carboidratos N-ligados podem ser de três variedades gerais: com alto teor de manose, híbridos e/ou complexos. Uma técnica de LC/MS para a análise de glicopeptídeo foi desenvolvida. Clivagem endoproteolítica com tripsina de monômeros (tendo uma das seqüências (i) 26-383 de SEQ ID NO: 4, (ii) 26-382 de SEQ ID NO: 4, (iii) 27-383 de SEQ ID NO: 4, (iv) 27-382 de SEQ ID NO: 4, (v) 25-382 de SEQ ID NO: 4 e (vi) 25-383 de SEQ ID NO: 4) resultou em três peptídeos que contêm glicosilação N-ligada (veja Tabela
- 25 no Exemplo 22). Todos os três sítios N-ligados têm populações de estruturas de carboidrato. O fragmento tríptico T5, correspondendo aos aminoáci-

dos 65-109 de SEQ ID NO: 4, contém uma glicosilação sobre Asn¹⁰². O fragmento tríptico T7, correspondendo aos aminoácidos 120-154 de SEQ ID NO: 4, contém uma glicosilação sobre Asn¹³⁴. O fragmento tríptico T14, correspondendo aos aminoácidos 229-237 de SEQ ID NO: 4, contém uma glicosilação sobre Asn²³³ (veja Tabela 25 no Exemplo 22).

De forma a determinar os tipos específicos de glicosilação sobre cada sítio, carboidratos foram obtidos de cada sítio específico através de aumento da escala de digestão e separação de proteína, seguido por coleta dos peptídeos T5, T7 e T14. Os picos de peptídeo tríptico de interesse foram tratados com PNGase F e processados para análise através de LC/MS sobre uma coluna Hypercarb. Os resultados mostraram uma população heterogênea de estruturas bi-, tri- e tetra-antênárias complexas em cada sítio. Essas podem ser observadas na FIG. 16, onde a cromatografia separa os açúcares em quatro domínios: estruturas asialo, mono-sialo, di-sialo e tri-sialo (referidos como Domínios I, II, III e IV, respectivamente). As características de um perfil de carboidrato que podem ser analisadas e comparadas entre moléculas ou populações glicosiladas ou composições compreendendo moléculas glicosiladas incluem área de pico percentual, área de domínio percentual, distância vale-a-vale ou distância pico-a-pico.

20 Caracterização por LC/MS de oligossacarídeos N-ligados de CTLA4-Ig

Cromatografia em carbono grafítico poroso (PGC) por LC/MS é um método para obtenção de perfil de oligossacarídeos N-ligados que pode proporcionar vantagens com relação à cromatografia de troca de ânions em pH elevado (HPAEC). Algumas dessas vantagens incluem: obtenção direta de perfil a partir de misturas de digestão, o que minimiza a degradação de amostra; a interface de MS direta proporciona um método para caracterização e análise rápida de oligossacarídeos; resolução aumentada através de cromatografia por PGC permite comparações inter-domínio, bem como análise intra-domínio mais sutil.

30 O método de PGC por LC/MS permite a obtenção rápida de perfil e caracterização de oligossacarídeos em termos de tipo de glicana e determinação da extensão de sialilação e ramificação sobre a extremidade de

não-redução dos carboidratos. Assim, os espectros de MS no modo de íons negativo produzem dados que são simples de interpretar, com fragmentação mínima dos oligossacarídeos, enquanto que ionização no modo positivo permite verificação da classe estrutural. O método descrito aqui pode ser aplicado à misturas inteiras de digestão de glicoproteínas, bem como à amostras de oligossacarídeo previamente isoladas sem a necessidade de derivatização. As fases móveis cromatográficas usadas permitem coleta de picos dos perfis e concentração até secagem, sem manipulação adicional para caracterização mais detalhada. Em uma modalidade, o método é usado para caracterizar oligossacarídeos N-ligados de CTLA4-Ig. Usando o método de PGC por LC/MS, trinta e uma classes distintas de oligossacarídeos podem ser identificadas sobre moléculas de CTLA4-Ig compreendidas de monômeros tendo seqüências de SEQ ID NO: 2, por exemplo, SEQ ID NO: 5, 6, 7, 8, 9 ou 10.

15 Cromatografia de troca de ânions em pH elevado (HPAEC) foi usada extensivamente para obter um perfil de oligossacarídeos liberados de glicoproteínas sem a necessidade de derivatização. A alta resolução de HPAEC e o fato de que a separação é influenciada pelo tipo de resíduo de açúcar presente, tipo de ligação o tamanho da glicana são razões para o uso difundido da técnica. O fator dominante na separação é a carga, oligossacarídeos altamente carregados eluindo antes das glicanas menos carregadas. Os perfis cromatográficos são freqüentemente divididos em domínios definidos pelo número de espécies carregadas, tipicamente resíduos de ácido siálico, sobre as glicanas (FIG. 17).

25 Para obter mais informação sobre a estrutura dos oligossacarídeos desconhecidos, os picos de HPAEC podem ser coletados, dessalinizados e caracterizados por MS e/ou NMR. Uma consideração sobre a obtenção de perfil por HPAEC-PAD de distribuições de oligossacarídeo é a variabilidade inerente do modo de detecção. Envelhecimento de célula eletroquímica e incrustação da superfície de eletrodo resultam em variabilidade do perfil. Foi também reportado que estruturas de oligossacarídeo e o grau de sialilação podem causar variabilidade entre células de detecção quando u-

sando HPAEC com detecção amperométrica pulsada (HPAEC-PAD). Essa variabilidade pode afetar os resultados relativamente quantitativos usados para avaliar o efeito de alterações de processo ou determinar a consistência lote a lote. Em virtude de sua velocidade e especificidade, espectrometria de massa (MS) tem obtido popularidade como uma técnica para avaliação de perfis de oligossacarídeo de glicoproteínas. Embora os perfis por MS não possam ser usados diretamente para determinar a configuração anomérica ou padrões de ramificação, os dados de MS podem ser usados para identificar classes estruturais e detectar alterações qualitativas nas distribuições de glicoforma.

O método de obtenção de perfil por cromatografia em carbono grafito poroso (PGC) para oligossacarídeos N-ligados enzimaticamente liberados usa detecção por ultravioleta (UV) e por espectrometria de massa (MS) para obter o perfil e caracterizar oligossacarídeos N-ligados, diretamente a partir de misturas de digestão enzimática ou de oligossacarídeos isolados. Esse método pode ser usado para obter um perfil e caracterizar oligossacarídeos liberados de glicoproteínas de CTLA4-Ig. O método de PGC por LC/MS pode avaliar a consistência das distribuições de oligossacarídeo resultantes do processo de produção, bem como quaisquer alterações nas distribuições de oligossacarídeo resultantes de modificações do processo. Em uma micro-análise cromatográfica de oligossacarídeos N-ligados de moléculas de CTLA4-Ig, oligossacarídeos N-ligados enzimaticamente liberados podem ser prontamente separados através da coluna de PGC de forma a aumentar a sialilação e aumentar o tamanho. A faixa de estruturas presentes e as quantidades relativas de cada classe de estrutura são determinadas através da combinação de análise por MS e UV (Exemplo 3).

Para otimizar o método de PGC por LC/MS, otimização das condições espectrais de massa pode ser útil. Otimização pode incluir uma série de experimentos de mapeamento de superfície de forma a avaliar os efeitos da composição de solvente e parâmetros de ionização por MS quando de detecção de oligossacarídeo. Parâmetros da composição de solvente para avaliação compreendem percentual de acetonitrilo (em volume) e aditivos

eluentes (ácido trifluoroacético e hidróxido de amônio). Os parâmetros de ionização por MS considerados para avaliação incluem os ajustes de temperatura de dessolvatação, tensão de capilar e tensão de cone para a fonte de eletropulverização.

- 5 Os parâmetros de ionização podem exercer um papel significativo na resposta de sinal. O modelo resultante da determinação por mapeamento de superfície foi usado para ajustar os parâmetros de ionização durante a determinação cromatográfica. Maiores valores para a temperatura de des-
- 10 solvatação e tensão de cone resultam em maior resposta. A tensão ótima do capilar varia, dependendo do aditivo eluente, o sistema de solvente contendo TFA tendo uma tensão ótima de capilar ligeiramente maior. O fator com o maior efeito é o volume percentual de acetonitrilo, um maior teor de acetoni-
- trilo resultando em maiores respostas.

Cromatografia em Carbono Grafítico Poroso

- 15 Carbono Grafítico Poroso (PGC) foi usado para dessalinização por extração em fase sólida de oligossacarídeos. PGC também é conhecida como um meio cromatográfico eficaz para separação de oligossacarídeo sob condições de eluição ácidas e básicas. Condições cromatográficas para obtenção de perfil ácido e básico de oligossacarídeos enzimaticamente libera-
- 20 dos de moléculas de CTLA4-Ig tendo seqüências monoméricas de SEQ ID NO: 2 foram desenvolvidas. Cada condição é compatível com detecção por UV e MS. Conforme foi observado nos experimentos de infusão, as condições de eluição ácida resultam em sensibilidade do MS maior do que as condições básicas. A resposta do MS para oligossacarídeos neutros eluídos
- 25 sob condições ácidas, detectados como adutos de TFA, são cinco a nove vezes a intensidade do pico correspondente eluído sob condições básicas. A diferença na resposta de sinal é menos dramática para os oligossacarídeos ácidos, em média três vezes a resposta de sinal para glicanas mono-
- 30 sialiladas e uma resposta de sinal igual para glicanas di-sialiladas. O número aumentado de picos no cromatografia eluído com TFA (FIGS. 14A-B) comparado com o cromatografia eluído com NH₄OH (FIG. 15A-B) é um resultado de separação de formas anoméricas de oligossacarídeos. Coleta e concen-

tração de picos individuais eluídos do gradiente com TFA resulta em divisão do pico único em dois picos de massa idêntica quando de re-injeção. Eluição básica dos oligossacarídeos da coluna de PGC resulta em um perfil mais simples (FIG. 15A-B). As condições de eluição básica não resultam em separação anomérica completa, contudo, ampliação de pico significativa é observada. A resolução de pico pode ser aumentada através de aumento da temperatura da coluna, o que irá acelerar a inter-troca de formas anoméricas (Itoh S. e colaboradores, *J. Chromatogr. A.* 2002 968(1 -2), 89-100). Contudo, a sensibilidade (contagem de íons) para os oligossacarídeos detectados permanece reduzida, comparado com as condições de eluição ácida. Foi reportado que a adição de sais, tal como acetato de amônio, aumenta a sensibilidade (Churms SC, *J. Chromatogr. A.* 500 (1990) 555-583).

A adição de acetato de amônio, trifluoroacetato de amônio ou formato de amônio resulta em resposta aumentada, mas também resulta em ampliação assimétrica de pico. A ampliação de pico resultante e interferência potencial do sal adicionado com a detecção por UV torna a adição de sal uma opção não atraente. Um meio alternativo de eliminação de separação anomérica é reduzir os oligossacarídeos aos alditóis correspondentes.

Maior sensibilidade e resolução cromatográfica tornam as condições de eluição ácida úteis para obtenção de perfil de oligossacarídeo. Um sistema de obtenção de perfil em particular consiste de uma coluna Luna C18 acoplada através de duas válvulas de admissão com suas posições duplas à coluna Hypercarb de 5 μ M (100 x 4,6 mm). A coluna Hypercarb é acoplada a um detector de UV (Waters 2996 PDA) em série com um Q-ToF Micro (Micromass) com uma sonda de ESI padrão. através de controle de comutação apropriado, obtenção de perfil de amostras de CTLA4-Ig pré-purificadas pode ser realizada usando a coluna Hypercarb apenas ou o perfil de misturas de digestão pode ser obtido através de injeção direta da mistura de digestão sobre a Luna C18 em série com a coluna Hypercarb. Tipicamente, os perfis são obtidos dos oligossacarídeos N-ligados liberados de 10 a 20 nmoles de proteína.

Em determinadas modalidades, a invenção proporciona uma po-

pulação de moléculas de CTLA4-Ig que têm um cromatograma de acordo com qualquer um ou mais dos cromatogramas tendo picos representativos. Cromatogramas de perfil de oligossacarídeo representativos de moléculas de CTLA4-Ig tendo monômeros com seqüências de SEQ ID NO: 2 são mostrados na FIG. 13, FIGS. 14A-B, FIGS. 15A-B (PGC), FIG. 17 (HPAEC/PAD) e FIGS. 18A-B. Ambos esses perfis cromatográficos podem ser decompostos em quatro domínios distintos contendo estruturas de oligossacarídeo com graus crescentes de sialilação nos últimos domínios de eluição. O sistema cromatográfico de PGC permite a interface direta com um detector de massa. A resolução de massa e proporções de sinal para interferência são aceitáveis para oligossacarídeos os quais estão presentes em baixos percentuais. Resolução cromatográfica de estruturas de oligossacarídeos individuais parece maior na separação cromatográfica por PGC quando comparado com a HPAEC.

Coleta de picos do método de HPAEC requer dessalinização e o elevado pH empregado introduz a possibilidade de reações de descamação que poderiam interferir com a identificação estrutural precisa de picos. Em virtude do fato de as condições cromatográficas usadas com cromatografia por PGC serem isentas de sais, os picos de oligossacarídeo eluídos podem ser coletados e concentrados com manipulação mínima. Isso permite a coleta e concentração de picos eluídos, seguido por injeção dos oligossacarídeos coletados sobre o sistema de HPAEC. Re-injeção dos oligossacarídeos coletados sobre um sistema de HPAEC-PAD permite a atribuição estrutural de alguns dos picos presentes no perfil por HPAEC (FIG. 17). Em virtude de resolução de pico incompleta sobre a coluna de troca de ânions, nem todos os picos isolados puderam ser mapeados ao perfil por HPAEC.

Os perfis resultantes de injeção direta de misturas de digestão e aqueles para oligossacarídeos isolados da mesma amostra de proteína não são idênticos. Os perfis resultantes de injeção direta (FIGS. 18A-B) têm diferentes proporções de anômero, sugerindo que a concentração de oligossacarídeos coletados é resultante de anomerização aumentada. De modo mais importante, o perfil resultante de injeção direta contém um pico, o qual cor-

responde a uma estrutura tetra-sialilada. Essa estrutura não é identificada no perfil de oligossacarídeos coletados e isolados. Além de menor tempo de ensaio, obtenção de perfil diretamente das misturas de digestão pode resultar em uma representação mais precisa da distribuição de oligossacarídeo, evitando degradação de glicana durante coleta e concentração.

Quantificação Relativa

O mapeamento de superfície realizado sobre amostras de infusão indica que o volume percentual de acetonitrilo tem um efeito significativo sobre a eficiência de ionização dos oligossacarídeos em eluição. A dependência da intensidade de sinal sobre o teor de acetonitrilo na fase móvel torna a quantificação relativa de oligossacarídeos através de MS dependente do tempo de retenção do pico de eluição. Variações na condição da coluna podem afetar os tempos sobre colunas de PGC. Por essa razão, seria difícil obter quantificação relativa consistente a partir do perfil de eluição no cromatograma de íons. O traço de UV a 206 nm não deverá ser afetado pela composição de solvente até o mesmo ponto em que o traço de íons. A quantificação relativa foi realizada usando o traço de UV, o traço de íons foi usado para caracterização e comparações qualitativas apenas. Injeção repetida para os oligossacarídeos isolados de um único lote de glicoproteína resultou em percentuais de desvio padrão relativo (%RSD) de menos de 4% para cada um dos quatro domínios de oligossacarídeo quantificados.

Estruturas O-ligadas em moléculas de CTLA4-Ig compreendendo monômeros de SEQ ID NO: 2

Além dos carboidratos N-ligados, moléculas de CTLA4-Ig podem conter carboidratos O-ligados. As estruturas de oligossacarídeo O-ligado podem ser analisadas usando uma série de técnicas de espectrometria de massa ortogonal. Essas técnicas incluem várias clivagens com endopeptidase, seguido por análise através de LC/MS/MS.

Com relação à moléculas de CTLA4-Ig formadas de monômeros tendo uma seqüência de SEQ ID NO: 5, 6, 7, 8, 9 ou 10, os dois principais sítios de glicosilação O-ligada foram caracterizados usando ionização por eletropulverização de massa exata e as principais estruturas em cada sítio

de O-ligação foram determinadas. Esses dados são resumidos na FIG. 9. Os dados são consistentes com a existência de três principais estruturas O-ligadas: (GalNAc)₁ (Gal)₁ (NeuAc)₁; (GalNAc)₁ (Gal)₁ (NeuAc)₂; (GalNAc)₁ (GlcNAc)₁ (Gal)₂ (NeuAc)₂. Cada estrutura é observada em diferentes quantidades sobre cada sítio. Essas quantidades são relativamente quantitativas e representam dados obtidos de múltiplas análises. Os oligossacarídeos O-ligados contribuem para uma quantidade substancial de ácido siálico para CTLA4-Ig. Existem dois pontos de fixação principais de oligossacarídeo O-ligado por cadeia. O sítio primário de ocorrência para oligossacarídeos O-ligados é Ser¹⁶⁵, o qual é ocupado em cerca de 95% das vezes. O sítio secundário de ocorrência para oligossacarídeos O-ligados é Ser^{155/156}, o qual é ocupado = 25% das vezes. Os dados ortogonais apresentados aqui proporcionam uma visão geral das estruturas de carboidrato predominantes presentes sobre tais moléculas de CTLA4-Ig e são resumidos na FIG. 9.

Em geral, os carboidratos O-ligados têm heterogeneidade de estrutura muito maior do que está presente em carboidratos N-ligados. Além disso, não há seqüência de consenso para fixação de O-ligação. Assim, uma série de técnicas ortogonais foram desenvolvidas para uso na caracterização estrutural dos oligossacarídeos O-ligados: análise intacta por LC/MS e análise de glicopeptídeo por LC/MS.

Baseado na degradação de Edman e MALDI, um sítio de O-ligação foi reportado como sendo Ser¹⁶⁵ (com relação à SEQ ID NO: 2). Para obter dados diretos com relação à presença de glicosilação Ser¹⁶⁵, seqüenciamento por MS/MS usando a série de íons b' e y" sobre o peptídeo T9 (veja Tabela 4 e Tabela 5) foi realizado. A Tabela 4 lista a série de íons para o peptídeo T9 em quatro estados diferentes de glicosilação. Em todos os quatro estados, a série de íons b', íons b1... b6, está em concordância. Contudo, a série de íons b', b7... b_{max}, varia através dos diferentes estados de glicosilação em b7 (Ser¹⁶⁵). Como uma confirmação, a série de íons y" correspondente é reportada. Em todas as quatro séries de íons y", os íons y1...y19 estão em completa concordância. Contudo, a série de íons y", y20...y_{max}, varia através dos diferentes estados de glicosilação em y20 (Ser¹³⁹). A série

de íons b' e y'', tomados juntos, sustenta a implicação do seqüenciamento de Edman de que Ser¹³⁹ é o sítio de glicosilação O-ligada primário sobre o peptídeo T9. T9 é um peptídeo que contém vários resíduos de serina e treonina.

- A Tabela 4 apresenta íons b' e y' de LC/MS/MS para o peptídeo
- 5 T9 com e sem o *ladder* O-ligado de (GalNAc)₁ (Gal)₁ (NeuAc)₁. A série de íons b' é idêntica para todos os espectros até b7, onde o espectro, então, difere pela estrutura de carboidrato O-ligado listada acima de cada série. A série de íons y' é idêntica para todos os espectros até y19, onde o espectro, então, difere pela estrutura de carboidrato O-ligado listada acima de cada
- 10 série.

Tabela 5: Fragmentos de glicopeptídeo O-ligado com os números de seqüência correspondentes, seqüências de aminoácido e massas teóricas

Enzima	Fragmento de enzima	Fragmento de seqüência	Seqüência de aminoácido (SEQ ID NO: 2)	Massa não modificada
Tripsina	T9	159-184	THTSPPSPAPELLGGSSV-FLFPPKPK	2688,44
AspN	D8	150-156	DQEPKSS	790,36
Tryp/ chrmo	N/A	159-171	THTSPPSPAPELL	1345,7

As estruturas O-ligadas de carboidrato em Ser¹⁶⁵ representam uma população heterogênea de três espécies principais. Na FIG. 19, o glicopeptídeo T9 é observado no espectro com desconvolução. Há um pico de base a 2689,2 amu, o qual está em concordância com a massa teórica para esse peptídeo, 2689,11 amu. O espectro ilustra três principais estruturas O-ligadas. O espectro ilustra o peptídeo de base com um *ladder* de açúcar consistente com a estrutura O-ligada (GalNAc)₁ (Gal)₁ (NeuAc)₁. A porção ampliada em negrito do espectro foi intensificada 10 vezes e identifica duas estruturas O-ligadas adicionais consistentes com (GalNAc)₁ (Gal)₁ (NeuAc)₂ e (GalNAc)₁ (GlcNAc)₁ (Gal)₂ (NeuAc)₂.

Espectrometria de massa foi usada para avaliar a abundância relativa de cada espécie O-ligada. Na FIG. 19, a glicana (GalNAc)₁ (Gal)₁ (NeuAc)₁ é observada em uma proporção de 10:1 com a glicana (GalNAc)₁ (Gal)₁ (NeuAc)₂ e em uma proporção de 30:1 com a glicana (GalNAc)₁ (GlcNAc)₁ (Gal)₂ (NeuAc)₂. Em uma modalidade, portanto, a invenção proporciona uma população compreendendo moléculas de CTLA4-Ig que têm uma proporção de 10:1 de glicana (GalNAc)₁ (Gal)₁ (NeuAc)₁ para glicana (GalNAc)₁ (Gal)₁ (NeuAc)₂. Em outra modalidade, a invenção proporciona uma população compreendendo moléculas de CTLA4-Ig que têm uma proporção de 30:1 de glicana (GalNAc)₁ (Gal)₁ (NeuAc)₁ para glicana (GalNAc)₁ (GlcNAc)₁ (Gal)₂ (NeuAc)₂. A glicana (GalNAc)₁ (Gal)₁ (NeuAc)₂ é observada em uma proporção de 20:1 com a glicana (HexNAc)₂ (Gal)₂ (NeuAc)₂. Em outra modalidade, a invenção proporciona uma população compreendendo moléculas de CTLA4-Ig que têm uma proporção de 20:1 da glicana (GalNAc)₁ (Gal)₁ (Neu-

Ac)₂ para glicana (HexNAc)₂ (Gal)₂ (NeuAc)₂. Em outra modalidade, a invenção proporciona uma população de moléculas de CTLA4-Ig que compreendem todas as referidas proporções nesse parágrafo. Além disso, um espectro por eletropulverização de íons negativa confirma essas três estruturas predominantes; a abundância relativa de cada uma é mostrada na FIG. 9.

Com relação à moléculas de CTLA4-Ig compreendendo monômeros de SEQ ID NO: 2, além do sítio Ser¹⁶⁵, um segundo sítio de O-ligação é observado em Ser¹⁵⁵ ou Ser¹⁵⁶. Esse sítio é referido como Ser^{155/156}. O peptídeo D8 contendo Ser^{155/156} foi gerado a partir de uma digestão com AspN e corresponde aos aminoácidos 150-156 de SEQ ID NO: 2. O peptídeo é separado e detectado através de LC/MS. O espectro (não mostrado aqui) para o glicopeptídeo O-ligado D8 mostra um pico de base de 790,2 amu que está em concordância com a massa teórica de 790,8 amu. O espectro ilustra o íon de peptídeo e uma série de íons os quais são consistentes com a estrutura (GalNAc)₁ (Gal)₁ (NeuAc)₁. O peptídeo é predominantemente não-glicosilado; a espécie glicosilada (GalNAc)₁ (Gal)₁ (NeuAc)₁ constitui aproximadamente 22% da área de pico.

As estruturas de oligossacarídeo O-ligado da CTLA4-Ig com cadeia simples foram caracterizadas usando uma série de técnicas de espectrometria de massa ortogonal. Essas técnicas incluem clivagens com endopeptidase com análise por LC/MS dos dois sítios de glicosilação O-ligada predominantes com o uso de ionização por eletropulverização para determinar as estruturas predominantes em cada sítio de O-ligação. Esses dados são resumidos na FIG. 20. Podem existir quatro estruturas O-ligadas predominantes: (GalNAc)₁(Gal)₁(NeuAc)₁; (GalNAc)₁(Gal)₁ (NeuAc)₂; (HexNAc)₂(Gal)₂(NeuAc)₂; (HexNAc)₂(Gal)₂(NeuAc)₃. Essas estruturas são detectadas em diferentes quantidades sobre cada sítio. Mais de 95% da CTLA4-Ig com cadeia simples têm pelo menos (HexNAc)₂ (Gal)₂ (NeuAc)₂.

Outro ensaio foi desenvolvido para confirmar os carboidratos O-ligados e buscar estruturas menos prevalentes. Essa técnica utilizou codigestão com tripsina e quimiotripsina para produzir um peptídeo confirmado através de MS/MS como sendo THTSPSPPELL (aminoácidos 159-171 de

SEQ ID NO: 2). Esse peptídeo permitiu a identificação de uma espécie O-
ligada mono-sialilada, duas di-sialiladas e uma tri-sialilada. Uma estrutura
definitiva não foi elucidada para as espécies tri-sialiladas, contudo, duas
possibilidades são propostas: um peptídeo contendo uma estrutura com 2
5 núcleos com 3 ácidos siálicos ou duas estruturas com 1 núcleo presentes
sobre dois resíduos de aminoácido diferentes.

Uma técnica complementar, análise intacta através de MS, foi
usada para confirmar a presença de glicosilações O-ligadas heterogêneas
de moléculas de CTLA4-Ig. Dímeros de CTLA4-Ig e CTLA4-Ig de cadeia
10 simples foram tratados com PNGase F para remover os oligossacarídeos N-
ligados. A molécula foi, então, detectada através do espectrômetro de massa
e os íons correspondentes foram submetidos à desconvolução no espectro.
No material com cadeia simples, a composição de glicana predominante é
15 (HexNAc)₂(Hex)₂(NeuAc)₂, enquanto que a referência é predominantemen-
te (HexNAc)₁(Hex)₁(NeuAc)₁. As composições de glicosilação estão em
concordância com aquelas observadas durante a análise de peptídeo por
LC/MS. Além de uma alteração na glicosilação O-ligada sobre o padrão,
uma segunda modificação principal foi observada. Um desvio de massa de
20 113 ± 4 u é observado entre as espécies não-reduzidas com cadeia simples
e o padrão de CTLA4Ig reduzido. O desvio de massa de 113 ± 4 u desapa-
receu quando de redução com DTT. No material dimérico, o envoltório de
íons resultante foi submetido à desconvolução em um espectro (não mostra-
do aqui) com um pico principal a 79944 amu, o qual corresponde à presença
de duas estruturas (GalNAc)₁ (Gal)₁ (NeuAc)₁. O próximo maior pico, a
25 80600 amu, corresponde à três estruturas O-ligadas ou uma combinação de
no máximo uma estrutura O-ligada ramificada. O terceiro maior pico corres-
ponde à quatro estruturas O-ligadas ou uma combinação contendo no má-
ximo duas estruturas O-ligadas ramificadas.

Determinação do teor de ácido siálico

30 Outro aspecto de caracterização de glicoproteína é determina-
ção de ácido siálico. O teor de ácido siálico pode ser uma assinatura carac-
terística da glicoproteína. O teor de ácido siálico de uma glicoproteína da

presente invenção pode ser avaliado através de métodos convencionais. Por exemplo, ácido siálico pode ser separadamente determinado através de um método colorimétrico direto (Yao e colaboradores, 1989, Anal. Biochem., 179: 332-335), usando pelo menos amostras em triplicata. Outro método de determinação de ácido siálico envolve o uso de ácido tiobarbúrico (TBA), conforme descrito por Warren e colaboradores, 1959, J. Biol. Chem., 234: 1971-1975. Ainda outro método envolve cromatografia de elevado desempenho, conforme descrito por H. K. Ogawa e colaboradores, 1993, J. Chromatography, 612: 145-149.

10 Em uma modalidade, um método para determinar a quantidade de ácido N-Acetil Neuramínico (NANA) e ácido N-Glicolil Neuramínico (NGNA) é através de tratamento por hidrólise ácida da glicoproteína de interesse (por exemplo, veja Exemplo 3). Nesse método, NANA e NGNA são clivados da proteína através de hidrólise ácida. Em uma modalidade, a glicoproteína
15 é substancialmente purificada através de métodos adequados para sua purificação. O NANA e NGNA liberados são separados através de HPLC sobre uma coluna Rezex Monosacharide RHM e detectados através de absorvância de UV (206 nm). NANA e NGNA são quantificados baseado nos fatores de resposta de padrões de NANA e NGNA concorrentemente operados. Os
20 resultados podem ser reportados como proporções molares (MR) de NANA e NGNA respectivamente, para proteína.

A finalidade do método de medição do teor de ácido siálico por hidrólise ácida é medir a quantidade total de ácido siálico (NANA e NGNA) para proteína em amostras de CTLA4-Ig ou CTLA4^{A29YL104E}-Ig (proporções
25 molares). É importante notar, contudo, que essas proporções molares de ácido siálico incluem NANA e NGNA livre e ligado. Os resultados da proporção molar são obtidos baseado na comparação da área de pico de NANA e NGNA de amostras de CTLA4-Ig ou CTLA4^{A29YL104E}-Ig hidrolisadas versus padrões de NANA e NGNA. Padrões de NANA e NGNA hidrolisados tam-
30 bém podem ser usados.

Por exemplo, proporções molares foram obtidas para moléculas de CTLA4-Ig tendo a seqüência de aminoácido SEQ ID NO: 2. Sem hidróli-

se, o pico de interesse em cromatogramas de padrões de NANA e NGNA aparece como um único pico. Quando o padrão de NANA e amostras de CTLA4-Ig são hidrolisados, os cromatogramas resultantes mostram NANA como um pico principal, seguido intimamente por um pequeno pico extra (<10% da principal área de pico; referido como "NANA degradado"); a mesma concentração de padrões de NANA com e sem hidrólise resultou em áreas de pico muito próximas, incluindo o degradante. Nenhum pico é claramente observado nos cromatogramas para as espécies de NGNA degradadas, enquanto que as contagens de área do pico de NGNA em um padrão de NGNA hidrolisado foram observadas como diminuindo aproximadamente 8 - 9%. Experimentos de espectrometria de massa (MS) demonstraram que o "degradante NANA" em um padrão de NANA hidrolisado e nas amostras de CTLA4-Ig hidrolisadas resultam de perda de 18 Dáltons (água) do NANA. Portanto, o método inclui, apropriadamente, o pequeno pico extra na integração do pico de NANA em CTLA4-Ig hidrolisada. Foi também demonstrado, através de experimentos de MS, que o NGNA degrada quando de hidrólise, com uma perda de 18 Dáltons. O degradante NGNA eluído entre NANA e o degradante NANA, de modo que UV não pode detectá-lo. No material de CTLA4-Ig, o teor de NGNA é de aproximadamente 5% do teor de NANA e, como um resultado, co-eluição do degradante NGNA causa menos de 0,5% de alteração na área de pico de NANA, o que está dentro da faixa de variabilidade da área de pico de NANA. O método não pode incluir a área do NGNA degradado no resultado de NGNA; portanto, o resultado de NGNA pode ser baixo em < 10%, também dentro da variabilidade do método.

Em virtude de se acreditar que o NGNA é mais imunogênico do que o NANA, há uma preferência clínica por um produto terapêutico recombinante que contém uma baixa proporção molar de NGNA. Em uma modalidade da invenção, a preponderância de ácido siálico em uma população de moléculas de CTLA4-Ig é NANA e não NGNA em que, nessa população, a proporção molar de moles de ácido siálico por mol de moléculas ou dímeros de CTLA4-Ig é de cerca de 5 a cerca de 18. Em outra modalidade, a preponderância de ácido siálico em uma população de moléculas de C-

CTLA4^{A29YL104E}-Ig é NANA e não NGNA em que, nessa população, a proporção molar de moles de ácido siálico por mol de moléculas ou dímeros de CTLA4^{A29YL104E}-Ig é de cerca de 5,5 a cerca de 8,5.

Cassetes de expressão de CTLA4-Ig e CTLA4^{A29YL104E}-Ig

- 5 A invenção proporciona um ácido nucleico que codifica uma molécula de CTLA4-Ig, o qual é um cassete de expressão em uma modalidade. A invenção também proporciona um ácido nucleico que codifica uma molécula de CTLA4^{A29YL104E}-Ig. Em uma modalidade, o ácido nucleico que codifica a molécula de CTLA4-Ig está contido dentro de um cassete de expressão.
- 10 Em outra modalidade, o ácido nucleico que codifica a molécula de CTLA4-Ig está contido dentro de um cassete de expressão derivado de um plasmídeo tendo a seqüência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 17. Em uma outra modalidades, o ácido nucleico que codifica a molécula de CTLA4^{A29YL104E}-Ig está contido dentro de um cassete de expressão. Em determinadas modalidades,
- 15 o ácido nucleico que codifica a molécula de CTLA4^{A29YL104E}-Ig está contido dentro de um cassete de expressão derivado de um plasmídeo depositado como No. de Acesso ATCC PTA-2104.

- Os ácidos nucleicos da invenção podem ser uma molécula de ácido nucleico de CDNA, cDNA-semelhante, DNA ou RNA de interesse em
- 20 um formato passível de expressão, tal como um cassete de expressão, o qual pode ser expresso a partir do promotor natural ou derivado do mesmo ou um promotor totalmente heterólogo. Alternativamente, o ácido nucleico de interesse pode codificar um RNA anti-senso. O ácido nucleico de interesse pode codificar uma proteína (por exemplo, uma glicoproteína, tal como uma
- 25 glicoproteína de CTLA4-Ig ou CTLA4^{A29YL104E}-Ig) e pode ou não incluir íntrons.

- Em uma modalidade, o ácido nucleico que codifica a peptídeo tendo atividade de CTLA4 pode ser obtido de DNA genômico de células T ou de mRNA presente em linfócitos T ativados. Em outra modalidade, o ácido
- 30 nucleico que codifica a CTLA4^{A29YL104E}-Ig também pode ser obtido de DNA genômico de células T ou de mRNA presente em linfócitos T ativados. Em outra modalidade da invenção, o gene que codifica uma proteína de interes-

se, por exemplo CTLA4 ou CTLA4^{A29YL104E}-Ig, pode ser clonado de uma biblioteca genômica ou ao cDNA de acordo com protocolos padrões que aqueles habilitados na técnica praticam. O cDNA, por exemplo, que codifica CTLA4 ou CTLA4^{A29YL104E}-Ig, pode ser obtido através de isolamento de mRNA total de uma linhagem de célula adequada. Usando métodos conhecidos na técnica, cDNAs fita dupla podem ser preparados a partir de mRNA total e subsequentemente podem ser inseridos em um vetor de bacteriófago ou plasmídeo adequado. Genes podem também ser clonados usando métodos de PCR bem estabelecidos na técnica. Em uma modalidade, um gene que codifica CTLA4 ou CTLA4^{A29YL104E}-Ig pode ser clonado via PCR de acordo com a informação de seqüência de nucleotídeo proporcionada pela presente invenção.

Em outra modalidade, um vetor de DNA contendo o cDNA de CTLA4 ou CTLA4^{A29YL104E}-Ig pode atuar como um *template* em reações de PCR em que primers de oligonucleotídeo projetados para amplificar uma região de interesse podem ser usados para obter um fragmento de DNA isolado abrangendo essa região. Em uma modalidade particular da invenção, a região de interesse objetivada no cDNA de CTLA4 pode ser o domínio extracelular de CTLA4, incluindo o domínio extracelular de CTLA4 humana. Em determinadas modalidades, a região de interesse objetivada em um cDNA de CTLA4^{A29YL104E}-Ig pode ser o domínio extracelular de CTLA4 com alterações de aminoácido nas posições de aminoácido 55 e 130 de SEQ ID NO: 2 (por exemplo, veja SEQ ID NO: 18), incluindo o domínio extracelular de CTLA4 humana abrangendo as alterações de aminoácido descritas acima.

Para expressar uma proteína de fusão no contexto da presente invenção, a fusão de gene quimérico em uma modalidade (por exemplo, um gene que codifica uma proteína de fusão de CTLA4-imunoglobulina (CTLA4-Ig) ou proteína de fusão CTLA4^{A29YL104E}-Ig) inclui uma seqüência de nucleotídeo, a qual codifica a seqüência sinalizadora pelo que, quando de transcrição e tradução do gene quimérico, direciona a proteína de fusão recentemente sintetizadas para secreção. Em uma modalidade, uma seqüência sinalizadora de CTLA4 nativa (por exemplo, a seqüência sinalizadora de C-

TLA4 humana descrita em Harper, K. e colaboradores (1991, J. Immunol. 147,1037-1044) pode ser usada. Em uma modalidade alternativa da invenção, uma seqüência sinalizadora heteróloga pode ser usada para dirigir a secreção de CTLA4-Ig ou CTLA4^{A29YL104E}-Ig (por exemplo, a seqüência sinalizadora de oncostatina-M (Malik N., e colaboradores, 1989, Mol Cell Biol 9(7), 2847-2853) ou uma seqüência sinalizadora de imunoglobulina). Aqueles habilitados na técnica compreenderão que a seqüência de nucleotídeo correspondendo à seqüência sinalizadora pode ser inserida na fusão de gene quimérico através de técnicas de DNA recombinante padrões, tal como realizando uma ligação em-rede da seqüência sinalizadora na extremidade 5' de uma seqüência de ácido nucleico que codifica CTLA4.

Sob as condições do Tratado de Budapeste, DNA que codifica a seqüência de aminoácido correspondendo a uma proteína de fusão de CTLA4-Ig foi depositado na American Type Culture Collection (ATCC), 10801 University Blvd., Manassas, VA, 20110, em 31 de Maio de 1991. A ele foi atribuído No. de Acesso ATCC 68629. Adicionalmente, um plasmídeo de expressão compreendendo uma seqüência de ácido nucleico que codifica a seqüência de aminoácido correspondendo a uma CTLA4^{A29YL104E}-Ig foi depositado sob as condições do Tratado de Budapeste em 19 de Junho de 2000 na ATCC. Ao plasmídeo depositado foi atribuído o No. de Acesso ATCC PTA-2104. O plasmídeo depositado é também referido como pD16 LEA29Y e pD16 L104EA29Y. CTLA4^{A29YL104E}-Igs são ainda descritas na Patente U.S. No. 7.094.874 e Pedidos de Patente U.S. co-pendentes Nos. 09/579.927, 60/287.576 e 60/214.065 e Na Publicação de Patente Internacional No. WO 01/923337 A2, todos os quais são incorporados por referência ao presente pedido em suas totalidades.

Um vetor de expressão da invenção pode ser usado para transfectar células, eucariotas (por exemplo, células de levedo, de mamífero ou inseto) ou procariotas, de forma a produzir proteínas (por exemplo, proteínas de fusão, tais como moléculas de CTLA4-Ig, CTLA4^{A29YL104E}-Ig e semelhantes) codificadas por seqüências de nucleotídeo do vetor. Aqueles habilitados na técnica compreenderão que a expressão de produtos de proteína deseja-

dos em procariotas é mais freqüentemente realizada em *E. coli* com vetores que contêm promotores constitutivos ou induzíveis. Alguns vetores de expressão de *E. coli* (também conhecidos na técnica como vetores de fusão) são projetados para adicionar uma série de resíduos de aminoácido, usualmente ao N-término da proteína recombinante expressa. Os referidos vetores de fusão podem servir a três funções: 1) aumentar a solubilidade da proteína recombinante desejada; 2) aumentar a expressão da proteína recombinante de interesse; e 3) auxiliar na purificação da proteína recombinante atuando como um ligante em purificação por afinidade. Alguns exemplos de vetores de expressão de fusão incluem, mas não estão limitados a: a) pGEX (Amrad Corp., Melbourne, Austrália), o qual funde S-transferase de glutatona à proteína desejada; b) pcDNA™3,1/V5-His A B & C (Invitrogen Corp, Carlsbad, CA), o qual funde 6x-His a uma proteína recombinante de interesse; e c) pMAL (New England Biolabs, Beverly, Mass.), o qual funde proteína de ligação à maltose E à proteína recombinante alvo.

As células adequadas para cultura de acordo com os processos e métodos da presente invenção podem abrigar vetores de expressão introduzidos (estruturas), tais como plasmídeos e semelhantes. As estruturas de vetor de expressão podem ser introduzidas via transfecção, lipofecção, transformação, injeção, eletroporação ou infecção. Os vetores de expressão podem conter seqüências de codificação ou porções das mesmas, que codificam as proteínas para expressão e produção em um processo de cultura. Tais vetores de expressão podem incluir os componentes requeridos para a transcrição e tradução da seqüência de codificação inserida. Vetores de expressão contendo seqüências que codificam as proteínas e polipeptídeos produzidos, bem como os elementos de controle de transcrição e tradução apropriados, podem ser gerados usando métodos bem conhecidos e praticados por aqueles habilitados na técnica. Esses métodos incluem técnicas de DNA recombinante *in vitro*, técnicas sintéticas e recombinação genética *in vivo*, os quais são descritos em J. Sambrook e colaboradores, 1989, Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Plainview, N.Y. e em F. M. Ausubel e colaboradores, 1989, Current Protocols in Molecular

Biology, John Wiley & Sons, New York, N.Y.

Um marcador selecionável pode ser usado em um vetor de expressão recombinante (por exemplo, um plasmídeo), em que o vetor é esta-
velmente integrado no genoma da célula, para conferir resistência à células
5 abrigoando o vetor. Isso permite sua seleção em um meio de seleção apropri-
ado. Uma série de sistemas de seleção podem ser usados incluindo, mas
não limitado a, os genes de fosforibosil transferase de hipoxantina-guanina
(HGPRT), a quinase de timidina do Vírus do Herpes Simplex (HSV TK) (Wi-
gler e colaboradores, 1977, Cell, 11: 223), (Szybalska e Szybalski, 1992,
10 Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 48: 202) e fosforibosil transferase de adenina
(APRT) (Lowy e colaboradores, 1980, Cell, 22: 817), os quais podem ser
empregados em células *hgprt*-, *tk*- ou *aprt*-, respectivamente.

Os seguintes Exemplos não limitativos de genes marcadores, os
quais podem estar contidos dentro de um vetor de expressão, podem tam-
15 bém ser usados como a base de seleção para resistência anti-metabólito:
gpt, o qual confere resistência ao ácido micofenólico (Mulligan e Berg, 1981,
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78: 2072); *dhfr*, o qual confere resistência ao me-
totrexato (Wigler e colaboradores, 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77: 357;
e O'Hare e colaboradores, 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78: 1527); *hy-*
20 *gro*, o qual confere resistência à higromicina (Santerre e colaboradores,
1984, Gene, 30: 147); e *neo*, o qual confere resistência ao aminoglicosídeo
G418 (Clinical Pharmacy, 12: 488-505; Wu e Wu, 1991, Biotherapy, 3: 87-95;
Tolstoshev, 1993, Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol., 32: 573-596; Mulligan,
1993, Science, 260: 926-932; Anderson, 1993, Ann. Rev. Biochem., 62: 191-
25 21; Maio de 1993, TIB Tech, 11 (5): 155-215). Métodos de DNA recombinan-
te comumente conhecidos na técnica podem ser rotineiramente aplicados
para escolher os clones de célula recombinante desejados. Tais métodos
são descritos, por exemplo, em Ausubel e colaboradores (eds.), Current Pro-
ocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY (1993); Kriegler, 1990,
30 Gene Transfection and Expression. A Laboratory Manual, Stockton Press,
NY; nos Capítulos 12 e 13, Dracopoli e colaboradores (eds), Current Proto-
cols in Human Genetics, John Wiley & Sons, NY (1994); Colberre-Garapin e

colaboradores, 1981, J. Mol. Biol., 150: 1, os quais são incorporados por referência aqui em suas totalidades.

Os níveis de expressão de uma molécula de proteína expressa podem ser aumentados via amplificação do vetor de expressão (para uma
5 revisão, veja Bebbington e Hentschel, "The use of vectors based on gene amplification for the expression of cloned genes in mammalian cells in DNA cloning", Vol. 3, Academic Press, New York, 1987). Um aumento no nível de um inibidor presente na meio de cultura de uma célula hospedeira aumentará o número de cópias do gene marcador quando um marcador no sistema
10 de vetor de expressão expressando uma proteína de interesse é amplificável. Uma vez que a região amplificada está associada a um gene que codifica proteína, produção de proteína aumentará concomitantemente (Crousar e colaboradores, 1983, Mol. Cell. Biol., 3: 257). Vetores que abrigam as seqüências de ácido nucleico que codificam os marcadores selecionáveis sintase de glutamina (GS) ou reductase de dihidrofolato (DHFR) podem ser
15 amplificados na presença das drogas sulfoximina de metionina ou metotrexato, respectivamente. Uma vantagem de tais vetores é a disponibilidade de linhagens de células, por exemplo, a linhagem de células de mieloma de murino, a linhagem de células NSO e de Ovário de Hâmster Chinês, CHO,
20 DG44, as quais são negativas para sintase de glutamina e negativas para reductase de dihidrofolato, respectivamente.

Em uma modalidade da presente invenção, uma seqüência de ácido nucleico que codifica uma CTLA4 solúvel ou molécula de proteína de fusão CTLA4^{A29YL104E}-Ig pode ser inserida em um vetor de expressão projetado para expressão de seqüências estranhas em um hospedeiro eucariota.
25 Os componentes regulatórios do vetor podem variar de acordo com o hospedeiro eucariota escolhido para uso. Vetores usados para expressar CTLA4 solúvel ou CTLA4^{A29YL104E}-Ig em células hospedeiras eucariotas podem incluir seqüências intensificadoras para otimização de expressão de proteína.

30 Células de mamífero (tais como células BHK, células VERO, células CHO e semelhantes) podem abrigar um vetor de expressão (por exemplo, um que contém um gene que codifica as proteínas de fusão de CTLA4-

Ig ou a proteína de fusão CTLA4^{A29YL104E}-Ig) via introdução do vetor de expressão em uma célula hospedeira apropriada. Conseqüentemente, a invenção abrange vetores de expressão contendo uma seqüência de ácido nucleico que codificá uma CTLA4-Ig ou proteína de fusão CTLA4^{A29YL104E}-Ig e abrange células hospedeiras nas quais tais vetores de expressão podem ser introduzidos via métodos conhecidos na técnica. Conforme descrito aqui, um vetor de expressão da invenção pode incluir seqüências de nucleotídeo que codificam uma CTLA4-Ig ou proteína de fusão CTLA4^{A29YL104E}-Ig ligada a pelo menos uma seqüência regulatória de uma maneira que permita a expressão da seqüência de nucleotídeo em uma célula hospedeira. Para aqueles habilitados na técnica, seqüências regulatórias são bem conhecidas e podem ser selecionadas para dirigir a expressão de uma proteína de interesse em uma célula hospedeira apropriada, conforme descrito em Goeddel, Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, Calif. (1990). Seqüências regulatórias podem compreender o seguinte: intensificadores, promotores, sinais de poliadenilação e outros elementos de controle de expressão. Os praticantes na técnica compreenderão que o design de um vetor de expressão pode depender de fatores tais como a escolha da célula hospedeira a ser transfectada e/ou o tipo e/ou a quantidade desejada de proteína a ser expressa.

Plasmídeos de clonagem e expressão (por exemplo, pcSD e piLN) são construídos conforme descrito no Exemplo 11. Em uma modalidade da presente invenção, um fragmento de DNA isolado do plasmídeo pSV2*dhfr* é ligado à parte principal do vetor pcDNA3, gerando o vetor de expressão pcSD. O vetor pcSD é compreendido das seguintes características: um promotor de citomegalovírus (CMV), seguido por um sítio de clonagem múltipla (MCS); um sinal de poliadenilação de hormônio de crescimento bovino (BGH) e uma seqüência de término de transcrição; uma seqüência de cDNA de *dhfr* de camundongo para seleção e amplificação; um gene de resistência à ampicilina; e uma origem de replicação pUC para seleção e manutenção em *Escherichia coli*. O vetor piLN é construído contendo cDNAs que codificam porções da seqüência de aminoácido correspondendo a um

fragmento do domínio extracelular do receptor de CTLA4 humana, Exemplo 11, onde o cDNA que codifica uma primeira seqüência de aminoácido é unido ao DNA que codifica uma segunda seqüência de aminoácido, a qual corresponde a uma região de IgC que permite a expressão do gene do receptor de CTLA4 através de alteração da solubilidade da proteína de CTLA4 expressa (veja FIG. 1 e breve descrição para FIG. 1 para resíduos correspondendo à porção extracelular de CTLA4 e região constante de IgG1). Em uma modalidade, uma seqüência de peptídeo sinalizador de oncostatina M pode ser fundida a uma seqüência de aminoácido correspondendo ao domínio extracelular de CTLA4, o qual é subsequente fundido a uma segunda seqüência de aminoácido correspondendo a um domínio de Ig (por exemplo, o domínio IgC_{γ1} humano) conforme previamente descrito na FIG. 1. A seqüência sinalizadora de oncostatina M permite que formas solúveis do gene de produto de proteína de CTLA4 (por exemplo CTLA4-Ig) sejam geradas.

Para construir um vetor de expressão pcSD contendo um gene que codifica a proteína de fusão de CTLA4-imunoglobulina, métodos conhecidos na técnica (por exemplo, sub-clonagem em sítio de restrição) podem ser usados. O material de iniciação para uma modalidade da invenção pode ser um fragmento de DNA digerido e excisado do vetor de clonagem pILN descrito no Exemplo 11. Em outra modalidade, o fragmento de DNA excisado do referido vetor contém a anti-senso de aminoácido da seqüência sinalizadora de oncostatina M e a proteína de fusão de CTLA4, em que o referido fragmento de DNA é ligado ao vetor pcSD digerido. O fragmento de DNA de oncostatina M-CTLA4-Ig pode ser inserido entre o promotor de CMV e uma cassete contendo o sinal de poliadenilação de BGH e uma seqüência de término de transcrição. Isso colocaria um produto genético de CTLA4 sob o controle do promotor de CMV no plasmídeo designado pcSDhuCTLA4-Ig (FIG. 21; SEQ ID NO: 17).

Adicionalmente, plasmídeos de expressão e clonagem (por exemplo, pD16LEA29Y) podem ser derivados do plasmídeo pcDNA3 da Invitrogen, Vetor pD16LEA29Y (FIG. 22) compreende as seguintes características: o gene de resistência à neomicina do pcDNA3 foi substituído pelo gene

de reductase de dihidrofolato de murino (DHFR) sob o controle do promotor SV40 sem intensificador (enfraquecido); o gene que codifica uma CTLA4^{A29YL104E}-Ig é expresso a partir do promotor de CMV e o sinal de polia-

5 denilação é do gene do hormônio de crescimento bovino; o cassete de expressão para o gene de interesse é flanqueado por seqüências de término de transcrição, isto é, 5' ao promotor e 3' ao sítio poli A; os vetores contêm dois poliligantes de sítio de restrição distintos, um 3' ao promotor para clonagem do gene de interesse e um 5' ao promotor para linearização do vetor antes de transfecção; o vetor contém um gene de resistência à ampicilina e

10 a origem de replicação *ColE1* para propagação de plasmídeo em *E. coli*; a seqüência de CTLA4^{A29YL104E}-Ig (SEQ ID NO: 3) é precedida pelo peptídeo sinalizador de oncostatina M e montado no vetor de expressão conhecido como vetor pD16LEA29Y.

O vetor é construído contendo cDNAs que codificam porções da

15 seqüência de aminoácido correspondendo a um fragmento do domínio extracelular do receptor de CTLA4 humano (SEQ ID NO: 2), em que o aminoácido Ala na posição 55 é substituído pelo aminoácido Tyr e o aminoácido Leu na posição 130 é substituído pelo aminoácido Glu (FIG. 3). Essas alterações de aminoácido são representadas na seqüência de aminoácido C-

20 TLA4^{A29YL104E}-Ig tendo SEQ ID NO: 4. O cDNA que codifica uma primeira seqüência de aminoácido (por exemplo, a seqüência que codifica a CTLA4^{A29YL104E}-Ig) é unido ao DNA que codifica uma segunda seqüência de aminoácido, a qual corresponde a uma região de IgC que permite a expressão do gene do receptor de CTLA4^{A29YL104E}-Ig alterando a solubilidade da

25 proteína de CTLA4^{A29YL104E}-Ig expressa (veja FIG. 3 e a breve descrição para a FIG. 3 para resíduos correspondendo à porção extracelular de CTLA4 modificada e a região constante de IgG1) tendo SEQ ID NO: 3.

Em uma modalidade, uma seqüência de peptídeo sinalizador de oncostatina M pode ser fundida a uma seqüência de aminoácido correspondendo ao domínio extracelular de CTLA4 o qual, subseqüentemente, é fundido a uma segunda seqüência de aminoácido correspondendo a um domínio de ingrediente (por exemplo, o domínio IgC_{γ1} humano) conforme previa-

30

mente descrito na FIG. 3. A seqüência sinalizadora de oncostatina M permite que formas solúveis do produto de proteína do gene de CTLA4 (por exemplo, uma CTLA4^{A29YL104E}-Ig) sejam geradas.

Transfecção Estável para Gerar Linhagem de Célula

5 Vetores que contêm DNA que codifica uma proteína de interesse (por exemplo, estruturas de fusão, glicoproteínas e semelhantes) podem ser transformados em células hospedeiras adequadas (por exemplo, células bacterianas) de forma a produzir grandes quantidades de DNA clonado. Alguns exemplos não limitativos de células bacterianas para transformação
10 incluem a linhagem de célula bacteriana das cepas DH5 α ou MC1061/p3 de *E. coli* (Invitrogen Corp., San Diego, Calif.), a qual pode ser transformada usando procedimentos padrões praticados na técnica e colônias podem, então, ser selecionadas para a expressão em plasmídeo apropriada.

Vetores de expressão para células eucariotas, tais como células
15 de mamífero, podem incluir promotores e seqüências de controle compatíveis com células de mamífero. Em uma modalidade da invenção, esses elementos regulatórios podem ser, por exemplo, um promotor de CMV encontrado no vetor pcSD ou pD16LEA29Y ou o vírus sarcoma de aves (ASV) localizado no vetor piLN. Outros promotores precoces e tardios comumente
20 usados incluem, mas não estão limitados a, aqueles do Simian Virus 40 (SV 40) (Fiers, e colaboradores, 1973, Nature 273: 113) ou outros promotores virais, tais como aqueles derivados de papiloma bovina, polioma e Adenovírus 2. O promotor regulado hMTII (Karin, e colaboradores, 1982, Nature 299: 797-802) pode também ser usado, além de outros conhecidos na técnica.
25 Para expressão de proteína recombinante, em células de inseto cultivadas (por exemplo, células SF 9), alguns vetores de baculovírus disponíveis incluem a série pVL (Lucklow, V. A. e Summers, M. D., 1989, Virology 170: 31-39) e a série pAc (Smith e colaboradores, 1983, Mol. Cell Biol. 3: 2156-2165). Aqueles habilitados na técnica também compreenderão que regiões
30 intensificadoras (aquelas seqüências encontradas a montante ou a jusante da região promotora em regiões de DNA de não-codificação) são também importantes para otimizar a expressão. Origens de replicação podem ser

empregadas, se necessário, a partir de fontes virais, por exemplo, por exemplo, se utilizando um hospedeiro procariota para introdução do DNA de plasmídeo. Contudo, integração cromossômica é um mecanismo comum para replicação de DNA em organismos eucariotas.

- 5 Embora, em uma modalidade da presente invenção, células hospedeiras de mamífero (tais como células CHO) sejam empregadas para expressão da proteína desejada (por exemplo, proteínas de fusão, glicoproteína e semelhantes), outros organismos eucariotas também podem ser usados como hospedeiros. Cepas de laboratório do levedo de germinação
- 10 *Saccharomyces cerevisiae* (também conhecido como levedo de padaria ou levedo de pão) podem ser usadas, bem como outras cepas de levedo, tais como o levedo de fissão *Schizosaccharomyces pombe*. Vetores de levedo abrigando DNA que codifica uma proteína de interesse (por exemplo, estruturas de fusão, glicoproteínas e semelhantes, tais como CTLA4-Ig ou C-
- 15 TLA4^{A29YL104E}-Ig) podem utilizar a origem de replicação 2 μ de Broach, Meth. Enz. 101: 307 (1983) ou outras origens de replicação compatíveis com levedo (por exemplo, Stinchcomb e colaboradores, 1979, Nature 282: 39; Tschempe e colaboradores, 1980, Gene 10: 157; e Clarke e colaboradores, 1983, Meth. Enz. 101: 300). Um elemento regulatório contido dentro de vetores de levedo pode ser um promotor para síntese de enzimas glicolíticas
- 20 (Hess e colaboradores, 1968, J. Adv. Enzyme Reg. 7: 149; Holland e colaboradores, 1978, Biochemistry 17: 4900).

- Aqueles habilitados na técnica podem também utilizar outros promotores em que as condições de crescimento podem regular a transcri-
- 25 ção do referido gene regulável e podem incluir os seguintes exemplos não limitativos: Isocitocroma C, dehidrogenase 2 de álcool, enzimas responsáveis pela utilização de maltose e galactose, fosfatase ácida e enzimas degradativas associadas ao metabolismo de nitrogênio. Similar aos sistemas de expressão de mamífero, seqüências terminadoras em vetores de expres-
- 30 são de levedo também são desejáveis na extremidade 3' das seqüências de codificação e são encontradas na região não traduzida 3' após a rede de leitura aberta em genes derivados de levedo. Alguns exemplos não limitati-

vos de vetores de levedo adequados para expressão de proteína recombinante em levedo (por exemplo, em *S. cerevisiae*) incluem pMFa (Kurjan e Herskowitz, (1982) Cell 30: 933-943), pJRY88 (Schultz e colaboradores, 1987, Gene 54: 113-123), pYepSec1 (Baldari, e colaboradores, 1987, Embo J. 6: 229-234), pYES2 (Invitrogen Corporação, San Diego, Calif.), bem como aqueles pertencendo à família pRS de vetores de levedo.

Clones, por exemplo, clones bacterianos, os quais contêm DNA que codifica uma proteína de interesse (por exemplo, estruturas de fusão, glicoproteínas e semelhantes) obtidos conforme descrito acima podem, então, ser transfectados em células hospedeiras adequadas, tais como células de mamífero, para expressão do produto desejado. Técnicas de transfecção são realizadas usando técnicas padrões estabelecidas na técnica apropriadas para as referidas células hospedeiras, em que a técnica de transfecção depende da célula hospedeira usada. Por exemplo, transfecção de célula de mamífero pode ser realizada usando lipofecção, fusão de protoplasta, transfecção mediada por DEAE- dextrana, co-precipitação com CaPO_4 , eletroporação, microinjeção direta, bem como outros métodos conhecidos na técnica, os quais podem compreender: raspagem, captação direta, choque osmótico ou com sacarose, fusão de lisozima ou fusão de eritrócito, microinjeção indireta, tal como via técnicas eritrócito-mediadas e/ou submetendo as células hospedeiras à correntes elétricas. Como outras técnicas para a introdução de informação genética em células hospedeiras serão desenvolvidas, a lista acima mencionada de métodos de transfecção não é considerada como sendo exaustiva.

Expressão de DNA que codifica uma proteína de interesse (por exemplo, estruturas de fusão, glicoproteínas e semelhantes) em células hospedeiras eucariotas derivadas de organismos multicelulares (por exemplo, originárias de mamífero) é particularmente utilizada no contexto da presente invenção (Tissue Cultures, Academic Press, Cruz e Patterson, Eds. (1973)). Células hospedeiras derivadas de organismos multicelulares têm a capacidade de realizar *splicing* de íntrons e, assim, podem ser usadas diretamente para expressar fragmentos de DNA genômico. Conforme estabele-

cido anteriormente, linhagens de células hospedeiras úteis incluem, mas não estão limitadas a, Ovário de Hâmsster Chinês (CHO), células BHK, rim de macaco (COS), células VERO e HeLa. Na presente invenção, linhagens de células expressando estavelmente uma proteína de interesse (por exemplo, 5 estruturas de fusão, glicoproteínas e semelhantes) são usadas. Em uma modalidade, a linhagem de célula de mamífero (tal como uma linhagem de célula CHO) é transfectada (por exemplo, através de eletroporação) com um vetor de expressão (por exemplo, pcSDhuCTLA4-Ig, pD16LEA29Y e semelhantes) contendo a Seqüência de DNA que codifica uma glicoproteína de 10 interesse. Em uma modalidade, a glicoproteína de interesse pode ser uma proteína de CTLA4-Ig, incluindo a proteína de CTLA4-Ig tendo uma seqüência de aminoácido contida em SEQ ID NO: 2, codificada por uma porção da seqüência de nucleotídeo em SEQ ID NO: 1. Em outra modalidade, a glicoproteína de interesse pode ser a CTLA4^{A29YL104E}-Ig, incluindo a C- 15 TLA4^{A29YL104E}-Ig tendo uma seqüência de aminoácido contida em SEQ ID NO: 4, codificada por uma porção da seqüência de nucleotídeo em SEQ ID NO: 23.

Uma proteína recombinante, tal como CTLA4-Ig ou C- 20 TLA4^{A29YL104E}-Ig, pode ser expressa em células hospedeiras eucariotas, tais como células de mamífero (por exemplo, células CHO, BHK, VERO ou NS0), células de inseto (por exemplo, usando um vetor de baculovírus) ou células de levedo. Aqueles habilitados na técnica podem usar outras células hospedeiras adequadas, tais como aquelas descritas anteriormente, no contexto da presente invenção. Em uma modalidade, expressão eucariota, ao invés 25 de procariota, de uma proteína de fusão recombinante (tal como CTLA4-Ig ou CTLA4^{A29YL104E}-Ig) é empregada. Expressão de proteínas recombinantes eucariotas, tal como CTLA4-Ig ou CTLA4^{A29YL104E}-Ig humana, em células eucariotas, tais como células CHO, pode levar à glicosilação parcial e/ou completa, bem como à formação de ligações de dissulfeto intra- ou inter- 30 cadeia. Para amplificação transitória e expressão de uma proteína desejada, um vetor abrigando DNA que codifica uma proteína de interesse (por exemplo estruturas de fusão, glicoproteínas e semelhantes, tais como CTLA4-Ig

ou CTLA4^{A29YL104E}-Ig) é distribuída em células eucariotas através de um método de transfecção conhecido na técnica, mas não integrado no genoma da célula. Expressão de genes transfectados pode ser medida dentro de 16-96 horas. Células de mamífero (tais como células COS) podem ser usadas em conjunto com vetores, tal como pCDM8, para expressar transitoriamente uma proteína desejada (Gluzman, Y., 1981, Cell 23: 175-182; Seed, B., 1987, Nature 329: 840).

É compreendido na técnica que, para transfecção estável de células de mamífero, uma pequena fração de células pode integrar o DNA em seus genomas e integração com sucesso pode depender do vetor de expressão e do método de transfecção utilizado. Para amplificação e expressão estável de uma proteína desejada, um vetor abrigando DNA que codifica uma proteína de interesse (estruturas de fusão, glicoproteínas e semelhantes, tais como CTLA4-Ig ou CTLA4^{A29YL104E}-Ig) é estavelmente integrado no genoma de células eucariotas (tais como células de mamífero), resultando na expressão estável de genes transfectados. De forma a identificar e selecionar clones expressando estavelmente um gene que codifica uma proteína de interesse, um gene que codifica um marcador selecionável (por exemplo, resistência a antibióticos) pode ser introduzido nas células hospedeiras junto com o gene de interesse. Marcadores selecionáveis usados por aqueles habilitados na técnica podem ser aqueles que conferem resistência a fármacos, tais como G418 e higromicina. O gene que codifica um marcador selecionável pode ser introduzido em uma célula hospedeira em um plasmídeo distinto ou pode ser introduzido sobre o mesmo plasmídeo que o gene de interesse. Células contendo o gene de interesse podem ser identificadas através de seleção com fármaco, em que células que incorporaram o gene marcador selecionável sobreviverão na presença do referido fármaco, enquanto que células que não incorporaram o gene marcador selecionável morrerão. As células que sobrevivem podem, então, ser selecionadas para a produção da proteína desejada (por exemplo, uma proteína de CTLA4-Ig ou CTLA4^{A29YL104E}-Ig).

Conforme descrito anteriormente, células CHO deficientes quan-

to à expressão do gene de reductase de dihidrofolato (*dhfr*) podem sobreviver apenas com a adição de nucleosídeos. Quando as referidas células são estavelmente transfectadas com um vetor de DNA abrigando o gene *dhfr*, as células são, então, capazes de produzir os nucleosídeos desejados. Usando o *dhfr* como o marcador selecionável, aqueles habilitados na técnica compreenderão que, na presença do anti-metabólito, metotrexato, amplificação de gene *dhfr*, bem como o gene de interesse transfectado (por exemplo, CTLA4-Ig ou CTLA4^{A29YL104E}-Ig) ocorre prontamente. Em uma modalidade da presente invenção, células de mamífero, tais como células CHO *dhfr*-, são transfectadas com um vetor de expressão, tal como pcSDhuCTLA4-Ig (Exemplos 11-13) ou pD16LEA29Y, para gerar uma população de células que pode ser estavelmente amplificada e que pode expressar estavelmente um produto de proteína desejado, (tal como beta polipeptídeos de CTLA4-Ig ou CTLA4^{A29YL104E}-Ig, respectivamente). Em outra modalidade, a linhagem de célula *dhfr*- negativa DG44 (Invitrogen Corp. Carlsbad, CA) pode ser empregada para a transfecção estável. Em outra modalidade da presente invenção, transfecção pode ocorrer via eletroporação.

Conforme é prontamente praticado na técnica, células de mamífero transfectadas (por exemplo, células CHO *dhfr*- negativas) são mantidas em meio não seletivo contendo soro durante 1-2 dias pós transfecção. As células são, então, tratadas com tripsina e recolocadas em meio contendo soro, na presença de uma pressão seletiva (por exemplo, um fármaco tal como metotrexato). As células são cultivadas em meio contendo soro seletivo durante 2-3 semanas, com trocas freqüentes de meio de forma a eliminar resíduos e células mortas, até que colônias distintas possam ser visualizadas. Colônias individuais podem, então, ser tripsinizadas e colocadas em lâminas com múltiplas cavidades para propagação adicional e amplificação na presença de meio seletivo de forma a identificar produtores que expressão um alto nível da proteína desejada (por exemplo, estruturas de fusão, glicoproteínas e semelhantes) via métodos estabelecidos na técnica, tais como ELISAs ou imunoprecipitação. Em uma modalidade da presente invenção, o método descrito acima foi realizado para transfecção de células

CHO *dhfr*-negativas (por exemplo, células DG44) de forma a estabelecer uma linhagem de célula estável expressando uma proteína recombinante de interesse (por exemplo, uma proteína de CTLA4-Ig) (veja, por exemplo, Exemplos 12-13). Em outra modalidade, uma linhagem de célula estável expressando a CTLA4^{A29YL104E}-Ig foi estabelecida (veja Exemplo 23).

Uma linhagem de célula CHO estável da invenção expressa estavelmente moléculas de proteína de CTLA4-Ig como monômeros de CTLA4-Ig tendo a seqüência (i) 26-383 de SEQ ID NO: 2, (ii) 26-382 de SEQ ID NO: 2, (iii) 27-383 de SEQ ID NO: 2, (iv) 27-382 de SEQ ID NO: 2, (v) 25-382 de SEQ ID NO: 2 e (vi) 25-383 de SEQ ID NO: 2. Essa linhagem de célula pode secretar uma população de moléculas de CTLA4-Ig que pode existir como formas multiméricas (tais como, dímeros, tetrâmeros e semelhantes), em que a forma multimérica pode ter diferentes seqüências monoméricas de SEQ ID NO: 2. O cassete de expressão integrado nessa linhagem de célula compreende SEQ ID NO: 1 e está contido dentro do pcSDhuCTLA4-Ig.

A invenção também proporciona uma linhagem de célula CHO estável, a qual expressa estavelmente a CTLA4^{A29YL104E}-Ig. Em uma modalidade, a linhagem de célula expressa monômeros de CTLA4^{A29YL104E}-Ig tendo a seqüência (i) 26-383 de SEQ ID NO: 4, (ii) 26-382 de SEQ ID NO: 4, (iii) 27-383 de SEQ ID NO: 4, (iv) 27-382 de SEQ ID NO: 4, (v) 25-382 de SEQ ID NO: 4 e (vi) 25-383 de SEQ ID NO: 4. Em outra modalidade, a linhagem de célula pode secretar uma população de moléculas de CTLA4^{A29YL104E}-Ig que podem existir como formas multiméricas (tais como dímeros, tetrâmeros e semelhantes), em que a forma multimérica pode ter diferentes seqüências monoméricas de SEQ ID NO: 4. O cassete de expressão integrado nessa linhagem de célula compreende SEQ ID NO: 3 e está contido dentro do pD16LEA29Y.

Subclonagem para Gerar uma População de Células Clonais

Células identificadas como sendo produtores de uma proteína desejada (por exemplo, estruturas de fusão, glicoproteínas e semelhantes) são isoladas de cultura de células e subsequentemente amplificadas sob

condições de produção equivalentes, em que o meio de cultura pode conter soro, métodos de subclonagem conhecidos na técnica tais como, mas não limitado a, clonagem em agar macio, podem ser empregados. Os clones de célula recombinantes estáveis obtidos podem, então, ser ainda multiplicados sob condições isentas de soro e produto animal. De acordo com a presente invenção, um clone de célula estável expressando o produto de proteína desejado (por exemplo, CTLA4-Ig, a CTLA4^{A29YL104E}-Ig e semelhantes) é obtido via obtenção de um clone de célula recombinante de uma cultura de célula que é obtida após cultura de um clone de célula original recombinante em meio contendo soro e re-adaptação das células a um meio isento de soro e produto animal. Em uma modalidade, os clones de célula expressando CTLA4-Ig podem ser continuados a serem cultivados em meio isento de soro e produto animal através de pelo menos 50 gerações. Em outra modalidade da invenção, os clones de célula expressando CTLA4-Ig podem ser continuados a serem cultivados conforme descrito acima através de pelo menos 75 gerações. De acordo com a invenção, os clones de célula também podem ser continuados a serem cultivados em meio isento de soro e produto animal através de pelo menos 100 gerações.

Em uma outra modalidade, clones de célula expressando a CTLA4^{A29YL104E}-Ig podem ser continuados a serem cultivados em meio isento de soro e produto animal através de pelo menos 27 gerações. Em outra modalidade os clones de célula podem ser continuados a serem cultivados em meio isento de soro e produto animal através de pelo menos 25 gerações. Adicionalmente, os clones de célula podem ser continuados a serem cultivados em meio isento de soro e produto animal através de pelo menos 100 gerações.

Em uma modalidade, a invenção proporciona uma linhagem de célula que produz moléculas de CTLA4-Ig compreendendo monômeros de SEQ ID NO: 2, em que a linhagem de célula é estável durante mais de 100 gerações e em que a estabilidade da linhagem de célula compreende: (1) tempo de duplicação na geração 100 é menos de cerca de $24,5 \pm 2,6$ horas; (2) a viabilidade celular na geração 100 é mais de 95%, (3) titulação de pro-

duto para CTLA4-Ig em bio-reatores de 5-L é mais de 1,69 mg/mL na geração 100; (4) proporção molar de ácido siálico para proteína é cerca de 9,3 a cerca de 11,0 na geração 105.

O clone de célula recombinante estável da presente invenção está presente em uma forma isolada, em que isolamento ocorre de acordo com métodos praticados na técnica (por exemplo, clonagem em agar macio ou clonagem por diluição limitada ou semelhante). Na presente invenção, o clone de célula recombinante estável é derivado de uma célula recombinante de mamífero (por exemplo, uma célula CHO) que contém seqüências de DNA que codificam uma proteína recombinante de interesse (por exemplo, estruturas de fusão, glicoproteínas e semelhantes, tais como CTLA4-Ig ou CTLA4^{A29YL104E}-Ig), a qual pode crescer em suspensão ou aderentemente. Uma proteína recombinante expressa pela linhagem de célula da presente invenção pode ser uma glicoproteína terapêutica, tal como CTLA4-Ig ou CTLA4^{A29YL104E}-Ig. De acordo com a presente invenção, clones de célula recombinante estáveis derivados de células eucariotas (tais como de células de mamífero, células CHO, células DG44 ou células CHO *dhfr*-negativas), as quais contêm a Seqüência de DNA que codifica uma glicoproteína recombinante, tal como CTLA4-Ig ou CTLA4^{A29YL104E}-Ig e as quais são capazes de expressar estavelmente a glicoproteína recombinante durante várias gerações são úteis.

Em uma modalidade da invenção, uma população de células hospedeiras de mamífero expressando estavelmente uma proteína de interesse (por exemplo, estruturas de fusão, glicoproteínas e semelhantes, tais como CTLA4-Ig ou CTLA4^{A29YL104E}-Ig) é obtida sob condições isentas de soro e produto animal via amplificação das células estavelmente transfectadas. De acordo com a invenção, um clone de célula recombinante pode, então, ser caracterizado pelo fato de que ele é estável em meio de cultura isento de soro e produto animal através de pelo menos 105 gerações, por exemplo.

Em uma modalidade da invenção, a população de células clonais produz moléculas de CTLA4-Ig. Algumas das características específicas dessa população de moléculas de CTLA4-Ig são listadas abaixo na Tabela

6. Uma população de moléculas de CTLA4-Ig pode pelo menos incluir dímeros de moléculas de CTLA4-Ig que compreendem duas moléculas monoméricas que, cada uma, pode ter uma das seguinte seqüências: (i) 26-383 de SEQ ID NO: 2; (ii) 26-382 de SEQ ID NO: 2, (iii) 27-383 de SEQ ID NO: 2, (iv) 27-382 de SEQ ID NO: 2, (v) 25-382 de SEQ ID NO: 2 e (vi) 25-383 de SEQ ID NO: 2. Assim, a população de moléculas de CTLA4-Ig pode incluir predominantemente homodímeros ou heterodímeros. A população pode incluir homodímeros e heterodímeros. Em uma modalidade, a invenção proporciona uma população de moléculas de CTLA4-Ig tendo as características mostradas na Tabela 6 ou um equivalente farmacêutico das mesmas. Conforme usado aqui, um equivalente farmacêutico é onde uma população de moléculas tem um perfil seguro e eficaz equivalente à população original (população padrão) para tratamento de um paciente, conforme seria compreendido por uma agência governamental, tal como o FDA. Por exemplo, a população de CTLA4-Ig da presente invenção pode ter as características mostradas na Tabela 6. Em outra modalidade, a população de moléculas de CTLA4-Ig da invenção pode ter as características mostradas na Tabela 6 ou equivalentes das mesmas unicamente em qualquer combinação ou permutação das mesmas.

Em outra modalidade, o clone de interesse pode também ser caracterizado de acordo com o produto recombinante expresso e suas características bioquímicas (por exemplo, CTLA4-Ig tendo um valor de coeficiente de extinção em particular). Um valor de coeficiente de extinção (também referido como um valor de capacidade de absorção (a_s)) pode ser derivado teórica ou experimentalmente. A 280 nm, o valor da capacidade de absorção (a_s) de CTLA4-Ig foi determinado como sendo de $1,01 \text{ mL mg}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ usando o método de Mach e colaboradores (Analytical Biochemistry, Vol. 200, páginas 74-80, 1992) conforme detalhado abaixo.

A Equação 1 foi usada para determinar a capacidade de absorção molar (ϵ).

Equação 1: $\epsilon = [(\text{Número de ligações de dissulfeto} \times 134) + (\text{Número de resíduos de Triptofano} \times 5,540) + (\text{Número de resíduos de Tirosina}$

x 1,480)]

CTLA4-Ig tem 9 ligações de dissulfeto, 8 resíduos de triptofano e 32 resíduos de tirosina a fim de proporcionar uma capacidade de absorção molar (ϵ) de $92,886 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, conforme mostrado em Equação 2.

5 **Equação 2:** $\epsilon = (9 \times 134) + (8 \times 5,540) + (32 \times 1,480)] = 92,886 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$

A constante da capacidade de absorção (a_s) foi calculada dividindo a capacidade de absorção molar (ϵ) pelo peso molecular, onde o peso molecular foi determinado através de MALDI-TOF, conforme mostrado na

10 Equação 3.

Equação 3: $a_s = \epsilon / \text{Peso molecular} = 92,886 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1} / 92,278 \text{ Da} = 1,01 \text{ mL mg}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

Uma comparação do valor de capacidade de absorção teoricamente derivado com os valores de capacidade de absorção experimentalmente determinados sobre dois lotes de material de CTLA4-Ig (compreendendo SEQ ID NO: 2) foi realizada usando análise de aminoácido. A constante de capacidade de absorção média calculada experimentalmente determinada é de $1,00 \pm 0,05 \text{ mL mg}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. O valor experimental confirma o valor teórico de $1,01 \text{ mL mg}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ dentro do erro da determinação experimental. Assim, em uma modalidade, a invenção proporciona uma linhagem

15 de célula que produz moléculas de CTLA4-Ig que tem um valor de capacidade de absorção ou coeficiente de extinção de cerca de $1,00 \pm 0,05 \text{ mL mg}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

20

De acordo com presente invenção, o clone recombinante de interesse pode também ser caracterizado de acordo com o número de sítios na seqüência de DNA que codifica uma proteína de interesse (por exemplo, estruturas de fusão, glicoproteínas e semelhantes, tal como CTLA4-Ig) que são integrados no genoma da célula hospedeira. Aqueles habilitados na técnica compreenderão que técnicas padrões de hibridização de Southern permitirão tal análise. Em uma modalidade da invenção, um único fragmento de

25 hibridização de aproximadamente 1,2 kb foi detectado em cada uma das digestões com *EcoRI* e *XbaI* do DNA genômico preparado a partir do clone

30

de célula recombinante da invenção, consistente com o tamanho esperado do gene de CTLA4-Ig (híbrido de Southern; FIG. 23). A representação na figura é consistente com um único sítio de integração do plasmídeo, bem como não havendo inserções ou deleções no gene de CTLA4-Ig sendo detectáveis através de análise por hibridização de Southern.

Em uma modalidade, a invenção proporciona populações de célula CHO capazes de produzir moléculas de CTLA4-Ig, em que cada célula da população compreende pelo menos 30 cópias de um ácido nucleico que codifica uma proteína de CTLA4-Ig, em que as 30 ou mais cópias são integradas aleatoriamente em um único sítio no genoma da célula e em que a população de células é clonal. Em outras modalidades, as populações de célula CHO capazes de produzir moléculas de CTLA4-Ig compreendem uma população em que pelo menos 75%, 80%, 85%, 90%, 95% ou 99% das células nas populações compreendem pelo menos 30 cópias de um ácido nucleico que codifica uma proteína de CTLA4-Ig.

Em outras modalidades, a invenção proporciona uma linhagem de célula que, quando cultivada em condições de acordo com FIG. 10 ou Exemplo 14, produz moléculas de CTLA4-Ig compreendidas de SEQ ID NO: 2 em uma quantidade que é pelo menos 1,0, 1,3, 1,6, 1,8, 2,0 ou 2,5 gramas de moléculas de CTLA4-Ig por litro cultura de células no estágio de produção.

De acordo com a invenção, a linhagem de célula de mamífero (por exemplo, uma linhagem de célula CHO *dhfr* negativa) é gerada, a qual expressa uma proteína desejada (por exemplo, uma proteína de CTLA4-Ig) que, quando crescida em uma cultura suspensa, pode produzir uma população de moléculas que é secretada no sobrenadante de cultura. Essa população de moléculas pode ter, por exemplo, uma ou mais ou todas as seguintes características listadas na Tabela 6.

Tabela 6. Características Ilustrativas de CTLA4-Ig

	Característica	
1	Seqüência N-terminal	aa 26 (Ala) de SEQ ID NO: 2 aa 27 (Met) de SEQ ID NO: 2
2	Seqüência C-terminal	aa 382 (Gly) de SEQ ID NO: 2 aa 383 (Lys) de SEQ ID NO: 2

3	Ligação a B7	70-130%
4	pI	4,3-5,6
5	Proporção de ácido siálico NANA NGNA	≥8,0 moles por mol moléculas de CTLA4-Ig 8,0 – 12,0 moles por mol moléculas de CTLA4-Ig ≤1,5 moles por mol moléculas de CTLA4-Ig
6	dímero	≥95%
7	Espécies HMW (por exemplo, tetrâmero)	≤4,0%
8	Espécies de baixo peso molecular (por exemplo monômero)	≥0,5%
9	Coefficiente de Extinção	1,0±0,05 ml/mg·cm
10	Grupos Sulfidril livres	≤0,24 tióis livres por molécula
11	Composição de Amino Monossacarídeo: GlcNAc	15-35 moles por mol de moléculas de CTLA4-Ig
12	Composição de Amino Monossacarídeo: GalNAc	1,7-8,3 moles por mol de moléculas de CTLA4-Ig
13	Composição de Monossacarídeo neutro: Galactose	8-17 moles por mol de moléculas de CTLA4-Ig
14	Composição de Monossacarídeo neutro: Fucose	3,5- 8,3 moles por mol de moléculas de CTLA4-Ig
15	Composição de Monossacarídeo neutro: Manose	7,7-22 moles por mol de moléculas de CTLA4-Ig

De acordo com a Tabela 6, o percentual de dímero de CTLA4-Ig, percentual de espécies de HMW (por exemplo, multímeros de CTLA4-Ig, tal como um tetrâmero) e percentual de espécies de LMW (por exemplo, monômero de CTLA4-Ig) são com relação a uma população de moléculas de CTLA4-Ig. Os moles de açúcares e os moles de ácido siálico descritos na Tabela 6 são com relação ao mol de moléculas ou dímeros de CTLA4-Ig. O percentual de ligação a B7 encontrado na Tabela 6 é em referência a experimentos de ligação à CTLA4-Ig realizados através de ressonância de plasmônio em superfície (SPR) sobre um instrumento BIAcore descrito anteriormente, em que o percentual é uma comparação da ligação a B7 com um controle de CTLA4-Ig.

Em uma modalidade, a linhagem de célula de mamífero (tal como uma linhagem de célula CHO *dhfr* negativa) gera uma população de moléculas de CTLA4-Ig mostrando atributos característicos números 1-5 da Tabela 6. Em outra modalidade da invenção, a linhagem de célula de mamífero

gera uma população de moléculas de CTLA4-Ig tendo atributos característicos números 1-10 da Tabela 6. Em outras modalidades, a linhagem de célula de mamífero gera uma população de moléculas de CTLA4-Ig mostrando atributos característicos números 1-15 da Tabela 6. Em uma outra modalidade, a quantidade de grupos sulfidríla livres sobre a CTLA4-Ig é cerca de $\leq 0,20$ tióis livres por molécula.

Quando de purificação do sobrenadante de cultura de célula que contém a proteína desejada (por exemplo uma proteína de CTLA4-Ig) secretada por uma população de células de mamífero transfectadas (por exemplo, uma célula CHO *dhfr* negativa), a população de moléculas pode ter outras características. Além daquelas características listadas na Tabela 6, essa população de moléculas pode ter, por exemplo, uma ou mais ou todas as seguintes características: uma faixa de pH de cerca de 7,0 – 8,0; capacidade de inibir a atividade de IL-2 em células humanas em 50 – 150%; proteína quimiotática de monócito (MCP-1) presente no produto purificado final a ≤ 5 ng/mg de dímero de CTLA4-Ig ou moléculas de CTLA4-Ig; concentração de DNA presente no produto purificado final a $\leq 2,5$ pg/mg de dímero de CTLA4-Ig; proteína de célula hospedeira CHO presente no produto purificado final a ≤ 50 ng/mg de dímero de CTLA4-Ig; concentração de Triton X-100 no produto purificado final a $\leq 1,0$ ppm; quantidade de Proteína A a ≤ 5 ng/mg de dímero de CTLA4-Ig; quantidade de endotoxinas bacterianas no produto purificado final a $\leq 0,3$ EU/mg de dímero de CTLA4-Ig; quantidade de Biocarga no produto purificado final a $\leq 3,0$ CFU/10 mL.

Em uma modalidade, Proteína quimiotática de monócito (MCP-1) está presente no produto purificado final a ≤ 3 ng/mg de dímero de CTLA4-Ig ou moléculas de CTLA4-Ig; a concentração de DNA presente no produto purificado final a $\leq 1,0$ pg/mg de dímero de CTLA4-Ig; proteína de célula hospedeira CHO presente no produto purificado final a ≤ 10 ng/mg de dímero de CTLA4-Ig; quantidade de Proteína A a ≤ 1 ng/mg de dímero de CTLA4-Ig; quantidade de endotoxinas bacterianas no produto purificado final a $\leq 0,15$ EU/mg de dímero de CTLA4-Ig; e quantidade de Biocarga no produto purificado final a $\leq 1,0$ CFU/10 mL; uma faixa de pH de cerca de 7,2 – 7,8. Em

uma modalidade particular, Proteína quimiotática de monócito (MCP-1) está presente no produto purificado final a ≤ 1 ng/mg de dímero de CTLA4-Ig ou moléculas de CTLA4-Ig, em uma outra modalidade, moléculas de CTLA4-Ig inibem a atividade de IL-2 em células humanas em 60 – 140%.

5 Em outra modalidade da invenção, a população de células clonais produz moléculas de CTLA4^{A29YL104E}-Ig. Algumas das características específicas dessa população de moléculas de CTLA4^{A29YL104E}-Ig são listadas na Tabela 7. Uma população de moléculas de CTLA4^{A29YL104E}-Ig pode pelo menos incluir moléculas diméricas de CTLA4^{A29YL104E}-Ig que compreendem

10 duas moléculas monoméricas que, podem ter, cada uma, uma das seguintes seqüências: (i) 26-383 de SEQ ID NO: 4, (ii) 26-382 de SEQ ID NO: 4, (iii) 27-383 de SEQ ID NO: 4, (iv) 27-382 de SEQ ID NO: 4, (v) 25-382 de SEQ ID NO: 4 e (vi) 25-383 de SEQ ID NO: 4. Assim, a população de moléculas de CTLA4^{A29YL104E}-Ig pode incluir predominantemente homodímeros ou hete-

15 rodímeros ou qualquer mistura dos mesmos. Em uma modalidade, a invenção proporciona uma população de moléculas de CTLA4^{A29YL104E}-Ig tendo as características mostradas na Tabela 7 ou um equivalente farmacêutico das mesmas. Conforme usado aqui, um equivalente farmacêutico é onde uma população de moléculas tem um perfil de segurança e eficácia à população

20 original (população padrão) para tratamento de um paciente, conforme seria compreendido por uma agência governamental, tal como o FDA. Por exemplo, a população de CTLA4^{A29YL104E}-Ig da presente invenção pode as características mostradas na Tabela 7. Em outra modalidade, a população de mo-

25 léculas de CTLA4^{A29YL104E}-Ig da invenção pode ter as características mostradas na Tabela 7 ou equivalentes das mesmas unicamente ou em qualquer combinação ou permuta dos mesmos.

Em uma modalidade, a invenção proporciona populações de células CHO capazes de produzir moléculas de CTLA4^{A29YL104E}-Ig, em que cada célula da população compreende pelo menos 30 cópias de um ácido nucleico que codifica uma proteína de CTLA4^{A29YL104E}-Ig, em que as 30 ou mais

30 cópias são integradas aleatoriamente em um único sítio no genoma da célula e em que a população de células são clonal. Em outras modalidades, as

populações de células CHO capazes de produzir moléculas de CTLA4^{A29YL104E}-Ig compreendem uma população em que pelo menos 75%, 80%, 85%, 90%, 95% ou 99% das células nas populações compreendem pelo menos 30 cópias de um ácido nucleico que codifica a CTLA4^{A29YL104E}-Ig.

- 5 Em outras modalidades, a invenção proporciona uma linhagem de células que, quando cultivada em condições de acordo com FIG. 24 ou Exemplos 19-20, produz moléculas de CTLA4^{A29YL104E}-Ig compreendidas de SEQ ID NO: 4 em uma quantidade que é pelo menos 22, 22,5, 23, 27,5 ou 28 gramas de moléculas de CTLA4^{A29YL104E}-Ig por litro cultura de células no estágio de produção.

- 10 De acordo com a invenção, uma linhagem de célula de mamífero (por exemplo, uma linhagem de célula CHO *dhfr* negativa) é gerada, a qual expressa uma proteína desejada (por exemplo, a CTLA4^{A29YL104E}-Ig) que, quando crescida em uma cultura suspensa, pode produzir uma população de moléculas que é secretada no sobrenadante de cultura. Essa população de moléculas pode ter, por exemplo, uma ou mais ou todas as seguintes características listadas na Tabela 7.

Tabela 7. Características ilustrativas da CTLA4^{A29YL104E}-Ig

	Característica	
1	Seqüência N-terminal	aa 26 (Ala) de SEQ ID NO: 4 aa 27 (Met) de SEQ ID NO: 4
2	Seqüência C-terminal	aa 382 (Gly) de SEQ ID NO: 4 aa 383 (Lys) de SEQ ID NO: 4
3	Ligação a B7	70-130%
4	pl	4,5-5,5
5	Proporção de ácido siálico NANANGNA	≥5,0 moles por mol de proteína de CTLA4-Ig no total
6	dímero	≥95%
7	Espécies HMW (por exemplo, tetrâmero)	≤4%
8	Espécies de baixo peso molecular (por exemplo monômero)	≤1%
9	Coefficiente de Extinção	24-28 moles por mol de proteína de CTLA4-Ig no total
10	Grupos Sulfidríla livres	2,7-3,6 moles por mol de proteína de CTLA4-Ig no total
11	Composição de Amino Monossacarídeo: GlcNAc	11-13 moles por mol de proteína de CTLA4-Ig no total
12	Composição de Amino Monossacarídeo: GalNAc	6,4-7,0 moles por mol de proteína de CTLA4-Ig no total
13	Composição de Monossacarídeo neutro: Galactose	14-16 moles por mol de proteína de CTLA4-Ig no total

De acordo com a Tabela 7, o percentual de dímero de CTLA4^{A29YL104E}-Ig, percentual de espécies de HMW (por exemplo, multímeros de CTLA4^{A29YL104E}-Ig, tal como um tetrâmero) e percentual de espécies de LMW (por exemplo, monômeros de CTLA4^{A29YL104E}-Ig) são com relação a uma população de moléculas de CTLA4^{A29YL104E}-Ig. Os moles de açúcares e os moles de ácido siálico descritos na Tabela 7 são com relação ao mol de moléculas ou dímero de CTLA4^{A29YL104E}-Ig. O percentual de ligação a B7 encontrado na Tabela 7 é em referência aos experimentos de ligação de CTLA4^{A29YL104E}-Ig realizados através de ressonância de plasmônio em superfície (SPR) sobre um instrumento BIAcore descrito anteriormente, em que o percentual é uma comparação com a ligação a B7 com um controle de CTLA4^{A29YL104E}-Ig.

Em uma modalidade, a linhagem de célula de mamífero (tal como uma linhagem de célula CHO *dhfr* negativa) gera uma população de moléculas de CTLA4^{A29YL104E}-Ig mostrando atributos característicos números 1-5 da Tabela 7. Em outra modalidade da invenção, a linhagem de célula de mamífero gera uma população de moléculas de CTLA4^{A29YL104E}-Ig tendo atributos característicos números 1-10 da Tabela 7. Em outras modalidades, a linhagem de célula de mamífero gera uma população de moléculas de CTLA4^{A29YL104E}-Ig mostrando atributos característicos números 1-13 da Tabela 7.

Quando de purificação de um sobrenadante de cultura de célula que contém a proteína desejada (por exemplo, a CTLA4^{A29YL104E}-Ig) secretada por uma população de células de mamífero transfectadas (por exemplo, uma célula CHO *dhfr* negativa), a população de moléculas pode ter outras características. Além daquelas características listadas na Tabela 7, essa população de moléculas pode ter, por exemplo, uma ou mais ou todas as seguintes características: Proteína quimiotática de monócito (MCP-1) presente no produto purificado final a ≤ 5 ng/mg de dímero de CTLA4^{A29YL104E}-Ig; concentração de DNA presente no produto purificado final a $\leq 2,5$ pg/mg de dímero de CTLA4^{A29YL104E}-Ig; e proteína de célula hospedeira CHO presente no produto purificado final a ≤ 50 ng/mg de dímero de CTLA4^{A29YL104E}-Ig.

Ig.

Cultura geral de linhagens de células

De acordo com presente invenção, células de mamífero são cultivadas para produzir uma proteína desejada, incluindo uma glicoproteína, conforme convencionalmente conhecidos por aqueles habilitados na técnica. As células de mamífero expressando uma glicoproteína de interesse expressam ou seriam manipuladas para expressar as enzimas apropriadas de modo que, sob condições satisfatórias, modificações pós-traducionais mais pertinentes à glicosilação ocorrem *in vivo*. As enzimas incluem aquelas necessárias para a adição e término de carboidratos N- e O-ligados, tais como aqueles descritos em Hubbard e Ivatt, Ann. Rev. Biochem., 50: 555-583(1981) para oligossacarídeos N-ligados. As enzimas incluem, opcionalmente, oligossacaril transferase, alfa-glicosidase I, alfa-glicosidase II, alfa(1,2)manosidase de ER, alfa-manosidase I de Golgi, N-acetil glicosaminil transferase I, alfa-manosidase II de Golgi, N-acetil glicosaminil transferase II, alfa(1,6)fucosil transferase, beta (1,4)galactosil transferase e uma sialil transferase apropriada.

Um retardo na apoptose (morte celular programada) pode ter um efeito de aumentar a viabilidade celular durante processos de cultura de células. Uma diminuição na apoptose e, por sua vez, um aumento na vida útil de uma célula em particular pode aumentar a produção de proteína a partir de uma cultura de célula. Eventos apoptóticos podem ser inibidos em uma célula através de introdução, na célula (tal como uma célula de mamífero, uma célula de inseto ou uma célula de levedo), de uma ou mais proteínas anti-apoptóticas, as quais inibem a apoptose em células em pontos precisos ao longo da via apoptótica. Outro método para inibir a apoptose é inibir a liberação de moléculas pró-apoptóticas das mitocôndrias na célula. Variantes de proteínas pró-apoptóticas conhecidas na técnica, tal como uma forma dominante-negativa de caspase-9, podem ser usadas como um inibidor de apoptose em uma célula. Inibição de apoptose de uma célula, por sua vez, prolonga o tempo durante o qual uma célula em particular produz proteína, resultando em um aumento global na produção de uma proteína desejada

por uma célula em particular. Vários genes que codificam inibidores de caspase (tal como o inibidor de apoptose X-ligado (XIAP) ou variantes do mesmo) ou genes anti-apoptóticos (por exemplo, Bcl-2 e Bcl-x_L ou variantes dos mesmos) podem ser transfectados em células de mamífero geneticamente manipuladas (tais como células CHO, células VERO, células BHK e semelhantes) (Sauerwald, T. e colaboradores, 2003, Biotechnol Bioeng. 81: 329-340; Sauerwald, T. e colaboradores, 2002, Biotechnol Bioeng. 77: 704-716; Mastrangelo, A., e colaboradores, 2000, Biotechnol Bioeng. 67: 544-564; Kim, N., e colaboradores, 2002, J Biotechnol. 95: 237-248; Figueroa, B., e colaboradores, 2001, Biotechnol Bioeng. 73: 211-222).

Em uma modalidade, células de mamífero as quais produzem uma proteína recombinante podem ser transfectadas com um vetor contendo um gene anti-apoptótico (tal como *bcl-2*). Em outra modalidade, células de mamífero recombinantes podem ser transfectadas com um plasmídeo que contém um gene que codifica um inibidor de caspase ou um gene que codifica uma variante de uma molécula pró-apoptótica, conforme descrito acima, um gene que codifica uma proteína que é conhecida por aqueles habilitados na técnica por possuir atividade anti-apoptótica ou qualquer combinação dos mesmos.

Em outra modalidade, qualidade global de produto (por exemplo, glicosilação intensificada) de uma proteína recombinante desejada (tal como uma proteína terapêutica) pode ser intensificada. Para aumentar a glicosilação de uma proteína recombinante, células de mamífero (por exemplo, células CHO, células VERO, células BHK e semelhantes) pode ser transfectada com ácidos nucleicos que codificam uma ou mais enzimas que estão envolvidas em glicosilação (tais como α 2,3-sialil transferase, β 1,4-galactosil transferase e semelhantes) de proteínas (Weikert e colaboradores, 1999, Nature Biotechnol 17: 1116-21). Em uma modalidade, um plasmídeo que codifica β 1,4-galactosil transferase pode ser introduzido em células de mamífero expressando uma proteína de interesse. Em outra modalidade, um plasmídeo que codifica α 2,3-sialil transferase pode ser introduzido em células de mamífero expressando uma proteína de interesse.

Vários parâmetros de cultura podem ser usados com relação à célula hospedeira que está sendo cultivada. Condições de cultura apropriadas para células de mamífero são bem conhecidas na técnica (Cleveland e colaboradores, J. Immunol. Methods, 56: 221-234 (1983)) ou podem ser determinada por aqueles habilitado (veja, por exemplo, *Animal Cell Culture: A Practical Approach*, 2^a Ed., Rickwood, D. e Hames, B. D., eds. (Oxford University Press: New York, 1992)) e variam de acordo com a célula hospedeira selecionada em particular.

Sem limitação, meio de cultura de células (tais como meio de inóculo, meio de alimentação, meio basal e semelhantes) pode se referir a uma solução nutriente usada para crescimento de e ou manutenção de células, especialmente células de mamífero. Essas soluções comumente proporcionam pelo menos um componente de uma ou mais das seguintes categorias: (1) uma fonte de energia, usualmente na forma de um carboidrato, tal como glicose; (2) todos os aminoácidos essenciais e usualmente o conjunto básico de vinte aminoácidos mais cisteína; (3) vitaminas e/ou outros compostos orgânicos requeridos em baixas concentrações; (4) ácidos graxos livres ou lipídios, por exemplo, ácido linoleico; e (5) elementos vestigiais, onde elementos vestigiais são definidos como compostos inorgânicos ou elementos que ocorrem naturalmente que são, tipicamente, requeridos em concentrações muito baixas, usualmente na faixa micromolar. A solução nutriente pode ser suplementada eletivamente com um ou mais componentes de qualquer uma das seguintes categorias: (1) hormônios e outros fatores de crescimento, tais como soro, insulina, transferrina e fator de crescimento epidérmico; (2) sais, por exemplo, magnésio, cálcio e fosfato; (3) tampões, tal como HEPES; (4) nucleosídeos e bases, tais como adenosina, timidina e hipoxantina; (5) proteína e hidrolisatos teciduais, por exemplo, peptona ou misturas de peptona as quais podem ser obtidas de gelatina purificada, material vegetal ou subprodutos animais; (6) antibióticos, tal como gentamicina; (7) agentes protetores de célula, por exemplo, poliol Pluronic; e (8) galactose. Um exemplo de meio basal pode ser Meio Basal de Crescimento Celular. Um exemplo de meio de inóculo pode ser Meio Basal de Crescimento de

Células de Inóculo. Um exemplo de meio de alimentação pode ser Meio de alimentação para Produção em Bio-reator.

Meios comercialmente disponíveis podem ser utilizados e incluem, por exemplo, Meio Mínimo Essencial (MEM, Sigma, St. Louis, Mo.);

5 Meio de Eagles Modificado de Dulbecco (DMEM, Sigma); Meio F10 de Ham (Sigma); meio de cultura de células HyClone (HyClone, Logan, Utah); Meio RPMI-1640 (Sigma); e meio quimicamente definido (CD), os quais são formulados para tipos de célula particulares, por exemplo, Meio CD-CHO (Invitrogen, Carlsbad, Calif.). Qualquer um desses meios pode ser suplementado

10 conforme necessário com os componentes ou ingredientes suplementares previamente definidos, incluindo componentes opcionais, em concentrações ou quantidades apropriadas, conforme necessário ou desejado. A cultura de células de mamífero que pode ser usada com a presente invenção é preparada em um meio adequado para a célula que está sendo cultivada em parti-

15 cular. Em uma modalidade, um meio de cultura de célula pode ser um daqueles antes mencionados que geralmente é isento de soro de qualquer fonte de mamífero (por exemplo, soro fetal bovino (FBS)). Em outra modalidade da presente invenção, a cultura de células de mamífero pode ser crescida no meio (CD)-CHO quimicamente definido comercialmente disponível, suplementado com componentes adicionais especificados na Tabela 15. Em uma

20 outra modalidade, a cultura de células de mamífero pode ser crescida em Meio CD-CHO, suplementado com componentes adicionais especificados na Tabela 20 ou 21.

Os métodos da presente invenção incluem a cultura de números

25 tipos de célula. Em uma modalidade da invenção, as células são de animal ou de mamífero. Em outra modalidade, as células podem expressar e secretar grandes quantidades de uma proteína desejada. Em outra modalidade da invenção, células podem expressar e secretar grandes quantidades de uma glicoproteína de interesse no meio de cultura. As células de animal ou mamí-

30 fero podem também ser molecularmente modificadas para expressar e secretar uma proteína de interesse. A proteína produzida pela célula hospedeira pode ser endógena ou homóloga à célula hospedeira. A proteína também

pode ser heteróloga (por exemplo, estranha) à célula hospedeira, pelo que a informação genética que codifica a proteína de interesse é introduzida na célula hospedeira via métodos padrões na técnica (por exemplo, através de eletroporação, transfecção e semelhantes). Em uma modalidade, a glicoproteína de mamífero pode ser produzida e secretada por uma célula hospedeira de Ovírio de Hâmsler Chinês (CHO) no meio de cultura.

Em algumas modalidades, a invenção proporciona uma população de moléculas de CTLA4-Ig produzida através dos métodos de produção discutidos aqui, incluindo o método de produção em massa que é descrito no Exemplo 14 e mostrado na FIG. 10. O processo pode resultar na produção de espécies de elevado peso molecular (HMW) de moléculas de CTLA4-Ig (por exemplo, veja Exemplos 14 e 15). Em outra modalidade, populações de moléculas de CTLA4^{A29YL104E}-Ig são proporcionadas que são produzidas através dos métodos de produções discutidos acima, tal como o método de produção em massa que é descrito nos Exemplos 19 e 20 e mostrado na FIG. 24. O processo pode resultar na produção de espécies de elevado peso molecular (HMW) de moléculas de CTLA4^{A29YL104E}-Ig (por exemplo, veja Exemplos 19 e 20). Em algumas modalidades, as espécies de HMW podem ser cerca de 15-25% das moléculas ou dímeros produzidos através de um método para produção, incluindo um processo de fermentação de (CD)-CHO1 quimicamente modificado. Em outras modalidades, a presente invenção proporciona métodos para isolamento, purificação e caracterização de componentes de HMW de CTLA4-Ig ou CTLA4^{A29YL104E}-Ig produzidos através do processo de fermentação de CD-CHO1. Componentes de HMW de CTLA4-Ig ou CTLA4^{A29YL104E}-Ig são multímeros (isto é, tetrâmeros, hexâmeros, etc.), os quais têm um peso molecular maior do que dímeros de CTLA4-Ig ou CTLA4^{A29YL104E}-Ig.

Células hospedeiras de animal ou de mamífero capazes de abrigar, expressar e secretar grandes quantidades de uma glicoproteína de interesse no meio de cultura para subsequente isolamento e/ou purificação incluem, mas não estão limitadas a, células de Ovírio de Hâmsler Chinês (CHO), tal como CHO-K1 (ATCC CCL-61), DG44 (Chasin e colaboradores,

1986, Som. Cell Molec. Genet., 12: 555-556; Kolkekar e colaboradores, 1997, Biochemistry, 36: 10901-10909; e WO 01/92337 A2), células CHO negativas para reductase de dihidrofolato (CHO/*dhfr*-, Urlaub e Chasin, 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77: 4216) e células CHO.dp12 (Pat. U.S. No. 5.721.121); células CV1 de rim de macaco transformadas através do SV40 (células COS, COS-7, ATCC CRL-1651); células de rim embriônico humano (por exemplo, células 293 ou células 293 subclonadas para crescimento em cultura em suspensão, Graham e colaboradores, 1977, J. Gen. Virol., 36: 59); células de rim de hãminster bebê (BHK, ATCC CCL-10); células de rim de macaco (CV1, ATCC CCL-70); células de rim de macaco African green (VERO-76, ATCC CRL-1587; VERO, ATCC CCL-81); células de Sertoli de camundongo (TM4, Mather, 1980, Biol. Reprod., 23: 243-251); células de carcinoma cervical humano (HELA, ATCC CCL-2); células de rim canino (MDCK, ATCC CCL-34); células de pulmão humano (W138, ATCC CCL-75); células de hepatoma humano (HEP-G2, HB 8065); células de tumor mamário de camundongo (MMT 060562, ATCC CCL-51); células de fígado de rato (BRL 3A, ATCC CRL-1442); células TRI (Mather, 1982, Annals NY Acad. Sci., 383: 44-68); células MCR 5; células FS4. Em um aspecto da presente invenção, células CHO são utilizadas, particularmente células CHO/*dhfr*- e células DG44.

Exemplos de glicoproteínas de mamífero que podem ser produzidas através dos métodos da presente invenção incluem, sem limitação, citocinas, receptores de citocina, fatores de crescimento (por exemplo, EGF, HER-2, FGF- α , FGF- β , TGF- α , TGF- β , PDGF, IGF-1, IGF-2, NGF, NGF- β); receptores de fator de crescimento, incluindo proteínas de fusão ou quiméricas. Outros exemplos incluem, mas não estão limitados a, hormônios de crescimento (por exemplo, hormônio de crescimento humano, hormônio de crescimento bovino); insulina (por exemplo, cadeia A de insulina e cadeia B de insulina), pró-insulina; eritropoietina (EPO); fatores de estimulação de colônia (por exemplo, G-CSF, GM-CSF, M-CSF); interleucinas (por exemplo, IL-1 a IL-12); fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e seu receptor (VEGF-R); interferons (por exemplo, IFN- α , β ou γ); fator de necrose de tu-

mor (por exemplo, TNF- α e TNF- β) e seus receptores, TNFR-1 e TNFR-2; trombopoietina (TPO); trombina; peptídeo natriurético cerebral (BNP); fatores de coagulação (por exemplo, Fator VIII, Fator IX, fator de von Willebrands e semelhantes); fatores anti-coagulação; ativador de plasminogênio tecidual (TPA), por exemplo, uroquinase ou urina humana ou TPA do tipo tecidual; hormônio de estimulação de folículo (FSH); hormônio de luteinização (LH); calcitonina; proteínas de CD (por exemplo, CD3, CD4, CD8, CD28, CD19, etc.); proteínas de CTLA (por exemplo, CTLA4); proteínas do receptor de células T e células B; proteínas morfogênicas ósseas (BNPs, por exemplo, BMP-1, BMP-2, BMP-3, etc.); fatores neurotróficos, por exemplo, fator neurotrófico derivado de osso (BDNF); neurotrofinas, por exemplo, 3-6; renina; fator reumatóide; RANTES; albumina; relaxina; proteína inibitória de macrófago (por exemplo, MIP-1, MIP-2); proteínas ou antígenos virais; proteínas na membrana de superfície; proteínas do canal de íons; enzimas; proteínas regulatórias; anticorpos; proteínas imunomodulatórias (por exemplo, HLA, MHC, a família B7); receptor homing; proteínas de transporte; dismutase de superóxido (SOD); proteínas de receptor acopladas à proteína G (GPCRs); proteínas neuromodulatórias; proteínas e peptídeos associados ao mal de Alzheimer (por exemplo, A-beta), bem como outros conhecidos na técnica.

20 Proteínas, polipeptídeos e peptídeos adequados que podem ser produzidos através dos métodos da presente invenção incluem, mas não estão limitados a, proteínas de fusão, polipeptídeos, proteínas quiméricas, bem como fragmentos ou porções ou mutantes, variantes ou análogos de qualquer uma das proteínas e polipeptídeos antes mencionados.

25 Os métodos da invenção podem também ser usados para produzir moléculas de CTLA4-Ig as quais são variantes de SEQ ID NO: 5, 6, 7, 8, 9 ou 10. Em uma modalidade, a molécula de CTLA4-Ig pode compreender um monômero tendo uma ou mais alterações nos resíduos 55 (A55Y) e 130 (L130E) (os resíduos mencionados são de SEQ ID NO: 2). Veja as descrições de variantes e mutantes de CTLA4-Ig descritas na Publicação U.S. No. 30 2002/0182211 A1, a qual é incorporada aqui por referência em sua totalidade. Em outra modalidade, uma variante de CTLA4-Ig pode compreender a

molécula de CTLA4-Ig tendo uma mutação dentro da região de CTLA-4 ou uma mutação na região de Ig ou qualquer combinação dos mesmos. Em uma modalidade, uma molécula variante de CTLA4-Ig compreende a molécula de CTLA4-Ig tendo uma seqüência de aminoácido que é pelo menos
5 cerca de 70%, cerca de 75%, cerca de 80%, cerca de 85%, cerca de 90%, cerca de 95% ou cerca de 99% idêntica à SEQ ID NOS: 5, 6, 7, 8, 9 ou 10. Em uma modalidade, a molécula variante de CTLA4-Ig é capaz de ligação ao CD80 ou CD86. Em outra modalidade, a variante é capaz de formar um dímero. Em uma outra modalidade, a variante exibe um perfil de carboidrato
10 similar àquele exibido por uma população de moléculas de CTLA4-Ig sem mutação. Em uma modalidade, as moléculas variantes de CTLA4-Ig têm os mesmos sítios potenciais de glicosilação N-ligada e O-ligada presentes em SEQ ID NO: 2. Em outra modalidade, uma molécula variante de CTLA4-Ig tem os mesmos sítios de glicosilação N-ligada e O-ligada presentes em SEQ
15 ID NO: 2 e tem sítios de glicosilação adicionais. As mutações podem incluir, mas não estão limitadas a, deleções, inserções, adições de nucleotídeo; deleções, substituições, adições de aminoácido; desvios de rede de ácido nucleico; as substituições podendo ser não conservativas (por exemplo, a glicina substituída por um triptofano) ou substituições conservativas (por exemplo, uma leucina substituída por uma isoleucina).
20

Moléculas variantes de CTLA4-Ig incluem, mas não estão limitadas a, CTLA4-L104EA29YIg (usando o sistema de numeração de resíduo de acordo com SEQ ID NO: 2, CTLA4-L104EA29YIg aqui é referida como CTLA4-L130EA55YIg), bem como aquelas moléculas variantes de CTLA4-Ig
25 conforme descrito nos Pedidos de Patente U.S. Nos. de Série 09/865.321 (Pub. U.S. No. US2002/0182211), 60/214.065 e 60/287.576; no WO 01/92337 A2; nas Pats. U.S. Nos. 6.090.914, 5.844.095 e 5.773.253; e conforme descrito em R. J. Peach e colaboradores, 1994, J Exp Med, 180: 2049-2058. Em uma modalidade, moléculas variantes de CTLA4-Ig produzidas nos presentes métodos podem ser secretadas de uma célula que compreende um vetor de expressão que codifica uma proteína variante de CTLA4-Ig.
30

Uma variante de CTLA4-Ig, L130EA55Y-Ig, é uma proteína de fusão geneticamente modificada similar, quanto à estrutura, à molécula de CTAL4-Ig. L130EA55Y-Ig tem o domínio de ligação extracelular funcional da CTLA-4 humana modificada e o domínio Fc da imunoglobulina humana da classe IgG1. Duas modificações de aminoácido, leucina para ácido glutâmico na posição 104 (L104E) de uma variante L104EA29Y, a qual corresponde à posição 130 de SEQ ID NO: 2 e alanina para tirosina na posição 29 (A29Y) de uma variante L104EA29Y, a qual corresponde à posição 55 de SEQ ID NO: 2, foram feitas na região de ligação a B7 do domínio de CTLA-4 para gerar a L130EA55Y. L130EA55Y-Ig pode compreender duas cadeias polipeptídicas glicosiladas homólogas de aproximadamente 45.700 Dáltons cada, as quais são mantidas juntas por uma ligação de dissulfeto inter-cadeia e interações não covalentes. DNA que codifica L130EA55Y-Ig foi depositado como DNA que codifica L104EA29Y-Ig em 20 de Junho de 2000 na American Type Culture Collection (ATCC) sob as condições do Tratado de Budapeste. A ele foi atribuído número de acesso à ATCC PTA-2104. L104EA29Y-Ig (correspondendo à L130EA55Y-Ig no presente pedido) é ainda descrita nos pedidos de patente co-pendentes U.S. Nos. de Série 09/579.927, 60/287.576 e 60/214.065 e 09/865.321 e no WO/01/923337 A2, todos os quais são incorporados por referência no presente pedido em suas totalidades.

Uma vez que a proteína recombinante L130EA55Y-Ig é diferente por apenas 2 aminoácidos (Tyr na posição de aminoácido 55 e Glu na posição de aminoácido 130) comparado com monômeros de CTLA4-Ig tendo uma Ala na posição de aminoácido 55 e Leu na posição de aminoácido 130 de SEQ ID NO: 2 e em virtude do fato de essas 2 mutações não afetarem a glicosilação N- ou O-ligada, populações de moléculas variantes de CTLA4-Ig compreendendo L130EA55Y-Ig podem ter o mesmo perfil ou um perfil de glicosilação muito similar àquele de populações compreendendo CTLA4-Ig do tipo silvestre. Ainda, em virtude do fato de que a proteína recombinante L130EA55Y-Ig é diferente por apenas 2 aminoácidos (Tyr na posição de aminoácido 55 e Glu na posição de aminoácido 130) comparado com monô-

meros de CTLA4-Ig tendo uma Ala na posição de aminoácido 55 e Leu na posição de aminoácido 130 de SEQ ID NO: 2, os presentes métodos da presente invenção deverão ser capazes de produzir L130EA55Y-Ig com atributos característicos similares conforme descrito na Tabela 6.

5 Os métodos da invenção podem também ser usados para produzir moléculas de CTLA4^{A29YL104E}-Ig as quais são variantes de SEQ ID NOS: 11, 12, 13, 14, 15 ou 16. Em uma modalidade, a CTLA4^{A29YL104E}-Ig pode compreender um monômero tendo uma ou mais alterações em SEQ ID NO: 3. Por exemplo, descrições de outras moléculas de CTLA4^{A29YL104E}-Ig
10 são descritas nas Publicações de Pedido de Patente U.S. Nos. U.S. 2002/0039577, U.S. 2003/0007968, U.S. 2004/0022787, U.S. 2005/0019859 e U.S. 2005/0084933 e Patente U.S. No. 7.094.8874, as quais são aqui incorporadas por referência em sua totalidade.

Em uma modalidade, CTLA4^{A29YL104E}-Ig compreende uma ou
15 mais mutações dentro da região de CTLA-4 (SEQ ID NO: 18) ou uma mutação na região de Ig ou qualquer combinação dos mesmos. Em outras modalidades, a molécula de CTLA4^{A29YL104E}-Ig compreende a CTLA4^{A29YL104E}-Ig tendo uma seqüência de aminoácido que é pelo menos cerca de 70%, cerca de 75%, cerca de 80%, cerca de 85%, cerca de 90%, cerca de 95% ou cerca
20 de 99% idêntica à SEQ ID NOS: 11, 12, 13, 14, 15 ou 16. Em uma outra modalidade, a molécula de CTLA4^{A29YL104E}-Ig conforme descrito acima é capaz de ligação ao CD80 ou CD86. Em outra modalidade, a CTLA4^{A29YL104E}-Ig é capaz de formar um dímero. Em uma outra modalidade, a CTLA4^{A29YL104E}-Ig
exibe um perfil de carboidrato similar àquele exibido por uma população de
25 moléculas de CTLA4^{A29YL104E}-Ig sem mutação. Em ainda outras modalidades, as moléculas de CTLA4^{A29YL104E}-Ig têm os mesmos sítios potenciais de glicosilação N-ligada e O-ligada presentes em SEQ ID NO: 4. Em outra modalidade, a CTLA4^{A29YL104E}-Ig tem os mesmos sítios de glicosilação N-ligada e O-ligada presentes em SEQ ID NO: 4 e tem sítios de glicosilação adicionais.
30 A mutações podem incluir, mas não estão limitadas a, deleções, inserções, adições de nucleotídeo; deleções, substituições, adições de aminoácido; desvios de rede de ácido nucleico; as substituições podendo ser não

conservativas (por exemplo, a glicina substituída por um triptofano) ou substituições conservativas (por exemplo, uma leucina substituída por uma isoleucina).

5 Em uma modalidade da invenção, uma população de moléculas variantes de CTLA4-Ig pode ser produzida por células de mamífero (por exemplo, células CHO *dhfr* negativas), as quais expressam um gene que codifica a proteína desejada (por exemplo, uma proteína L130EA55Y-Ig ou semelhante), crescida em suspensão de acordo com o método de produção em massa da presente invenção. De acordo com presente invenção, uma
10 proteína variante de CTLA4-Ig recombinante produzida por células de mamífero pode ser recuperada de acordo com os parâmetros de coleta descritos aqui. Em outras modalidades, uma proteína variante de CTLA4-Ig recombinante produzida por células de mamífero pode ser purificada de acordo com o esquema de purificação descrito na presente invenção (Exemplo 15).

15 Em uma modalidade da invenção, uma população de moléculas de CTLA4^{A29YL104E}-Ig pode ser produzida por células de mamífero (por exemplo, células CHO *dhfr* negativas), as quais expressam um gene que codifica a proteína desejada (por exemplo, a CTLA4^{A29YL104E}-Ig), crescidas em suspensão de acordo com o método de produção em massa da presente
20 invenção. De acordo com presente invenção, uma CTLA4^{A29YL104E}-Ig recombinante produzida por células de mamífero pode ser recuperada de acordo com os parâmetros de coleta descritos aqui. Em outras modalidades, uma CTLA4^{A29YL104E}-Ig recombinante produzida por células de mamífero pode ser purificada de acordo com o esquema de purificação descrito na presente
25 invenção (EXEMPLOS 19-20).

Tipos de processos de cultura de células e cultura geral

Uma proteína de interesse, por exemplo, uma glicoproteína, uma proteína de fusão e semelhantes, pode ser produzida através de crescimento de células expressando o produto de proteína desejado sob uma variedade de condições de cultura de células. Aqueles habilitados na técnica compreenderão que a cultura de células e operações de cultura para produção
30 de proteína podem incluir, mas não estão limitados a, três tipos gerais: cultu-

ra contínua, cultura em batelada e cultura com alimentação em batelada. Em um processo de cultura contínuo, um meio de suplemento de cultura fresco (por exemplo, meio de alimentação) é fornecido às células durante um período de cultura enquanto o meio de cultura velho é removido. O produto produzido durante a cultura contínua pode também ser coletado, por exemplo, em uma base diária ou continuamente. Na medida em que as células permaneçam vivas e as condições ambientais e de cultura sejam mantidas, as células podem permanecer em cultura durante tanto tempo quanto desejado em um processo de cultura contínuo.

10 Em um processo de cultura em batelada, as células são inicialmente cultivadas em meio e esse meio de cultura não é substituído, nem removido, nem suplementado. As células não são "alimentadas" com novo meio durante ou antes do final da operação de cultura, assim, a cultura continua até que os nutrientes tenham se esgotado. Um produto de proteína é coletado ao final de uma operação de cultura.

15 Para processos de cultura com alimentação em batelada, um tempo de operação de cultura pode ser aumentado suplementando o meio de cultura uma ou mais vezes ao dia (ou continuamente) com meio fresco durante a operação. Nesse processo, as células são fornecidas com meio fresco, um "meio de alimentação", durante um período de cultura. Culturas com alimentação em batelada podem incluir os vários esquemas de alimentação descritos previamente, por exemplo, diariamente, a cada dois dias, dia sim dia não, etc.; mais de uma vez por dia ou menos de uma vez por dia e assim por diante. Culturas com alimentação em batelada podem também ser alimentadas continuamente com meio de alimentação. Ao final de uma operação de cultura/produção, um produto de proteína de interesse é, então, coletado.

25 Sistemas de cultura de células para a produção em pequena ou larga escala de proteínas, incluindo glicoproteínas, produzidas por células hospedeiras de mamífero são úteis dentro do contexto da presente invenção. Aqueles habilitados na técnica compreenderão que discos de cultura tecidual, frascos para centrífuga e T-frascos são, tipicamente, usados para

métodos de cultura em uma escala de laboratório. Os processos que podem ser usados para cultura em uma escala maior (por exemplo, 500 L, 5000 L, 10.000 L, 20.000 L e semelhantes) incluem, mas não estão limitados a, bio-reator com fibra oca, um bio-reator com leite fluidizado, um sistema de bio-reator com tanque agitado ou uma garrafa de cultura giratória. Os dois últimos processos podem ser utilizado com ou sem microveículos.

Os sistemas podem ser operados em um modo em batelada, com alimentação em batelada ou contínuo. Para cultura em larga escala, o bio-reator com tanque agitado é o sistema de escolha em virtude de sua flexibilidade. Esses reatores podem manter as células em suspensão por meio de agitação através de agitação mecânica com purgação de bolhas de gás ou um propulsor. Os bio-reatores com tanque agitado podem ser escalonados para volumes de produção em larga escala (por exemplo, 20.000 litros) e podem ser operados em diferentes modos de alimentação. Esses sistemas proporcionam uma área de superfície grande para crescimento celular e a transferência eficiente de resíduos metabólicos, oxigênio e nutrientes, bem como manter um ambiente homogêneo por todo o reator impedindo as células de assentar no fundo via agitação ou mistura contínua dos componentes dentro dos reatores. Para a produção da glicoproteína desejada, a presente invenção concretiza cultura de células em larga escala com alimentação em batelada mantida em um bio-reator com tanque agitado, alimentando diariamente com meio de alimentação contendo D-galactose. Em outra modalidade, cultura de células com alimentação em batelada pode também ser mantida em um bio-reator com tanque agitado, alimentado diariamente com meio de cultura que contém concentrações adequadas dos nutrientes limitativos para a cultura de células importantes para glicosilação de proteína, tais como glicose e glutamina (Chee e colaboradores, 2005, Biotechnol. Bioeng. 89: 164-177).

As células em cultura que produzem uma proteína de interesse podem ser propagadas de acordo com qualquer esquema ou rotina que se mostra adequada para a célula hospedeira de mamífero em particular e o plano de produção considerado em particular. Condições de cultura de célu-

las podem ser desenvolvidas para intensificar a expansão ou crescimento de uma população de células hospedeiras de mamífero na fase de crescimento da cultura de célula durante um período de tempo que é maximizado para tal expansão e crescimento. A fase de crescimento da cultura de célula compreende o período de crescimento exponencial de células (por exemplo, a fase log) onde as células estão primariamente se dividindo rapidamente. Durante essa fase, a taxa de aumento na densidade de células viáveis é maior do que em qualquer outro ponto de tempo.

Também, condições de cultura de células podem ser desenvolvidas para intensificar a produção de proteína durante a fase de produção da cultura de células durante um período de tempo. A fase de produção da cultura de células compreende o período de tempo durante o qual crescimento celular é estacionário ou é mantido em um nível quase constante. A densidade de células viáveis permanece aproximadamente constante durante um determinado período de tempo. crescimento celular logarítmico terminou e a produção de proteína é a atividade primária durante a fase de produção. O meio, nesse momento, geralmente é suplementado para sustentar produção contínua de proteína e obter o produto de glicoproteína desejado.

Condições de cultura, tais como temperatura, pH, oxigênio dissolvido (DO_2) e semelhantes, são aquelas usadas em cultura de células hospedeiras de mamífero que são compreendidas por aqueles habilitados na técnica. Uma faixa de temperatura apropriada para cultura de células hospedeiras de mamífero, tais como células CHO, está entre 30 a 40°C e, em uma modalidade, cerca de 37°C. O pH geralmente é ajustado para um nível entre cerca de 6,5 e 7,5 usando um ácido ou base. Um DO_2 adequado está entre 5-90% de saturação de ar. Essas condições de cultura podem ser usadas para facilitar a cultura de células de mamífero que produzem um produto de proteína ou glicoproteína desejado.

A população de células hospedeiras de mamífero pode ser expandida e crescida na fase de crescimento da cultura, em que as células, possivelmente removidas de armazenamento, são inoculadas em um meio de cultura aceitável para promover crescimento e alta viabilidade. As células

podem, então, ser mantidas em uma fase de produção durante um período de tempo adequado através da adição de meio de cultura fresco à cultura de células hospedeiras. Durante a fase de produção, as células podem ser submetidas a vários desvios na temperatura para intensificar a produção de

5 proteína. Processos de cultura com múltiplos desvios de temperatura são descritos nos pedidos de patente U.S. No. de Série 10/742.564, depositado em 18 de Dezembro de 2003 e U.S. No. de Série 10/740.645, depositado em 18 de Dezembro de 2003, os conteúdos desses pedidos sendo incorporados por referência aqui em sua totalidade. Na presente invenção, o processo de

10 cultura de células compreendendo os dois ou mais desvios de temperatura pode resultar em um número aumentado de células viáveis que sobrevivem na cultura até o final do processo ou operação de produção. Durante a fase de produção da cultura, o maior número de células que sobrevivem pode resultar em uma maior quantidade de produto de proteína ou glicoproteína

15 produzido, aumentando a quantidade de produto de proteína no final do processo.

Um aspecto particular da presente invenção concretiza cultura de células de mamíferos em larga escala de alimentação em batelada (por exemplo, 500 L, 5000 L, 10000 L e semelhantes), que é alimentada diaria-

20 mente ou com alimentação de meio descrita nas Tabelas 14, 15, compreendendo D-galactose de forma que células produzam uma glicoproteína de interesse. Para aumentar a qualidade da proteína produzida nessa modalidade, dois ou mais desvios de temperatura podem ser empregados durante o período de cultura para prolongar a fase de produção de proteína para a-

25 além daquela que ocorre quando nenhum desvio de temperatura é usado ou quando apenas um desvio de temperatura é usado. Em outra modalidade, a invenção requer cultura de células de mamífero em larga escala de alimentação em batelada (por exemplo, 500 L, 5000 L, 10000 L e semelhantes), que é alimentada 1 ou mais vezes ao dia com meio de alimentação descrito

30 na Tabela 22 o qual compreende D-galactose, de modo que as células produzam uma glicoproteína de interesse (por exemplo, CTLA4^{A29YL104E}-Ig). Um ou mais desvios de temperatura também podem ser empregados durante o

período de cultura para prolongar a fase de produção de proteína para além daquela que ocorre quando nenhum desvio de temperatura é usado de forma a aumentar a qualidade da glicoproteína. Alternativamente, sulfato de dextrana pode ser adicionado à cultura com um concomitante desvio de temperatura.

Produção em massa de proteína recombinante em bio-reatores

A presente invenção proporciona métodos para cultura convencional em um bio-reator com tanque agitado de células eucariotas (por exemplo, um volume de cultura de células de 20000 L), particularmente para produzir quantidades em larga escala ou industriais de produtos de proteína desejados que são expressos por tais células. O processo de cultura é um processo de cultura de alimentação em batelada de células crescidas em suspensão, com coleta do sobrenadante de cultura, em que células eucariotas, por exemplo, células de mamífero, expressando uma proteína de interesse, secretam um produto de proteína desejado no meio de cultura.

Métodos para cultura em larga escala de células de mamífero, particularmente para produzir grandes quantidades de produtos de proteína desejados que são expressos por tais células, são concretizados na presente invenção. Os métodos podem ser realizados através de etapas compreendendo:

(i) inoculação de células em um vaso de cultura (por exemplo, um frasco T-175) contendo meio de cultura isento de soro e propagação da cultura original (por exemplo, uma cultura inicial que é usada para inocular um volume maior) pelo menos até as células atingirem uma densidade de cultura cruzada mínima, pelo que a densidade é um valor predeterminado necessário para propagação suficiente de células no volume de cultura subsequente;

(ii) transferência da cultura original propagada para um vaso de cultura maior (por exemplo, garrafas giratórias ou sacos de células) contendo meio de cultura carecendo de componentes derivados de animal de forma a expandir a cultura;

(iii) transferência da cultura original expandida para um vaso de

cultura de larga escala contendo meio de cultura isento de soro para propagar adicionalmente a cultura de célula; e

- 5 (iv) manutenção da cultura em larga escala em meio carecendo de componentes derivados de animal, pelo menos até que as referidas células atinjam uma densidade alvo ou mostrem uma característica bioquímica específica.

Em algumas modalidades, o método podem compreender a etapa de (iv) coleta do meio de cultura e substituição desse meio por meio fresco.

- 10 Em outras modalidades, métodos para a cultura em larga escala de células de mamífero podem ser realizados através de etapas compreendendo:

- 15 (i) inoculação de células em um vaso de cultura (por exemplo, um frasco T-175) contendo meio de cultura isento de soro (por exemplo, meio de inóculo) e propagação da cultura original (por exemplo, uma cultura inicial que é usada para inocular um volume maior), pelo menos até as células atingirem uma densidade de cultura cruzada mínima que é um valor predeterminado necessário para propagação suficiente de células no volume de cultura subsequente;

- 20 (ii) transferência da cultura original propagada para um vaso de cultura maior (por exemplo, garrafas giratórias ou sacos de células) contendo meio de cultura carecendo de componentes derivados de animal (por exemplo, meio de inóculo) de forma a expandir a cultura;

- 25 (iii) transferência da cultura original expandida para um vaso de cultura de larga escala (tais como bio-reatores de 1000-L) contendo meio de cultura isento de soro (por exemplo, meio basal) para propagar adicionalmente a cultura de células; e

- 30 (iv) manutenção da cultura em larga escala em meio carecendo de componentes derivados de animal (por exemplo, meio de alimentação), pelo menos até que as referidas células atinjam uma densidade alvo ou mostrem uma característica bioquímica específica.

Em algumas modalidades da invenção, o método podem com-

preender a etapa de:

(v) coleta do meio de cultura e substituição do meio consumido por meio fresco.

A presente invenção é aplicável a qualquer tipo de célula em qualquer formulação de meio carecendo de componentes derivados de animal de forma para produzir quantidades em larga escala de produtos de proteína desejados e pode utilizar um dos dois processos a seguir ou variações dos mesmos: a) processos com microveículo ou b) processos de células em suspensão. Cultura de células, por exemplo, células de mamífero, pode utilizar um processo operado em duas fases distintas, uma fase de crescimento e uma fase de produção. Em outra modalidade da invenção, qualquer formulação de meio a qual contém componentes derivados de animal (alguns exemplos não limitativos sendo Albumina de Soro Bovino (BSA) ou FBS) pode ser empregada também para a produção de quantidades de proteína em larga escala, conforme descrito acima.

Aqueles habilitados na técnica compreenderão que um processo com microveículo, não limitado a um processo com microveículo padrão ou um processo de perfusão de microveículo, pode ser usado para a cultura de células em que as células são presas a e/ou imobilizadas em um veículo macroporoso. Em um processo com microveículo padrão, as células são inoculadas em um vaso de cultura contendo meio de cultura isento de soro e propagadas até as células atingirem uma densidade de cultura mínima. Subseqüentemente, a cultura original propagada é transferida para um vaso de cultura de larga escala contendo meio de cultura isento de soro e microveículos. Nessa fase de crescimento, as células são crescidas sobre microveículos até que os veículos estejam totalmente colonizados, por exemplo, através de migração das células para os veículos no caso de um processo usando veículos macroporosos.

Troca de meio pode ocorrer quando microveículos assentam no fundo do vaso de cultura, após o que um percentual predeterminado de volume do tanque é removido e um percentual correspondente do volume do tanque de meio fresco é adicionado ao vaso. Microveículos são, então, re-

suspensos no meio de cultura. Aqueles habilitados na técnica que o processo de remoção e substituição de meio pode ser repetido em um intervalo predeterminado, por exemplo, a cada 24 horas, pelo que a quantidade de meio substituído é dependente da densidade celular e pode, tipicamente, ser de 25% a 80% do volume do tanque. 60-95% do meio no tanque podem ser trocados a cada 24 horas, quando a densidade celular atinge um valor predeterminado adequado para expressão de proteína. Aqueles habilitados na técnica freqüentemente usam o valor % de troca de meio antes mencionado por toda a fase de produção também.

10 Durante a fase de produção, meio de cultura pode ser trocado para permitir que os microveículos assentem no fundo do tanque, após o que o volume % selecionado do tanque é removido e um volume % do tanque correspondente, por exemplo, 60-95% conforme descrito anteriormente, de meio de cultura fresco é adicionado ao vaso. Microveículos são, então, re-suspensos no meio de cultura e no meio remoção e o processo de substituição pode ser repetido diariamente.

15 O processo de perfusão de microveículo se assemelha ao processo com microveículo padrão e também é operado nas fases de crescimento/expansão e produção. A principal diferença entre os dois processos é o método empregado para trocar o meio de cultura. Uma quantidade definida de volume do tanque, por exemplo, 60-95% do volume total do tanque, é trocada toda de uma vez no processo com microveículo padrão enquanto que, no processo de perfusão, o meio é adicionado continuamente. Essencialmente, um volume % do tanque de meio é trocado gradualmente durante um período de tempo predeterminado, enquanto os microveículos são mantidos no vaso através de uso de um dispositivo de separação (ou dispositivo de perfusão) que permite que o meio saia do vaso, mas retém os microveículos dentro do tanque. A fase de crescimento nesse processo é conforme descrito para um processo com microveículo padrão, exceto quanto à troca gradual de meio.

25 30 Duas opções não limitativas para um processo de células em suspensão incluem um processo de perfusão de células em suspensão e um

processo em batelada de células em suspensão. No processo de perfusão, células em um meio de cultura são livremente suspensas sem serem imobilizadas em veículos e, tais processos com microveículo, podem ser operados em duas fases distintas (por exemplo, uma fase de crescimento e uma fase de produção). Durante a fase de crescimento de um processo de perfusão de células em suspensão, as células são inoculadas em um vaso de cultura contendo meio de cultura isento de soro e propagadas até as células atingirem uma densidade de cultura cruzada alvo. A cultura original propagada pode, então, ser transferida para um vaso de cultura de larga escala, o qual contém meio de cultura carecendo de componentes derivados de animal e propagadas até um valor de densidade celular predeterminado adequado para expressão da proteína ser obtida. A perfusão contínua do vaso de cultura com meio de cultura fresco é realizada para executar o processo de troca de meio.

No processo de suspensão de célula em batelada, cultura de células pode ser realizada via os seguintes formatos não limitativos: a) processo em batelada simples ou b) processo de alimentação em batelada. Células são inoculadas em um vaso de cultura contendo meio de cultura carecendo de componentes derivados de animal em um processo em batelada simples e propagadas até as células atingirem uma densidade de cultura cruzada predeterminada. Subseqüentemente, a cultura original propagada é transferida para um vaso de cultura de larga escala contendo meio de cultura isento de soro e o vaso de cultura é operado até que os nutrientes no meio de cultura tenham sido esgotados. Em um processo de alimentação em batelada, alimentação de uma solução concentrada de nutrientes (por exemplo, um meio de alimentação) ao tanque pode estender o suprimento de nutrientes no meio desse processo de cultura, assim, aumentando o tempo de processo e, por fim, levando a um aumento na produção da proteína desejada dentro do vaso de cultura. O método de adição do meio de alimentação pode variar. Ele pode ser adicionado como um único bolo pulsado (uma vez, duas vezes, três vezes etc., um dia) ou pode ser alimentado gradualmente no decorrer de um período de 24 horas. Essa alimentação permite

que as células sejam propagadas em um vaso de cultura de larga escala e o meio, o qual pode conter o produto de proteína secretado de interesse, a ser coletado ao final da operação antes que qualquer um dos nutrientes sejam esgotados. Ao invés de remoção de todos os conteúdos do vaso, aqueles

5 habilitados na técnica removerão apenas uma porção do volume do tanque (pode ser cerca de 80%).

Um aspecto opcional do processo de alimentação em batelada é o uso de desvios de temperatura. Nesse processo, as temperaturas empregadas como as temperaturas de operação durante a fase de produção são

10 menores do que a temperatura usada durante a fase de crescimento. As referidas faixas de temperatura para um processo de alimentação em batelada, por exemplo, o processo usado na presente invenção, poderia consistir de uma fase de crescimento inicial em uma temperatura adequada para crescimento da linhagem de célula em particular em uso, seguido por uma

15 diminuição na temperatura de operação em uma densidade celular predefinida.

Em uma modalidade, um processo para um processo de cultura com alimentação em batelada em larga escala compreende o seguinte: (i) inoculação de células em um vaso de cultura (por exemplo, um frasco T-175)

20 contendo meio de cultura isento de soro e propagação da cultura original pelo menos até as células atingirem uma densidade de cultura cruzada predefinida em uma temperatura adequada para crescimento; (ii) transferência da cultura original propagada to um vaso de cultura maior (por exemplo, garrafas giratórias ou sacos de células) contendo meio de cultura care-

25 cendo de componentes derivados de animal de forma a expandir a cultura em uma temperatura adequada; (iii) transferência da cultura original expandida para um vaso de cultura de larga escala contendo meio de cultura isento de soro para propagar adicionalmente to a cultura de célula em uma temperatura adequada; e (iv) manutenção da cultura em larga escala em uma

30 temperatura diminuída adequada para expressão de proteína, em meio carecendo de componentes derivados de animal, com reposições diárias através de meio de alimentação fresco, pelo menos até que as referidas células

atingam uma densidade alvo ou extensão de tempo crítica.

A etapa de reposição de meio de alimentação fresco em (iv) pode requerer remoção de um volume predeterminado, por exemplo, 80%, do volume do tanque e reposição do mesmo pelo mesmo volume de meio de alimentação fresco.

Em uma outra modalidade, um processo para um processo de cultura com alimentação em batelada em larga escala compreende o seguinte: (i) inoculação de células em um vaso de cultura (por exemplo, um frasco T-175) contendo meio de cultura isento de soro e propagação da cultura original pelo menos até as células atingirem uma densidade de cultura cruzada predeterminada em uma temperatura adequada para crescimento; (ii) transferência da cultura original propagada to um vaso de cultura maior (por exemplo, garrafas giratórias ou sacos de células) contendo meio de cultura carecendo de componentes derivados de animal de forma a expandir a cultura em uma temperatura adequada; (iii) transferência da cultura original expandida para um vaso de cultura de larga escala (por exemplo, um bio-reator de 1000-L) contendo meio de cultura isento de soro para propagar adicionalmente to a cultura de célula em uma temperatura adequada; e (iv) manutenção da cultura em larga escala em uma temperatura diminuída adequada para expressão de proteína, em meio carecendo de componentes derivados de animal, com reposições diárias através de meio de alimentação fresco, pelo menos até que as referidas células atinjam uma densidade alvo ou extensão de tempo crítica.

A etapa de reposição de meio de alimentação fresco em (iv) pode requerer remoção de um volume predeterminado, por exemplo, cerca de 80% do volume do tanque e reposição do mesmo pelo mesmo volume de meio de alimentação fresco.

Em uma modalidade da presente invenção, as células cultivadas em um processo de alimentação em batelada são células de mamífero, por exemplo, células CHO, as quais expressam um produto de proteína desejado. Células de mamífero são inoculadas em um vaso de cultura (por exemplo, um frasco T-175) contendo meio de cultura isento de soro, por exemplo,

meio CD-CHO (Exemplo 13) e propagadas em uma temperatura adequada para crescimento, por exemplo, em cerca de 35-39°C, durante 3-4 dias até as células atingirem uma densidade de cultura cruzada predeterminada (por exemplo, tendo $\geq 6,0 \times 10^6$ células viáveis ou em que a viabilidade de cultura final $\geq 80\%$). A cultura original propagada é, então, transferida para um grande vaso de cultura (por exemplo, garrafas giratórias) contendo meio de cultura carecendo de componentes derivados de animal para expansão em uma temperatura adequada (por exemplo, em cerca de 35-39°C) durante aproximadamente 3-4 dias. A cultura de célula é ainda expandida em um vaso de cultura maior (por exemplo, um saco de células de 20 L, um saco de células de 100 L e semelhantes) contendo meio isento de soro, por exemplo, meio CD-CHO, em uma temperatura adequada para crescimento, por exemplo, em cerca de 35-39°C, durante 3-4 dias até as células atingirem uma densidade de cultura alvo (por exemplo, tendo $\geq 1-2 \times 10^6$ células viáveis/ml ou em que a viabilidade de cultura final $\geq 80\%$). Em uma modalidade, a expansão de inóculo envolve um mínimo de 4 passagens. Em outra modalidade da invenção, expansão de inóculo requer não mais do que 20 passagens.

A cultura original expandida pode, então, ser usada para inocular um tanque de cultura em larga escala (por exemplo, a 1000L, um bio-reator de 4000L e semelhantes), contendo meio de cultura isento de soro (por exemplo, meio CD-CHO) para propagar adicionalmente a cultura de célula em uma temperatura adequada, por exemplo, em cerca de 35-39°C, durante 3-6 dias, até as células atingirem uma densidade de cultura alvo (por exemplo, tendo $\geq 1-2 \times 10^6$ células viáveis/ml ou em que a viabilidade final da cultura de células $\geq 80\%$). Uma cultura em larga escala (por exemplo, uma cultura de 10.000L, 15.000L, 20.000L em um bio-reator e semelhantes) é subsequentemente mantida em meio de cultura isento de soro, em que o meio é um meio de alimentação (por exemplo, meio eRDF, Exemplo 14), em uma temperatura menor do que a temperatura de crescimento (por exemplo, em ou cerca de 33-35°C durante 3-4 dias e em ou cerca de 31-33°C durante 6-8 dias), adequada para expressão de proteína e produção do produto de proteína secretado. O meio de alimentação é substituído diariamente por meio

de alimentação fresco, pelo que a reposição do tanque com meio de alimentação fresco requer remoção de um volume predeterminado, por exemplo, 80% do volume do tanque e reposição do tanque com o mesmo volume de meio de alimentação fresco. A escala comercial cultura é mantida até que as referidas células atinjam um valor alvo de parâmetros de produção que podem ser, mas não estão limitados a, uma extensão de tempo, uma densidade celular alvo ou característica bioquímica de proteína (tal como uma proporção molar de NANA conforme previamente descrito) em que a densidade celular viável pode ser $3,0-8,0 \times 10^6$ células/ml; a proporção molar de NANA pode ser $\geq 6,0$; a viabilidade final de cultura de células pode ser $\geq 30\%$; e a titulação final de produto de proteína pode ser $\geq 0,5$ g/L).

Em uma modalidade particular da presente invenção, as células cultivadas em um processo de alimentação em batelada são células de mamífero, por exemplo, células CHO, as quais expressam um produto de proteína desejado (por exemplo, a molécula de CTLA4-Ig). células CHO são inoculadas em um vaso de cultura (por exemplo, um frasco T-175) contendo meio de cultura isento de soro, por exemplo, meio CD-CHO e propagadas em uma temperatura adequada para crescimento, por exemplo, em cerca de 37°C , durante 3-4 dias até as células atingirem uma densidade de cultura cruzada predeterminada (por exemplo, tendo $\geq 10,0 \times 10^6$ células viáveis ou em que a viabilidade de cultura final $\geq 84\%$). A cultura original propagada é, então, transferida para um grande vaso de cultura (por exemplo, garrafas giratórias) contendo meio de cultura carecendo de componentes derivados de animal para expansão em uma temperatura adequada (aproximadamente 37°C) durante cerca de 4 dias. A cultura de célula é ainda expandida em um vaso de cultura maior (por exemplo, um saco de células de 20 L, um saco de células de 100 L e semelhantes) contendo meio isento de soro, por exemplo, meio CD-CHO, durante 4 dias em uma temperatura adequada para crescimento (por exemplo, em cerca de 37°C) até as células atingirem uma densidade de cultura alvo (por exemplo, tendo $\geq 1-2 \times 10^6$ células viáveis/ml ou em que a viabilidade de cultura final $\geq 91\%$). A expansão de inóculo pode envolver um mínimo de 7 passagens.

A cultura original expandida é, então, usada para inocular um tanque de cultura em larga escala (por exemplo, um bio-reator de 4000L e semelhantes), contendo meio de cultura isento de soro (por exemplo, meio CD-CHO) para propagar adicionalmente a cultura de célula em uma temperatura adequada, por exemplo, em cerca de 37°C, durante 5-6 dias, até as células atingirem uma densidade de cultura alvo (por exemplo, tendo $\geq 1-2 \times 10^6$ células viáveis/ml ou em que a viabilidade final da cultura de células $\geq 86\%$). Uma cultura em escala comercial (por exemplo, uma cultura de 20.000 L em um bio-reator) é subsequente mantida em meio de cultura isento de soro, em que o meio é um meio de alimentação (por exemplo, meio eRDF), em uma temperatura menor do que a temperatura de crescimento, a qual é adequada para expressão de proteína e produção do produto de proteína secretado (por exemplo, CTLA4-Ig). A cultura em escala comercial é primeiro diminuída de cerca de 37°C para cerca de 34°C durante 4 dias e, então, submetida a um segundo desvio de temperatura através de diminuição da temperatura de cerca de 34°C para cerca de 32°C durante 8 dias. O meio de alimentação é substituído diariamente por meio de alimentação fresco, pelo que reposição do meio de alimentação no tanque do bio-reator requer remoção de um volume predeterminado, por exemplo, 80% do volume do tanque e reposição do mesmo pelo mesmo volume de meio de alimentação fresco. A escala comercial é mantida até que as referidas células CHO e/ou produto de proteína secretado atinja um valor alvo dos seguintes parâmetros de produção não limitativos: uma densidade celular viável de $4,0-7,0 \times 10^6$ células/ml; uma proporção molar de NANA $\geq 8,0$; uma viabilidade final de cultura de células $\geq 38\%$; e uma titulação final de produto de proteína de $\geq 0,6$ g/L.

Em outra modalidade da presente invenção, as células cultivadas em um processo de alimentação em batelada são células de mamífero, por exemplo, células CHO, as quais expressam um produto de proteína desejado. Células de mamífero são inoculadas em um vaso de cultura (por exemplo, um frasco T-175) contendo meio de cultura isento de soro, por exemplo, meio CD-CHO (EXEMPLO 19) e propagadas em uma temperatura adequa-

da para crescimento, por exemplo, de cerca de 35°C a cerca de 39°C, durante cerca de 3-4 dias; ou de cerca de 36°C a cerca de 38°C, durante cerca de até cerca de 4 dias até as células atingirem uma densidade de cultura cruzada predeterminada (por exemplo, tendo uma densidade celular de mais de ou igual a $1,5 \times 10^6$ ou em que a viabilidade de cultura final é mais de ou igual a cerca de 80%). A cultura original propagada é, então, transferida para um grande vaso de cultura (por exemplo, garrafas giratórias) contendo meio de cultura carecendo de componentes derivados de animal para expansão em uma temperatura adequada (por exemplo, de cerca de 35°C a cerca de 39°C ou de cerca de 36°C a cerca de 38°C) durante cerca de 3-4 dias ou até cerca de 4 dias. A cultura de célula é ainda expandida em um vaso de cultura maior (por exemplo, um saco de células de 20 L, um saco de células de 100 L e semelhantes) contendo meio isento de soro, por exemplo, meio CD-CHO, em uma temperatura adequada para crescimento, por exemplo, de cerca de 35°C a cerca de 39°C ou de cerca de 36°C a cerca de 38°C, durante cerca de 3-4 dias ou até cerca de 4 dias até as células atingirem uma densidade de cultura alvo (por exemplo, tendo pelo menos cerca de $1,5 \times 10^6$ células viáveis/ml ou em que a viabilidade de cultura final é mais de ou igual a 80%). Em uma modalidade, a expansão de inóculo envolve um mínimo de 4 passagens. Em outra modalidade da invenção, expansão de inóculo requer não mais do que 20 passagens. Em algumas modalidades, o meio CD-CHO é o meio de inóculo CD-CHO.

A cultura original estendida pode, então, ser usada para inocular um tanque de cultura em larga escala (por exemplo, um bio-reator de 1000L, 4000L e semelhantes), contendo meio de cultura isento de soro (por exemplo, meio CD-CHO, tais como meio de inóculo CD-CHO e/ou meio basal CD-CHO) para propagar adicionalmente a cultura de células em uma temperatura adequada, por exemplo, de cerca de 35°C a cerca de 39°C ou de cerca de 36°C a cerca de 38°C durante de cerca de 3 a cerca de 6 dias ou durante de cerca de 4 a cerca de 5 dias ou durante cerca de 4,7 dias ou durante menos de ou igual a cerca de 113 horas, até que as células atinjam uma densidade de cultura alvo (por exemplo, tendo cerca de $2,3 \times 10^6$ células viáveis/ml ou

em que a viabilidade final da cultura de células seja de pelo menos cerca de 88%).

5 Uma cultura em escala comercial (por exemplo uma cultura de 10.000L, 15.000L, 20.000L, 30.000L em um bio-reator e semelhantes) é subseqüentemente mantida em meio de cultura isento de soro, em que o meio é um meio de alimentação (por exemplo, meio eRDF, EXEMPLO 19), em uma temperatura de cerca de 35°C a cerca de 39°C durante de cerca de 3 a cerca de 6 dias ou de cerca de 4 a cerca de 5 dias, adequado para expressão de proteína e produção do produto de proteína secretado. Alternati-
10 vamente, um composto polianiônico (por exemplo, tal como sulfato de dextrana) pode ser adicionado à cultura mantida em meio de cultura isento de soro, em que o meio é um meio de alimentação (por exemplo, meio eRDF, EXEMPLO 19) conforme descrito abaixo e na Publicação de Pedido de Pat. U.S. No. 2005/0019859, a qual é incorporada aqui por referência em sua
15 totalidade. A cultura pode ser concomitantemente submetida a uma única etapa de diminuição de temperatura (por exemplo, em ou cerca de 32°C a em ou cerca de 36°C durante de cerca de 3 a cerca de 14 dias ou durante de cerca de 10 a cerca de 13 dias ou durante de cerca de 234 a cerca de 304 horas).

20 Em uma modalidade da invenção, a cultura pode também ser concomitantemente submetida a uma diminuição de temperatura em múltiplas etapa (por exemplo, em ou cerca de 33°C a em ou cerca de 35°C durante cerca de 3-6 dias e em ou cerca de 31°C a em ou cerca de 33°C durante cerca de 6-8 dias). O processo acima descrito é adequado para expressão e
25 produção de proteína do produto de proteína secretado.

O meio de alimentação nos casos descritos acima pode ser substituído diariamente (1, 2, 3, etc. vezes ao dia) ou a cada uns poucos dias por meio de alimentação fresco. A reposição do tanque com meio de alimentação fresco requer a remoção de um volume predeterminado, por exemplo,
30 80% do volume do tanque e reposição do tanque com o mesmo volume de meio de alimentação fresco. A cultura em escala comercial é mantida até que as células atinjam um valor alvo de parâmetros de produção que podem

ser, mas não estão limitados a, a extensão de tempo, uma densidade celular alvo ou característica bioquímica de proteína (tal como uma proporção molar de NANA conforme previamente descrito), em que a densidade celular viável pode ser de $3,0-8,0 \times 10^6$ células/ml; a proporção molar de NANA pode ser \geq 5,0 ou cerca de 6 ou de cerca de 5,2 a cerca de 7,6; a viabilidade celular final de cultura pode ser maior do que ou igual a cerca de 30% ou maior do que ou igual a cerca de 37%; e uma titulação final de produto de proteína que pode ser de cerca de 0,46 a cerca de 0,71 g/L, mais de ou igual a 0,5 g/L ou mais de ou igual a 20 g/L.

10 De acordo com a presente invenção, um processo de cultura de célula envolvendo a adição retardada de composto polianiônico é proporcionado. O processo compreende adição de composto polianiônico a uma cultura de célula em um momento após inoculação (por exemplo, durante a fase de crescimento ou durante a fase de produção de um processo de cultura). A adição retardada de composto polianiônico obtém viabilidade celular
15 aumentada. Em uma modalidade, a invenção é dirigida a um processo de cultura de célula que compreende cultura de células hospedeiras as quais expressam uma proteína de interesse e adição de composto polianiônico à cultura de célula em um momento após inoculação.

20 Composto polianiônicos incluem, mas não estão limitados a, sulfato de dextrana (disponível da Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo.), heparina (disponível da Sigma-Aldrich), sulfato de heparana (disponível da Sigma-Aldrich), sulfato de manana, sulfato de condroitina (disponível da Sigma-Aldrich), sulfato de dermatana (disponível da Sigma-Aldrich), sulfato de queratana (disponível da Sigma-Aldrich), hialuronato (disponível da Sigma-Aldrich), sulfato de (poli)vinila (disponível da Sigma-Aldrich), kappa-carrageenana (disponível da Sigma-Aldrich) e suramina (disponível da Sigma-Aldrich). Os compostos estão prontamente disponíveis das fontes listadas ou prontamente obteníveis através de meios conhecidos por aqueles
25 habilitados na técnica. Esses compostos estão freqüentemente disponíveis na forma de um sal incluindo, mas não limitado a, um sal de sódio, mas também podem ser usados nas formas de não-sal. um composto polianiônico
30

inclui todas as formas do mesmo incluindo, mas não limitado a, formas de sal, tais como sais de sódio.

Exemplos particularmente úteis não limitativos de compostos polianiónicos da invenção incluem compostos poli-sulfatados: sulfato de dextrana, heparina, sulfato de heparana, sulfato de manana, sulfato de condroitina, sulfato de dermatana, sulfato de queratana, sulfato de (poli)vinila, kappa-carrageenana e suramina. Em uma modalidade, o composto polianiónico é sulfato de dextrana. Sulfato de dextrana pode ter um peso molecular médio calculado de 5.000 a 500.000 Da. Em outra modalidade da invenção, sulfato de dextrana tendo um peso molecular de 5.000 Da é usado.

De acordo com os métodos da invenção, o composto polianiónico pode ser adicionado à cultura de células uma vez, duas vezes, três vezes ou qualquer número de vezes durante o período de cultura de células especificado (por exemplo, em um momento após inoculação, tal como durante a fase de crescimento ou a fase de produção). Um ou mais compostos polianiónicos podem ser usados em conjunto. Por exemplo, qualquer dada única adição de um composto polianiónico pode incluir a adição de um ou mais de outros compostos polianiónicos. Similarmente, se há mais de uma adição de um composto polianiónico, diferentes compostos polianiónicos podem ser adicionados em diferentes adições. Compostos e substâncias adicionais, incluindo compostos polianiónicos, podem ser adicionados à cultura antes, com ou após a adição de composto polianiónico, durante ou não durante o período de tempo especificado. Em a particular modalidade, há uma única, por exemplo, uma vez, adição de composto polianiónico. Em outra modalidade, um composto polianiónico é adicionado.

O composto polianiónico pode ser adicionado à cultura de célula através de qualquer meio. Meios para a adição de composto polianiónico incluem, mas não estão limitados a, dissolução em água, dissolução em meio de cultura, dissolução em meio de alimentação, dissolução em um meio adequado e em uma forma na qual ele é obtido. Em particular, o composto polianiónico é adicionado dissolvido em água. De acordo com a invenção, o composto polianiónico é adicionado para levar a concentração na cul-

tura para um nível apropriado. Como exemplos não limitativos, o composto polianiônico é adicionado a uma concentração de 1-1000 mg/L, 1-200 mg/L, 1-100 mg/L ou 25-75 mg/L. Concentrações particularmente úteis de composto polianiônico adicionado à cultura de célula incluem, mas não estão limita-

5 das a, cerca de 25-200 mg/L; cerca de 25-100 mg/L; e cerca de 50-100 mg/L. Em uma modalidade da invenção, a concentração de composto polianiônico adicionado à cultura é cerca de 50 mg/L. Em outra modalidade, a concentração de composto polianiônico adicionado à cultura é cerca de 100 mg/L.

10 Métodos da invenção proporcionam que a cultura pode ser operada durante qualquer extensão de tempo após a adição de composto polianiônico. O tempo de operação de cultura pode ser determinado por aqueles habilitados na técnica, baseado em fatores relevantes, tais como a quantidade e qualidade de proteína recuperável e o nível de espécies celulares con-

15 taminantes (por exemplo, proteínas e DNA) no sobrenadante resultante de lise celular, o que complicará a recuperação da proteína de interesse. Em algumas modalidades do processo de cultura de célula, o composto polianiônico é adicionado em um momento após inoculação (por exemplo, durante a fase de crescimento do processo de cultura de célula ou durante a fase de

20 produção do processo de cultura de célula). Composto polianiônico é adicionado em um momento após inoculação que é durante ou em torno do final da fase de crescimento. Em particular, o composto polianiônico é adicionado em um momento após inoculação que é durante a fase de produção, por exemplo, no início da fase de produção.

25 Em uma modalidade particular da presente invenção, as células cultivadas em um processo de alimentação em batelada são células de mamífero, por exemplo, células CHO, as quais expressam um produto de proteína desejado (por exemplo, uma molécula de CTLA4^{A29YL104E}-Ig). Células CHO são inoculadas em um vaso de cultura de (por exemplo, um frasco T-

30 175) contendo meio de cultura isento de soro, por exemplo, meio CD-CHO (tal como meio de inóculo CD-CHO) e propagadas em uma temperatura adequada para crescimento, por exemplo, em cerca de 37 °C, durante cerca

de 3-4 dias, até que as células atinjam uma densidade de cultura cruzada predeterminada (por exemplo, tendo $\geq 1,5 \times 10^6$ células viáveis ou em que a viabilidade final de cultura $\geq 80\%$). A cultura original propagada é, então, transferida para um vaso de cultura grande (por exemplo, garrafas giratórias) contendo meio de cultura carecendo de componentes derivados de animal para expansão em uma temperatura adequada (em torno de 37°C) durante cerca de 4 dias. A cultura de células é ainda expandida em um vaso de cultura grande (por exemplo, um saco de células de 20 L, um saco de células de 100 L e semelhantes) contendo meio isento de soro, por exemplo, meio CD-CHO (tal como meio de inóculo CD-CHO), durante cerca de 4 dias em uma temperatura adequada para crescimento (por exemplo, em cerca de 37°C) até que as células atinjam uma densidade de cultura alvo (por exemplo, tendo $\geq 1,5 \times 10^6$ células viáveis ou em que a viabilidade final de cultura $\geq 80\%$). A expansão de inóculo pode envolver um mínimo de 7 passagens.

A cultura original expandida é, então, usada para inocular um tanque de cultura em larga escala (por exemplo, um bio-reator de 1000-L, 4000-L e semelhantes), contendo meio de cultura isento de soro (por exemplo, meio CD-CHO, tal como meio basal CD-CHO) para propagar adicionalmente a cultura de célula em uma temperatura adequada, por exemplo, em cerca de 37°C , durante cerca de 5-6 dias, até que as células atinjam uma densidade de cultura alvo (por exemplo, tendo cerca de $2,3 \times 10^6$ células viáveis/ml ou em que a viabilidade final das culturas de célula $\geq 88\%$). A cultura em escala comercial (por exemplo, uma cultura de 10.000L, 15.000L ou 20.000 L e semelhantes em um bio-reator) é subsequente mantida em um meio de cultura isento de soro, em que o meio é um meio de alimentação (por exemplo, meio eRDF), em uma temperatura menor do que a temperatura de crescimento, a qual é adequada para expressão de proteína e produção do produto de proteína secretado (por exemplo, a CTLA4^{A29YL104E}-Ig).

A cultura em escala comercial é diminuída, por exemplo, de cerca de 37°C para cerca de 34°C durante cerca de 4 dias. O composto polianiónico pode ser adicionado concomitantemente à cultura quando a tempe-

ratura é diminuída. Alternativamente, a cultura em escala comercial é diminuída de cerca de 35 °C-37 °C para cerca de 32 °C-36 °C durante cerca de 12 dias e o composto polianiónico é concomitantemente adicionado à medida que a temperatura é diminuída.

5 O meio de alimentação nos casos descritos acima pode ser substituído diariamente (1, 2, 3, etc. vezes ao dia) ou a cada alguns dias por meio de alimentação fresco. A reposição do tanque com meio de alimentação fresco requer a remoção de um volume predeterminado, por exemplo, 80% do volume do tanque e reposição do tanque com o mesmo volume de
10 meio de alimentação fresco. Em uma modalidade, o meio de alimentação é adicionado diariamente cerca de 2 a 3 dias até, por exemplo, a concentração de glicose cair para 1 g/L. Em outra modalidade, o meio de alimentação é adicionado a cada 8 horas, por exemplo, uma vez que a concentração de glicose tenha atingido 1 g/L. A escala comercial é mantida até que as referi-
15 das células CHO e/ou produto de proteína secretado atinja um valor alvo dos seguintes parâmetros de produção não limitativos: uma proporção molar de NANA de cerca de 6,0 ou de cerca de 5,2 a cerca de 7,6; uma viabilidade final de cultura de células $\geq 37\%$; e uma titulação final de produto de proteína de cerca de 0,46 a cerca de 0,71 g/L.

20 Em uma modalidade da presente invenção, as células que estão sendo cultivadas podem ser células de mamífero ou uma linhagem de células de mamífero estabelecida incluindo, sem limitação, CHO (por exemplo, ATCC CCL 61), HEK293 (por exemplo, ATCC CRL 1573; Graham e colaboradores, J. Gen. Virol. 36: 59-72, 1977), COS-1 (por exemplo, ATCC CRL
25 1650), DG44 (linhagem de célula CHO) (Cell, 33: 405, 1983 e Somatic Cell and Molecular Genetics 12: 555, 1986) e linhagens de células de rim de hamster bebê (BHK). Outros exemplos não limitativos úteis são mielomas, células 3T3, células Namala e fusões de mielomas com outras células. Em algumas modalidades, as células podem ser células mutantes ou recombi-
30 nantes tais como, por exemplo, células que expressam um espectro diferente de enzimas que catalisam a modificação pós-traducional de proteínas (por exemplo, enzimas de processamento, tais como pró-peptídeos ou enzimas

de glicosilação, tais como glicosil transferases e/ou glicosidasas) do que um tipo de célula do qual elas foram derivadas. Em um aspecto particular da presente invenção, células CHO/*dhfr*- são particularmente utilizadas.

Um vaso de cultura usado para expansão da cultura de célula
5 pode ser, mas não está limitado a, frascos de Erlenmyer, frascos T-175, garrafas giratórias e sacos de células. Os vasos de cultura em grande escala podem ser, por exemplo, reatores aéreos onde agitação é obtida por meio de introdução de ar do fundo do vaso ou reatores com tanque agitado convencional (CSTR), onde agitação é obtida por meio de propulsores do tipo
10 convencional. Dentre os parâmetros controlados dentro de limites especificados estão temperatura, pH e tensão de oxigênio dissolvido (DOT). O meio de controle de temperatura nesse sistema é água e pode ser aquecido ou resfriado, conforme necessário. A água pode ser passada através de uma tubulação em espiral imersa em um meio de cultura de células ou através de
15 uma camisa circundando o vaso. O pH, por exemplo, pode ser regulado através da adição de base a um meio de cultura de células quando requerido ou variando a concentração de CO₂ do gás no *headspace*. DOT pode ser mantido através de purgação com oxigênio puro ou ar ou misturas dos mesmos.

20 A invenção, portanto, proporciona um método para produção de uma proteína recombinante, o método compreendendo pelo menos duas etapas: (a) expansão de células de mamífero que secretam uma proteína recombinante (isto é, uma proteína que as células de mamífero normalmente não expressam ou superexpressam, onde a proteína recombinante é expressa nas células via um vetor ou estrutura de expressão que tenha sido
25 transfectada nas células ou os precursores das células) de uma cultura originária para uma cultura líquida de pelo menos 10.000L e (b) isolamento da proteína recombinante de uma cultura líquida de pelo menos 10.000 L. Em uma modalidade, esse método pode ser usado de modo que a proteína recombinante seja produzida em uma concentração de pelo menos 0,5 gramas
30 por litro de cultura líquida antes de purificação da proteína da cultura líquida. Em outra modalidade, o método de acordo com a invenção pode ser usado

para produzir uma proteína recombinante em uma concentração de pelo menos de cerca de 0,46 a cerca de 0,71 gramas por litro de cultura líquida antes de purificação da proteína da cultura líquida.

Em uma modalidade, a etapa de expansão pode envolver (i) cultura das células em um meio isento de soro com pelo menos quatro passagens, de modo a obter uma densidade celular de pelo menos cerca de $1,0 \times 10^5$ células viáveis por mL e (ii) manutenção das células em cultura durante um tempo suficiente para produzir pelo menos cerca de 0,5 da proteína recombinante. Em uma modalidade, o número de passagens não excede a 36 passagens. Em outra modalidade, o número de passagens pode exceder a 36 passagens, onde as células são estáveis durante gerações com relação ao número de cópia do ácido nucleico que codifica uma proteína recombinante, viabilidade celular e tempo de duplicação.

O tempo suficiente para produzir pelo menos cerca de 0,5 a cerca de 1,3 g/L da proteína recombinante pode ser qualquer quantidade de tempo, na medida em que a viabilidade celular não cai abaixo de 5%, 10%, 25%, 30%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98% e/ou na medida em que o número de gerações de célula não excede a 50, 75, 100, 105 ou 125 gerações. A etapa de manutenção pode também compreender etapas de desvio de temperatura, tais como diminuição da temperatura da cultura primeiro de $37 \pm 2^\circ\text{C}$ para $34 \pm 2^\circ\text{C}$ e, em um momento posterior, de $34 \pm 2^\circ\text{C}$ para $32 \pm 2^\circ\text{C}$. A temperatura de $32 \pm 2^\circ\text{C}$ pode ser mantida durante pelo menos 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 20, 30, 50 ou 100 dias. A temperatura de $32 \pm 2^\circ\text{C}$ pode ser mantida durante pelo menos 20, 50, 75 ou 100 gerações de células. A temperatura de $32 \pm 2^\circ\text{C}$ pode ser mantida até que a densidade celular da cultura seja de cerca de 30 a cerca de 100×10^5 células por mL de cultura líquida.

Em outras modalidades, a invenção proporciona métodos para produção de uma proteína recombinante, o método compreendendo pelo menos as etapas de: (a) expansão de células de mamífero que secretam uma proteína recombinante de uma cultura originária para uma cultura líquida de pelo menos 10.000L, de modo que a concentração de proteína re-

combinante é pelo menos 0,5 gramas/L de cultura líquida; e (b) isolamento da proteína recombinante de uma cultura líquida de pelo menos 10.000 L quando a cultura líquida: (i) contém mais de ou igual a cerca de 6,0 moles de NANA por mol de proteína (glicoproteína nesse caso); (ii) tem uma densidade celular de cerca de 33 a cerca de 79×10^5 células por mL; (iii) a viabilidade celular na cultura líquida não é menos de cerca de 38% ou é mais de ou igual a cerca de 38%; (iv) a endotoxina é menos de ou igual a cerca de 76,8 EU por mL de cultura líquida; e/ou (v) a biocarga é menos de 1 unidade formação de colônia por mL de cultura líquida.

10 Em uma outra modalidade, a etapa de expansão pode envolver (i) cultura das células em um meio isento de soro com pelo menos quatro passagens, de modo a obter uma densidade celular de pelo menos cerca de $1,0 \times 10^6$ células viáveis por mL e (ii) manutenção das células em cultura durante um tempo suficiente para produzir pelo menos de cerca de 0,46 a
15 cerca de 0,71 gramas da proteína recombinante por litro de cultura líquida. Em uma modalidade, o número de passagens não excede a 36 passagens. Em outra modalidade, o número de passagens pode exceder 36 passagens, onde as células são estáveis durante gerações com relação ao número de cópias obtido do ácido nucleico que codifica a proteína recombinante, viabili-
20 dade celular e tempo de duplicação.

O tempo suficiente para produzir de cerca de 0,46 a cerca de 0,71 g/L da proteína recombinante pode ser qualquer quantidade de tempo, na medida em que a viabilidade celular não caia abaixo de 5%, 10%, 25%, 30%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98% e/ou na medida em que o nú-
25 mero de gerações de células não exceda a 27, 50, 75, 100, 105 ou 125 gerações. A etapa de manutenção pode também compreender etapas de desvio de temperatura, tal como diminuição da temperatura da cultura primeiro de $37 \pm 2^\circ\text{C}$ para $34 \pm 2^\circ\text{C}$. A temperatura de $34 \pm 2^\circ\text{C}$ pode ser mantida du-
30 rante pelo menos 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 20, 30, 50 ou 100 dias. Alternativamente, a etapa de manutenção pode ser uma etapa de desvio de temperatura, tal como diminuição da temperatura da cultura de $37 \pm 2^\circ\text{C}$ para $34 \pm 2^\circ\text{C}$.

Composto polianiônico pode ser adicionado às culturas à medida que a diminuição de temperatura começa. A concentração de compostos polianiônico adicionado à cultura pode ser cerca de 1 mg/L, 5 mg/L, 10 mg/L, 12,5 mg/L, 15 mg/L, 25 mg/L, 50 mg/L, 75 mg/L, 100 mg/L, 200 mg/L, 250 mg/L, 500 mg/L, 750 mg/L ou 1000 mg/L. A temperatura de $32 \pm 2^\circ\text{C}$ pode ser mantida durante pelo menos 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 20, 30, 50 ou 100 dias. A temperatura de $34 \pm 2^\circ\text{C}$ pode ser mantida durante pelo menos 20, 27, 50, 75 ou 100 gerações de célula.

Em outras modalidades, a invenção proporciona métodos para a produção de uma proteína recombinante, o método compreendendo pelo menos as etapas de: (a) expansão de células de mamífero que secretam uma proteína recombinante de uma cultura originária para uma cultura líquida de pelo menos 10.000L, de modo que a concentração de proteína recombinante é pelo menos de cerca de 0,46 a cerca de 0,71 gramas por litro de cultura líquida; e (b) isolamento da proteína recombinante da cultura de pelo menos 10.000 L de cultura líquida quando a cultura líquida: (i) contém cerca de 6 moles de NANA por mol de proteína (glicoproteína nesse caso); (ii) a viabilidade celular na cultura líquida não é menos de cerca de 37%; (iii) a endotoxina é menos de ou igual a cerca de 4,8 EU por mL de cultura líquida; e/ou (iv) a biocarga é menos de 1 unidade formação de colônia por mL de cultura líquida.

A proteína recombinante produzida através desses métodos da invenção pode ser uma proteína secretada, uma glicoproteína, uma citocina, um hormônio, uma proteína de CTLA4-Ig ou uma proteína de CTLA4^{A29YL104E}-Ig. Em uma modalidade, as células de mamífero são uma prole ou subclones de células proporcionadas pela invenção. Em outra modalidade, as células de mamífero são a prole ou subclones de células derivadas da linhagem de células da invenção. Em uma outra modalidade, as células de mamífero são uma população clonal de células transfectadas com um cassete de expressão compreendendo SEQ ID NO: 1. Em uma modalidade particular, as células de mamífero são uma população clonal de células transfectadas com um cassete de expressão compreendendo SEQ ID NO: 3.

Técnicas gerais para a purificação de Proteína recombinante de Cultura

Após uma fase de produção de proteína em um processo de cultura de célula, a proteína de interesse, por exemplo uma glicoproteína, é recuperada do meio de cultura de célula usando técnicas compreendidas por aqueles habilitados na técnica. Em particular, a proteína de interesse é recuperada do meio de cultura como um polipeptídeo secretado, embora ela também possa ser recuperada dos lisatos de célula hospedeira. O meio de cultura ou lisato é inicialmente centrifugado para remover resíduos e partículas de células. A proteína desejada é subseqüentemente purificada do DNA contaminante, proteínas e polipeptídeos solúveis, com os seguintes procedimentos de purificação bem estabelecidos na técnica: SDS-PAGE; precipitação com sulfato de amônio; precipitação com etanol; fracionamento sobre colunas de imunoafinidade ou troca de íons; HPLC de fase reversa; cromatografia sobre sílica ou uma resina de troca de ânions, tal como QAE ou DE-AE; cromatofocalização; filtração em gel usando, por exemplo, uma coluna Sephadex G-75™; e colunas de proteína A Sepharose™ para remover contaminantes, tal como IgG. A adição de um inibidor de protease, tal como fluoreto de fenil metil sulfonila (PMSF) ou uma mistura de coquetel de inibidor de protease também pode ser útil para inibir a degradação proteolítica durante purificação. Aquelos habilitados na técnica reconhecerão que métodos de purificação adequados para uma proteína de interesse, por exemplo, uma glicoproteína, podem requerer alterações para levar em conta mudanças no caráter da proteína quando de expressão em uma cultura de células recombinante.

Técnicas de purificação é métodos que selecionam os grupos carboidrato da glicoproteína são também de utilidade dentro do contexto da presente invenção. Por exemplo, tais técnicas incluem HPLC ou cromatografia de troca de íons usando resinas de troca de cátions ou de troca de ânions, em que a fração mais básica ou mais ácida é coletada, dependendo de qual carboidrato está sendo selecionado. O uso de tais técnicas também pode resultar na remoção concomitante de contaminantes.

Na presente invenção, células CHO capazes de produzir proteí-

nas de fusão de CTLA4-Ig ou CTLA4^{A29YL104E}-Ig são crescidas como uma suspensão em um meio CHO-específico até uma densidade celular predefinida. Células CHO crescidas em suspensão no meio de expressão sem soro subsequentemente produzem moléculas de CTLA4-Ig ou CTLA4^{A29YL104E}-Ig, as quais são secretadas pelas células CHO no meio de cultura. A suspensão de células pode ser clivada via centrifugação e moléculas de CTLA4-Ig podem, então, ser separadas do sobrenadante de cultura clarificado de técnicas padrões de purificação. Exemplos não limitativos de procedimentos de purificação adequados para obtenção de maior pureza e homogeneidade de CTLA4-Ig ou CTLA4^{A29YL104E}-Ig, individualmente ou em combinação, são: cromatografia por afinidade sobre sepharose; fracionamento sobre colunas de troca de ânions (AEC); e cromatografia de interação hidrofóbica (HIC).

Em algumas modalidades, isolamento de moléculas de CTLA4-Ig ou outras proteínas (incluindo glicoproteínas) dos métodos de produção descritos aqui podem pelo menos incluir as etapas seguintes: (i) obtenção de uma cultura de célula sobrenadante; (ii) sujeição do sobrenadante à cromatografia de troca de ânions para obter um produto de proteína eluído; (iii) sujeição do produto de proteína eluído da etapa (ii) à cromatografia de interação hidrofóbica, de modo a obter um produto de proteína enriquecido; (iv) sujeição do produto de proteína enriquecido à cromatografia por afinidade para obter um produto de proteína enriquecido eluído; e (v) sujeição do produto de proteína enriquecido eluído de (iv) à cromatografia de troca de ânions. O produto de proteína enriquecido obtido na etapa (iii) pode ser caracterizado, por exemplo, em que seu percentual de qualquer proteína de HMW ou contaminante é menos de 5, 10, 15 ou 25%. A cromatografia de troca de ânions da etapa (ii) pode ser realizada, por exemplo, através de uso de um tampão de lavagem compreendendo cerca de 25-100 mM HEPES e cerca de 300-900 mM NaCl e tendo um pH de cerca de 7,0-8,0. A cromatografia de interação hidrofóbica da etapa (iii) pode ser realizada, por exemplo, através de uso de um único tampão de lavagem tendo um pH de cerca de 7,0 e compreendendo HEPES a cerca de 25 mM e NaCl a cerca de 850 mM; ou

um tampão de lavagem tendo um pH de cerca de 8,0 e compreendendo Tris a cerca de 25 mM e cerca de 250 mM NaCl. A cromatografia por afinidade da etapa (iv) pode ser realizada, por exemplo, através de uso de um tampão de eluição tendo um pH de cerca de 3,5 e compreendendo Glicina a cerca de 100 mM. A cromatografia por afinidade da etapa (v) pode ser realizada, por exemplo, através de uso de um tampão de lavagem tendo um pH de cerca de 8,0 e compreendendo HEPES a cerca de 25 mM e NaCl de cerca de 120 mM a NaCl a cerca de 130 mM ou um tampão de lavagem tendo um pH de cerca de 8,0 e compreendendo HEPES a cerca de 25 mM e NaCl a cerca de 200 mM. A cromatografia de troca de ânions da etapa (ii) pode ser realizada usando uma coluna tendo uma resina de troca de ânions tendo um grupo amina primária, secundária, terciária ou quaternária. A coluna de interação hidrofóbica da etapa (iii) pode ser realizada usando uma resina de interação hidrofóbica tendo um grupo funcional fenila, um octila, um propila, um alcóxi, um butila ou um isoamila.

Em outras modalidades, isolamento de moléculas de C-TLA4^{A29YL104E}-Ig ou outras proteínas (incluindo glicoproteínas) dos métodos de produção descritos aqui pode pelo menos incluir as etapas seguintes: (i) obtenção de uma cultura de célula sobrenadante; (ii) sujeição do sobrenadante à cromatografia por afinidade para obter um produto de proteína eluído; (iii) sujeição do produto de proteína eluído da etapa (ii) à cromatografia de troca de ânions de modo a obter um produto de proteína enriquecido; e (iv) sujeição do produto de proteína enriquecido à cromatografia de interação hidrofóbica para obter um produto de proteína enriquecido eluído com complexos de espécies de elevado peso molecular (HMW)/proteína reduzidos. O produto de proteína enriquecido obtido na etapa (iv) pode ser caracterizado, por exemplo, em que seu percentual de qualquer proteína de HMW ou contaminante é menos de 5, 10, 15 ou 25%. A cromatografia por afinidade da etapa (ii) pode ser realizada, por exemplo, através de uso de um tampão de eluição tendo um pH de cerca de 3,0 e compreendendo Glicina a cerca de 250 mM. A cromatografia por afinidade da etapa (ii) pode ser realizada, por exemplo, através de uso de um tampão de lavagem tendo um pH de cerca

de 7,5 e compreendendo cerca de 25 mM NaH_2PO_4 e NaCl a cerca de 150 mM. A cromatografia de troca de ânions da etapa (iii) pode ser realizada, por exemplo, através de uso de um tampão de lavagem compreendendo HEPES a cerca de 50 mM e NaCl a cerca de 135 mM e tendo um pH de cerca de 7,0. A cromatografia de troca de ânions da etapa (iii) pode ser realizada, por exemplo, através de uso de um tampão de eluição compreendendo HEPES a cerca de 50 mM e NaCl a cerca de 200 mM e tendo um pH de cerca de 7,0. A cromatografia de interação hidrofóbica da etapa (iv) pode ser realizada, por exemplo, através de uso de um tampão de lavagem tendo um pH de cerca de 7,0 e compreendendo HEPES a cerca de 50 mM e cerca de 1,2 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. A cromatografia de troca de ânions da etapa (iii) pode ser realizada usando uma coluna tendo uma resina de troca de ânions tendo um grupo amina primária, secundária, terciária ou quaternária. A coluna de interação hidrofóbica da etapa (iv) pode ser realizada usando uma resina de interação hidrofóbica tendo um grupo funcional fenila, um octila, um propila, um alcóxi, um butila ou um isoamila.

Em uma modalidade, a invenção proporciona um método para purificação de moléculas de CTLA4-Ig de uma cultura de célula líquida, de modo que uma CTLA4-Ig purificada é substancialmente isenta de Proteína-1 quimiotática de monócitos (MCP-1). Em uma modalidade, a invenção proporciona uma composição farmacologicamente aceitável de moléculas de CTLA4-Ig, em que a composição compreende não mais do que 0,5 ppm de MCP-1, 1 ppm de MCP-1, 2 ppm de MCP-1, 3 ppm de MCP-1, 4 ppm de MCP-1, 5 ppm de MCP-1, 6 ppm de MCP-1, 7 ppm de MCP-1, 8 ppm de MCP-1, 9 ppm de MCP-1 ou 10 ppm de MCP-1, em outra modalidade, na composição, a quantidade MCP-1 não pode exceder a 1%, 0,5% ou 0,1% do peso de CTLA4-Ig purificada. Em outra modalidade, a composição de moléculas de CTLA4-Ig é substancialmente isenta de MCP-1 onde há menos de 50, 45, 40, 38, 35, 30, 25, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 ou 1 ng/mL de MCP-1 no eluato líquido de QFF. Em outra modalidade, a invenção proporciona um método para purificação de moléculas de CTLA4-Ig de uma cultura de célula líquida, de modo que uma CTLA4-Ig purificada é substancialmente

isenta de MCP-1 e compreende menos de 2,5% de tetrâmero de CTLA4-Ig.

A quantidade de proteína 1 quimiotática de monócito (MCP-1) na composição pode ser quantificada usando um método ELISA. O anticorpo de revestimento é um anticorpo de IgG anti-MCP-1 de camundongo de bezerro.

- 5 O anticorpo secundário é um anticorpo de IgG anti-MCP-1 de rato de coelho. Detecção é realizada usando anticorpo anti-coelho de cabra conjugado à peroxidase de armorácia e o substrato TMB. O reagente peroxidase de armorácia produz uma reação colorimétrica que se desenvolve em proporção à quantidade de proteína capturada. O ELISA quantifica o nível de MCP-1
- 10 com relação à Curva Padrão de Material. Em uma modalidade, MCP-1 foi quantificada na composição e os níveis de MCP-1 estavam em faixas de 0-0,097 ng/mg e 0,014-0,154 ng/mg.

- Em outra modalidade, a invenção proporciona um método para a purificação de moléculas de CTLA4^{A29YL104E}-Ig de uma cultura de célula lí-
- 15 quida, de modo que a CTLA4^{A29YL104E}-Ig purificada é substancialmente isenta de Proteína-1 quimiotática de monócitos (MCP-1). Em uma modalidade, a quantidade MCP-1 não pode exceder a 1%, 0,5% ou 0,1% do peso da CTLA4^{A29YL104E}-Ig purificada. Em outra modalidade, CTLA4^{A29YL104E}-Ig é substancialmente isenta de MCP-1, onde há menos de 50, 45, 40, 38, 35 ou 30
- 20 ng/mL de MCP-1 no eluato líquido de HIC. Em uma outra modalidade, a invenção proporciona um método para purificação de moléculas de CTLA4^{A29YL104E}-Ig de uma cultura de célula líquida, de modo que a CTLA4^{A29YL104E}-Ig purificada é substancialmente isenta de MCP-1 e compre-
- ende menos de 2,5% de tetrâmero de CTLA4^{A29YL104E}-Ig.

25 Recuperação de Glicoproteína de uma cultura de célula e

Purificação

- A presente invenção descreve uma série de etapas para a separação de uma glicoproteína (por exemplo, CTLA4-Ig ou CTLA4^{A29YL104E}-Ig) de um sobrenadante de cultura de células impuro, empoçamento da proteína
- 30 contém a glicoproteína de interesse (tal como CTLA4-Ig ou CTLA4^{A29YL104E}-Ig) e contaminantes indesejados. O sobrenadante de cultura de células impuro pode ser usado como o material de iniciação para a purificação da gli-

coproteína de CTLA4-Ig ou CTLA4^{A29YL104E}-Ig.

5 Em uma modalidade da presente invenção, o sobrenadante de cultura de célula que contém glicoproteína de CTLA4-Ig e contaminantes indesejáveis é aplicado a um meio de troca de ânions. A glicoproteína de CTLA4-Ig presente no sobrenadante de cultura de célula se liga ao meio de troca de ânions. O meio de troca de ânions é, então, lavado para remover qualquer material não ligado do meio de troca de ânions. A glicoproteína de CTLA4-Ig é eluída após o material não ligado ser removido e o eluato é coletado.

10 Em uma modalidade da presente invenção, o sobrenadante de cultura de célula impuro que contém glicoproteína de CTLA4^{A29YL104E}-Ig e contaminantes indesejáveis é aplicado a um meio de cromatografia por afinidade. A glicoproteína de CTLA4^{A29YL104E}-Ig presente no sobrenadante de cultura de célula impuro se liga a um meio de cromatografia por afinidade. O meio de cromatografia por afinidade é, então, lavado para remover qualquer material não ligado do meio de troca de ânions. A glicoproteína de CTLA4^{A29YL104E}-Ig é eluída após o material não ligado ser removido e o eluato é coletado.

20 Em uma modalidade particular da presente invenção, uma cromatografia de troca de íons em Q-Sepharose (AEC), por exemplo, usando uma coluna Q-Sepharose XL (GE Healthcare), é empregada para separar glicoproteína de CTLA4-Ig do material coletado, bem como para diminuir contaminantes. Essa coluna pode ser usada como uma etapa inicial na purificação de glicoproteína de CTLA4-Ig de uma cultura de células de mamífero, para fracionamento do meio de cultura de células coletado. Em outra modalidade, uma cromatografia de troca de íons Q-Sepharose, por exemplo, Q-Sepharose Fast Flow (GE Healthcare), pode ser usada após uma etapa de purificação através de cromatografia por afinidade. A propriedade de fluxo muito alta das colunas de troca de ânions permite que o grande volume de glicoproteína de CTLA4-Ig ou meio de cultura de células coletado seja prontamente concentrado antes de subseqüentes etapas de cromatografia, tais como SP-Sepharose ou HIC, através de ajuste das condições de modo que

25

30

a glicoproteína de CTLA4-Ig se liga à coluna. Para um tampão de lavagem com pH de cerca de 5 a 9, em particular cerca de 8, concentrações de HEPES a 75 mM e NaCl a 360 mM são úteis. Tipicamente, para um tampão de eluição com pH de cerca de 5 a 8, em particular cerca de 7, concentrações

5 de HEPES a 25 mM e NaCl a 325 mM são úteis.

Resinas adequadas para separação de glicoproteína de CTLA4-Ig do meio de cultura coletado foram aquelas tendo grupos funcionais amina imobilizados. Mais úteis são as resinas com um grupo funcional de amina quaternária, por exemplo, aquelas sobre as resinas Q-Sepharose Fast Flow da GE Healthcare, onde um ligante de amônio quaternário é ligado a uma agarose de alta porosidade reticulada. Também úteis são as resinas com um grupo funcional amina primária, secundária e terciária, por exemplo, aquelas nas resinas DEAE Sepharose Fast Flow da GE Healthcare, onde um ligante de dietilaminoetil amina terciária é ligado a uma agarose de alta porosidade

10 reticulada.

15

Em outra modalidade da presente invenção, o eluato contendo glicoproteína de CTLA4-Ig do meio de troca de ânions é coletado e, então, contatado com uma resina de interação hidrofóbica. Conforme descrito abaixo, o volume contendo glicoproteína de CTLA4-Ig passa através da coluna de HIC e o reservatório coletado, o qual pode ser ainda purificado é, então,

20 ligado a uma resina de troca de ânions.

HIC é útil para a separação de dímeros de glicoproteína de CTLA4-Ig desejados de material de espécies de elevado peso molecular e outras impurezas de proteína da cultura de células de mamífero. Por exemplo, cultura de células CHO expressando CTLA4-Ig contém agregados de espécies de elevado peso molecular de glicoproteína de CTLA4-Ig. Também encontradas no meio de cultura de células de mamífero são impurezas de proteína de células CHO. Esses produtos indesejáveis poderiam gerar uma resposta antigênica indesejada em um paciente e contribuir para a pobre

25 qualidade de produto ou atividade. HIC separa eficazmente variantes hidrofóbicas, dímeros de glicoproteína de CTLA4-Ig de complexos de HWM de glicoproteína de CTLA4-Ig e impurezas de proteína CHO via ligação dos úl-

30

timos produtos à resina de HIC e passagem dos dímeros de glicoproteína de CTLA4-Ig através da coluna. Assim, uma glicoproteína de CTLA4-Ig empoçada poderia ser obtida que é substancialmente isenta dessas espécies e que é particularmente adequada para outra etapa cromatográfica, tal como uma cromatografia de troca de íons. Uma fonte de misturas de glicoproteína de CTLA4-Ig para uso com HIC é cultura de células de mamífero, por exemplo, uma cultura de células CHO. Em particular, a cultura pode ser submetida a pelo menos uma etapa de purificação anterior, conforme discutido previamente.

10 Em outra modalidade da presente invenção, o método de HIC pode ser modificado para coletar e empoçar de outras glicoproteínas (por exemplo, complexos de HMW de CTLA4-Ig). Agregados de HMW podem se ligar à resina de HIC (por exemplo, compreendendo tetrâmero de CTLA4-Ig e semelhantes). Esses complexos de HMW têm uma maior avidéz e se ligam mais eficazmente *in vivo* do que o dímero de CTLA4-Ig apenas. Assim, 15 aqueles habilitados na técnica podem obter e empoçar agregados de HMW de CTLA4-Ig através de eluição da CTLA4-Ig empoçada da HIC.

As resinas de HIC mais úteis para separação de formas de glicoproteína de CTLA4-Ig são aquelas tendo grupos funcionais fenila imobilizados. Das resinas de phenyl-HIC, Phenyl Sepharose Fast Flow High Sub 20 (alta substituição) pela GE Healthcare é mais útil. Meio Phenyl Toyopearl pela TosoHaas e TSK Phenyl 5PW são exemplos não limitativos de outras resinas de phenyl-HIC que podem ser usadas. Outros grupos funcionais em HIC incluem, mas não são limitados a, as porções propila, octila, alcoxila, 25 butila e isoamila.

Por exemplo, um processo de cromatografia em coluna de Phenyl Sepharose Fast Flow, cromatografia de interação hidrofóbica (HIC), pode ser usado para reduzir a quantidade de espécies de elevado peso molecular de CTLA4-Ig ou CTLA4^{A29YL104E}-Ig eluídas em uma etapa de purificação por HIC (veja Exemplo 15 e Exemplo 20). Portanto, o pico de eliminação da coluna de HIC é enriquecido em espécies de HMW de CTLA4-Ig ou CTLA4^{A29YL104E}-Ig. 30

A fração não ligada contendo glicoproteína de CTLA4-Ig da etapa de purificação de HIC pode ser submetida a um método de purificação adicional, tal como cromatografia por afinidade e o eluato resultante pode, então, ser aplicado a um meio de troca de ânions. A glicoproteína de CTLA4-Ig se liga à resina de troca de ânions, a qual pode ser subsequente-
5 lavada para remover proteínas não ligadas. Após as proteínas não ligadas serem removidas, glicoproteína de CTLA4-Ig é eluída em uma resina de troca de ânions. O eluato é coletado e pode ser ainda concentrada.

Em outra modalidade da presente invenção, cromatografia por
10 afinidade, por exemplo rProtein A Sepharose Fast Flow (GE Healthcare), é empregada para enriquecer adicionalmente glicoproteína de CTLA4-Ig, a qual pode ser ainda seguido por uma etapa de cromatografia de troca de íons, por exemplo, Q-Sepharose Fast Flow (GE Healthcare). A etapa de cromatografia por afinidade pode também reduzir os níveis de impurezas de
15 proteína CHO e Proteína Quimiotática de Monócito (MCP-1, uma quimiocina). Cromatografia por afinidade envolve separação por adsorção, onde a molécula de interesse a ser purificada, por exemplo, glicoproteína CTLA4^{A29YL104E}-Ig, se liga específica e reversivelmente a um ligante imobilizado sobre alguma matriz ou resina. Alguns exemplos não limitativos de colu-
20 nas de purificação por afinidade incluem lectina; tag de afinidade (por exemplo, uma coluna GST ou coluna 6X-His); Estreptavidina; heparina; ou anticorpo (por exemplo, uma coluna de proteína A ou uma coluna de proteína G). Em particular, a presente invenção utiliza uma resina de proteína A para ligação da glicoproteína CTLA4^{A29YL104E}-Ig. Para um tampão de lavagem com
25 pH de cerca de 5 a 9, mais preferivelmente de cerca de 7,5, concentrações de Tris a 25 mM, NaH₂PO₄ a 25 mM e NaCl a 250 mM são úteis. Para um tampão de eluição com pH de cerca de 2 a 5, mais preferivelmente de cerca de 3,5, uma concentração de glicina de 100-300 mM é útil. O eluato da cromatografia por afinidade pode, então, ser neutralizado e carregado sobre
30 uma coluna de cromatografia de troca de ânions, Q-Sepharose Fast Flow sendo mais útil.

Para reduzir adicionalmente os níveis de proteína A, DNA e es-

pécies de glicoproteína de CTLA4-Ig indesejados no produto após as etapas de recuperação/purificação inicial precedentes, outra etapa de troca de íons pode ser incorporada no procedimento de purificação. A presente invenção pode empregar colunas de troca de íons comercialmente disponíveis, tais como uma coluna Q-Sepharose Fast Flow da GE Healthcare ou uma coluna DEAE Sepharose Fast Flow, também da GE Healthcare. Conforme determinado aqui, as resinas mais adequadas para separação de glicoproteína de CTLA4-Ig do meio de cultura coletada foram aquelas tendo grupos funcionais amina imobilizados. Outros grupos úteis são as resinas com grupo funcional de amina quaternária, por exemplo, aquelas em uma coluna Q-Sepharose Fast Flow da GE Healthcare, onde um ligante de amônio quaternário é ligado a uma agarose de alta porosidade reticulada. Também úteis são as resinas com grupo funcional de amina primária, secundária e terciária, por exemplo, aquelas em uma coluna DEAE Sepharose Fast Flow da GE Healthcare, onde um ligante de dietilaminoetil amina terciária é ligado a uma agarose de alta pureza reticulada. Em uma modalidade particular da invenção, uma coluna que utiliza um permutador de íons forte, tal como uma coluna Q-Sepharose Fast Flow, é utilizado.

Em uma modalidade da invenção, um eluato de glicoproteína de CTLA4-Ig é carregado sobre uma coluna de troca de ânions, por exemplo, Q-Sepharose Fast Flow. A coluna é lavada e glicoproteína de CTLA4-Ig é subseqüentemente eluída da coluna de troca de ânions. Para um tampão de lavagem com pH de cerca de 5 a 9, em uma modalidade um pH de 8, concentrações de HEPES a 25 mM e NaCl a 100-140 mM são úteis. Para um tampão de eluição com pH de cerca de 5 a 9 ou, em outra modalidade, um pH de 8, concentrações de HEPES a 25 mM e NaCl a 200 mM são úteis. A glicoproteína de CTLA4-Ig eluída do meio de troca de íons é recuperada, concentrada e lavada, através de diafiltração ou outro método adequado conhecido por aqueles habilitados na técnica, para proporcionar um produto final de glicoproteína de CTLA4-Ig purificado. O produto de glicoproteína de CTLA4-Ig preparado de acordo com o processo da presente invenção é de alta pureza, por exemplo, contendo $\geq 95\%$ do dímero de CTLA4-Ig, contendo

≤ 5% do produto de HMW de CTLA4-Ig e contendo ≤ 1% de monômero de CTLA4-Ig.

O método de purificação pode ainda compreender etapas adicionais que inativam e/ou removem vírus e/ou retrovírus que poderiam estar potencialmente presentes em um meio de cultura de células de linhagens de células de mamífero. Um número significativo de etapas de eliminação viral estão disponíveis incluindo, mas não limitado a, tratamento com caotrops, tais como uréia ou guanidina, detergentes, etapas adicionais de diafiltração/ultrafiltração, separação convencional, tais como cromatografia de troca de íons ou por exclusão de tamanho, extremos de pH, calor, proteases, solventes orgânicos ou qualquer combinação dos mesmos

Em outra modalidade da presente invenção, cromatografia por afinidade, por exemplo resina MabSelect Protein A Sepharose (GE Healthcare), é empregada para capturar glicoproteína CTLA4^{A29YL104E}-Ig, a qual pode ser ainda seguido por uma etapa de cromatografia de troca de íons, por exemplo, Q-Sepharose Fast Flow (GE Healthcare). A etapa de cromatografia por afinidade pode também reduzir os níveis de impurezas de proteínas CHO e Proteína Quimiotática de Monócito (MCP-1, uma quimiocina). Cromatografia por afinidade envolve separação por adsorção, onde a molécula de interesse a ser purificada, por exemplo, glicoproteína CTLA4^{A29YL104E}-Ig, se liga específica e reversivelmente a um ligante imobilizado sobre alguma matriz ou resina. Alguns exemplos não limitativos de colunas de purificação por afinidade incluem lectina; tag de afinidade (por exemplo, uma coluna GST ou coluna 6X-His); Estreptavidina; heparina; ou anticorpo (por exemplo, uma coluna de proteína A ou uma coluna de proteína G). Em particular, a presente invenção utiliza uma resina de proteína A para ligação da glicoproteína CTLA4^{A29YL104E}-Ig. Para um tampão de lavagem com pH de cerca de 5 a 9, mais preferivelmente de cerca de 7,5, concentrações de Tris a 25 mM, NaH₂PO₄ a 25 mM e NaCl a 250 mM são úteis. Para um tampão de eluição com pH de cerca de 2 a 5, mais preferivelmente de cerca de 3,5, uma concentração de glicina de 100-300 mM é útil. O eluato da cromatografia por afinidade pode, então, ser neutralizado e carregado sobre uma coluna de

cromatografia de troca de ânions, Q-Sepharose Fast Flow sendo mais útil.

Para reduzir adicionalmente os níveis de proteína A, DNA e espécies de glicoproteína de CTLA4^{A29YL104E}-Ig não desejadas no produto após as etapas precedentes de recuperação/purificação inicial, uma etapa de troca de íons pode ser incorporada no procedimento de purificação. A presente invenção pode empregar colunas de troca de íons comercialmente disponíveis, tais como a coluna Q-Sepharose Fast Flow da GE Healthcare, coluna Q-Sepharose XL (GE Healthcare) ou a coluna DEAE Sepharose Fast Flow, também da GE Healthcare. As resinas mais adequadas para separação de glicoproteína de CTLA4^{A29YL104E}-Ig são aquelas tendo grupos amina funcionais imobilizados. Outros grupos úteis são as resinas com grupo funcional amina quaternária, por exemplo, aquelas na coluna Q-Sepharose Fast Flow da GE Healthcare, onde um ligante de amônio quaternário é ligado a uma agarose de alta porosidade reticulada. Também úteis são as resinas com grupo funcional amina primária, secundária e terciária, por exemplo, aquelas na coluna DEAE Sepharose Fast Flow da GE Healthcare, onde uma dietilaminoetil amina terciária está ligada a uma agarose de alta porosidade reticular. Em uma modalidade particular da invenção, uma coluna que utiliza um permutador de íons forte, tal como uma coluna Q-Sepharose Fast Flow, é utilizada.

Em uma modalidade da invenção, uma glicoproteína de CTLA4^{A29YL104E}-Ig eluída e carregada sobre uma coluna de troca de ânions, por exemplo, Q-Sepharose Fast Flow. A coluna é lavada e glicoproteína de CTLA4^{A29YL104E}-Ig é subsequentelemente eluída da coluna de troca de ânions. Para um tampão de lavagem com pH de cerca de 5 a 9, em uma modalidade, pH de 7, concentrações de HEPES a 25-55 mM e NaCl a 100-140 mM são úteis. Para um tampão de eluição com pH de cerca de 5 a 9 ou, em outra modalidade, pH de 7, concentrações de HEPES a 25-50 mM e NaCl a 200 mM são úteis.

Em outra modalidade da presente invenção, o eluato contendo glicoproteína de CTLA4^{A29YL104E}-Ig do meio de troca de ânions é coletado e, então, contatado com uma resina de interação hidrofóbica. HIC é útil para a

- separação de dímeros de glicoproteína de CTLA4^{A29YL104E}-Ig desejados de material de espécie de elevado peso molecular e outras impurezas de proteína da cultura de células de mamífero. Por exemplo, cultura de células CHO expressando CTLA4^{A29YL104E}-Ig contêm agregados moleculares de espécies de elevado peso molecular de glicoproteína de CTLA4^{A29YL104E}-Ig. Também encontradas no meio de cultura de células de mamífero são impurezas de proteína CHO. Esses produtos indesejáveis poderiam gerar uma resposta antigênica indesejada em um paciente e contribuir para pobre qualidade de produto ou atividade.
- 10 HIC separa eficazmente variantes hidrofóbicas, dímeros de glicoproteína de CTLA4^{A29YL104E}-Ig de complexos de HMW de glicoproteína de CTLA4^{A29YL104E}-Ig e impurezas de proteína CHO via ligação dos últimos produtos à resina de HIC e passagem dos dímeros de glicoproteína de CTLA4^{A29YL104E}-Ig através da coluna. Assim, uma glicoproteína de CTLA4^{A29YL104E}-Ig empoçada é obtida que é substancialmente isenta dessas espécies. Uma fonte de misturas de glicoproteína de CTLA4^{A29YL104E}-Ig para uso com HIC é cultura de células de mamífero, por exemplo, uma cultura de células CHO. Em particular, a cultura pode ser submetida a pelo menos uma etapa de purificação, conforme discutido previamente.
- 15
- 20 Em outra modalidade da presente invenção, o método de HIC pode ser modificado para coletar e empoçar outras glicoproteínas (por exemplo, complexos de HMW de CTLA4^{A29YL104E}-Ig). Agregados de HMW podem se ligar à resina de HIC (por exemplo, compreendendo tetrâmero de CTLA4^{A29YL104E}-Ig e semelhantes). Esses complexos de HMW têm uma maior avidéz e se ligam mais eficazmente *in vivo* do que o dímero de CTLA4^{A29YL104E}-Ig apenas. Assim, aqueles habilitados na técnica podem obter e empoçar agregados de HMW de CTLA4^{A29YL104E}-Ig através de eluição da CTLA4^{A29YL104E}-Ig empoçada da HIC.
- 25
- 30 Glicoproteína de CTLA4^{A29YL104E}-Ig eluída do meio de HIC é recuperada, concentrada e lavada através de diafiltração ou outro método adequado conhecido por aqueles habilitados na técnica, para proporcionar um produto final de glicoproteína de CTLA4^{A29YL104E}-Ig purificada. O produto de

glicoproteína de CTLA4^{A29YL104E}-Ig preparado de acordo com o processo da presente invenção é de alta pureza, por exemplo, contendo $\geq 95\%$ do dímero de CTLA4^{A29YL104E}-Ig, contendo $\leq 5\%$ do produto de HMW de CTLA4^{A29YL104E}-Ig e contendo $\leq 1\%$ de monômero de CTLA4^{A29YL104E}-Ig.

5 As resinas de HIC mais úteis para separação de formas de glicoproteína de CTLA4^{A29YL104E}-Ig são aquelas tendo grupos fenila funcionais imobilizados. Das resinas de phenyl-HIC, Phenyl Sepharose Fast Flow High Sub (alta substituição) pela GE Healthcare é mais útil. Meio Phenyl Toyopearl pela TosoHaas e TSK Phenyl 5PW são exemplos não limitativos de outras resinas de phenyl-HIC que podem ser usadas. Outros grupos funcionais em HIC incluem, mas não estão limitados a, as porções propila, octila, alco-
10 xila, butila e isoamila.

O método de purificação pode ainda compreender etapas adicionais que inativam e/ou removem vírus e/ou retrovírus que poderiam estar
15 potencialmente presentes em um meio de cultura de células de linhagens de células de mamífero. Um número significativo de etapas de eliminação viral estão disponíveis incluindo, mas não limitado a, tratamento com caotrops, tais como uréia ou guanidina, detergentes, etapas adicionais de diafiltração/ultrafiltração, separação convencional, tais como cromatografia de troca
20 de íons ou por exclusão de tamanho, extremos de pH, calor, proteases, solventes orgânicos ou qualquer combinação dos mesmos.

Em um aspecto, moléculas purificadas de CTLA4-Ig as quais foram concentradas e submetidas a uma etapa de diafiltração podem ser
25 enchidas em garrafas Biotainer[®] de 2 L, saco de bioprocessamento de 50 L ou qualquer outro vaso adequado. Moléculas de CTLA4-Ig em tais vasos podem ser armazenadas durante cerca de 60 dias a 2 °C a 8 °C antes de congelamento. Armazenamento prolongado de CTLA4-Ig purificada a 2 °C a 8 °C pode levar a um aumento na proporção de CTLA4-Ig tetramérica. Portanto, para armazenamento a longo prazo, moléculas de CTLA4-Ig podem ser
30 congeladas a cerca de -70 °C antes de armazenamento e armazenadas em uma temperatura de cerca de -40 °C. A temperatura de congelamento pode variar de cerca de -50 °C a cerca de -90 °C. O tempo de congelamento po-

de variar e depende grandemente do volume do vaso que contém moléculas de CTLA4-Ig e do número de vasos que são carregados no congelador. Por exemplo, em uma modalidade, moléculas de CTLA4-Ig estão em garrafas Biotainer[®] de 2 L. Carregamento de menos de quatro garrafas Biotainer[®] de 2 L no congelador podem requerer um tempo de congelamento de cerca de 14 a pelo menos cerca de 18 horas. Vasos com moléculas de CTLA4-Ig congeladas são armazenados em uma temperatura de cerca de -35°C a cerca de -55°C .

O tempo de armazenamento em uma temperatura de cerca de -35°C a cerca de -55°C pode variar e pode ser tão curto quanto 18 horas. As moléculas de CTLA4-Ig congeladas podem ser descongeladas de uma maneira controlada. Descongelamento das moléculas de CTLA4-Ig congeladas é controlado e pode ser feito em uma incubadora em uma temperatura de cerca de 20°C a cerca de 24°C . A duração das etapas de descongelamento depende da carga da incubadora, em que carregamento de menos de quatro garrafas Biotainer[®] de 2L pode requerer um tempo de congelamento de menos de cerca de 24 horas. Carregamento de quatro garrafas Biotainer[®] de 2 L pode requerer cerca de 18 horas. Solução descongelada compreendendo moléculas de CTLA4-Ig pode ser misturada para evitar gradientes potenciais de concentração. Portanto, descongelamento pode ser feito em uma incubadora com temperatura controlada, a qual também permite a agitação dos vasos os quais contêm CTLA4-Ig. a velocidade de agitação pode ser cerca de 40 a cerca de 80 rpm. Moléculas descongeladas de CTLA4-Ig podem ser ainda misturadas durante mais 5-10 min em uma taxa rotacional de cerca de 3 rpm. Moléculas descongeladas de CTLA4-Ig podem ser armazenadas a 2°C a 8°C , transformadas em alíquotas e liofilizadas durante a produção de composições farmacêuticas compreendendo CTLA4-Ig.

A presente invenção pode ser ainda aplicada à purificação de outros Exemplos não limitativos de glicoproteínas terapêuticas produzidas em larga escala. O processo da presente invenção pode ser aplicável à produção de outras glicoproteínas tendo mais de uma variante glicosilada em

cultura de células de mamífero. Aqueles habilitados na técnica compreenderão uma modificação que poderia se tornar necessária no curso da adaptação do método de produção exemplificado de diferentes glicoproteínas.

Formulações & Kits

- 5 A invenção também proporciona qualquer uma das moléculas de CTLA4-Ig descritas como uma mistura liofilizada. Formulações compreendendo CTLA4-Ig a ser liofilizada podem ainda compreender três componentes básicos: (1) um ingrediente ativo adicional incluindo outras proteínas recombinantes ou pequenas moléculas (tais como imunossuppressores), (2) um
- 10 excipiente(s) e (3) um solvente(s). Excipientes incluem reagentes farmacêuticamente aceitáveis que proporcionam boas propriedades de liofilização ao bolo (agentes de composição de volume), bem como proporcionam lioproteção e/ou crioproteção de proteínas ("estabilizante"), manutenção de pH (agentes de tamponamento) e conformação apropriada da proteína durante
- 15 armazenamento, de modo que retenção substancial de atividade biológica (incluindo estabilidade do ingrediente ativo, tal como estabilidade de proteína) seja mantida. Com relação a excipientes, um exemplo de formulação pode incluir um ou mais de um agente(s) de tamponamento, um agente de
- 20 composição de volume, um estabilizante de proteína e um antimicrobiano. Açúcares ou polióis podem ser usados como estabilizantes de proteína não específicos em solução e durante liofilização e secagem-pulverização. Polímeros podem ser usados para estabilizar proteínas em solução e durante liofilização e secagem-pulverização. Um polímero popular é albumina de so-
- 25 ro, a qual foi usada como um crioprotetor e lioprotetor. Em uma modalidade, a invenção proporciona formulações que são isentas de albumina. Vários sais podem ser usados como agentes de composição de volume. Agentes de composição de volume salinos ilustrativos incluem, por exemplo, NaCl, MgCl₂ e CaCl₂. Determinados aminoácidos podem ser usados como crioprotetores e/ou lioprotetores e/ou agentes de composição de volume. Aminoácidos que podem ser usados incluem, mas não são limitados a, glicina, prolina, 4-hidróxi-prolina, L-serina, glutamato de sódio, alanina, arginina e hidro-
- 30 cloreto de lisina. Muitos agentes de tamponamento que abrangem uma faixa

ampla de pH estão disponíveis para seleção em formulações. Agentes de tamponamento incluem, por exemplo, acetato, citrato, glicina, histidina, fosfato (sódio ou potássio), dietanolamina e Tris. Agentes de tamponamento abrangem aqueles agentes os quais mantêm um pH em solução em uma faixa aceitável antes de liofilização. formulações foram previamente descritas no Pedido de Patente U.S. No. 60/752.150, depositado em 20 de Dezembro de 2005, o qual é incorporado aqui por referência em sua totalidade.

Em uma modalidade, a invenção proporciona uma mistura liofilizada de CTLA4-Ig compreendendo pelo menos 90%, 95%, 99% ou 99,5% de dímero de CTLA4-Ig. Em uma modalidade, a invenção proporciona uma mistura liofilizada de CTLA4-Ig compreendendo pelo menos 90%, 95%, 99% ou 99,5% de dímero de CTLA4-Ig e não mais do que 5%, 4%, 3%, 2% ou 1% de tetrâmero de CTLA4-Ig. Em outra modalidade, a invenção proporciona uma mistura liofilizada de CTLA4-Ig compreendendo pelo menos 90%, 95%, 99% ou 99,5% de dímero de CTLA4-Ig e não mais do que 5%, 4%, 3%, 2% ou 1% de tetrâmero de CTLA4-Ig e não mais do que 2%, 1,5%, 1,0%, 0,8%, 0,5% ou 0,3% monômero de CTLA4-Ig. Em uma outra modalidade, a invenção proporciona uma mistura liofilizada de CTLA4-Ig compreendendo pelo menos 8,0 moles de ácido siálico por mol de dímero de CTLA4-Ig ou para molécula de CTLA4-Ig. Em outra modalidade, a invenção proporciona uma mistura liofilizada de CTLA4-Ig compreendendo: de cerca de 15 a cerca de 35 moles de GlcNac por mol de CTLA4-Ig moléculas ou dímero; de cerca de 1 a cerca de 5 moles de GalNac por mol de dímero de CTLA4-Ig ou para molécula de CTLA4-Ig; de cerca de 5 moles a cerca de 20 moles de galactose por mol de dímero de CTLA4-Ig ou para molécula de CTLA4-Ig; de cerca de 2 a cerca de 10 moles de fucose por mol de dímero de CTLA4-Ig ou para molécula de CTLA4-Ig; e/ou de cerca de 5-15 moles de manose por mol de dímero de CTLA4-Ig ou para molécula de CTLA4-Ig

A substância de fármaco de CTLA4^{A29YL104E}-Ig está disponível como uma solução aquosa em uma concentração de aproximadamente 25 mg/mL (22,5-27,5 mg/mL) em tampão de fosfato de sódio a 25 mM e cloreto de sódio a 10 mM em um pH de ~ 7,5. A CTLA4^{A29YL104E}-Ig tem uma tendên-

cia a formar espécies de elevado peso molecular em solução aquosa. Portanto, um produto liofilizado foi desenvolvido de forma a minimizar os níveis de espécies de elevado peso molecular que podem se formar no produto de fármaco. Vários excipientes, tais como maltose, sacarose e aminoácidos, tal como hidrocloreto de L-arginina, foram selecionados como lioprotetores potenciais durante liofilização de CTLA4^{A29YL104E}-Ig. Descobriu-se que sacarose é o lioprotetor mais eficaz. Foi ainda observado que aumento da proporção de sacarose para proteína melhorou a estabilidade da proteína. uma proporção de sacarose:proteína de 2:1 (peso:peso) foi escolhida para uma solução de proteína a ser liofilizada. O produto de fármaco liofilizado tem estabilidade adequada e comportamento de constituição satisfatório.

Métodos de Tratamento

De acordo com presente invenção, uma doença mediada através de interações de células T com células B7 positivas pode ser tratada recebendo uma formulação farmacologicamente aceitável de CTLA4-Ig ou CTLA4^{A29YL104E}-Ig. As moléculas de CTLA4-Ig ou CTLA4^{A29YL104E}-Ig secretadas por uma linhagem de célula de mamífero manipulada (por exemplo, uma linhagem de célula de Ovário de Hâmster Chinês *dhfr*- negativa que abriga DNA que codifica CTLA4-Ig ou CTLA4^{A29YL104E}-Ig) pode ser uma população de moléculas tendo um perfil de glicosilação em particular. Conforme estabelecido aqui, um perfil de glicosilação particular pode afetar a ligação de CTLA4-Ig ou CTLA4^{A29YL104E}-Ig ao CD80 e/ou CD86, de modo que moléculas de CTLA4-Ig ou CTLA4^{A29YL104E}-Ig podem proporcionar uma maior inibição de ativação e/ou proliferação de células T. Conforme estabelecido aqui, um perfil de glicosilação particular pode ser afetado pela linhagem de célula e o método de produção. Assim, em determinadas modalidades da invenção, a invenção proporciona moléculas de CTLA4-Ig ou CTLA4^{A29YL104E}-Ig produzidas por uma linhagem de célula nos métodos de produção descritos aqui de forma a tratar doenças ou distúrbios relacionados à células T que incluem, mas não estão limitados a, geralmente qualquer distúrbio ou doença linfoproliferativa dependente de células T e qualquer doença ou distúrbio autoimune dependente de células T e, mais especificamente: linfoma de células T, leu-

cemia linfoblástica aguda de células T, linfoma de células T angiocêntrico testicular, angíte linfocítica benigna, doença enxerto versus hospedeiro (G-VHD), distúrbios imunes associados à rejeição a transplante de enxerto, psoríase, inflamação, alergia, ooforite, doença inflamatória do intestino, glomerulonefrite, encefalomielite, tireoidite de Hashimoto, doença de Graves, doença de Addison, doença de Crohn, síndrome de Sjogren, lúpus eritematoso, mixedema primário, anemia perniciosa, gastrite atrófica autoimune, artrite reumatóide, diabetes mellitus dependente de insulina, síndrome de Good Pasture, miastenia gravis, pênfigo, esclerose múltipla, oftalmia simpática, uveíte autoimune, anemia hemolítica autoimune, trombocitopenia idiopática, cirrose biliar primária, hepatite de ação crônica, colite ulcerativa, escleroderma, polimiosite e doença mista do tecido conectivo.

A invenção proporciona o uso de qualquer uma das moléculas de CTLA4-Ig ou CTLA4^{A29YL104E}-Ig divulgadas em métodos para a inibição de proliferação ou ativação de células T, inibição de uma resposta imune em um indivíduo ou para o tratamento *in vitro* de um distúrbio imune em um indivíduo ou indução de tolerância imune a um antígeno em um indivíduo. Tolerância imune é um tipo de resposta imunológica na qual é desenvolvida uma não-reatividade específica dos tecidos linfóides a um antígeno específico onde, na ausência de tolerância, o antígeno é capaz de induzir a uma resposta imune. Em uma modalidade, as moléculas de CTLA4-Ig ou CTLA4^{A29YL104E}-Ig e composições da invenção podem ser usadas para tratar um indivíduo que recebeu um transplante de forma a induzir à tolerância e reduzir a possibilidade de rejeição. Em outra modalidade, o transplante é um transplante de órgão, um transplante de tecido ou um transplante de células. Em outra modalidade, o transplante de célula compreende células de medula óssea ou células de ilhota.

A invenção proporciona o uso de qualquer uma das moléculas de CTLA4-Ig ou CTLA4^{A29YL104E}-Ig divulgadas na fabricação de um medicamento para tratamento de qualquer uma das doenças ou distúrbios acima estabelecidos. A invenção também proporciona o uso de qualquer uma das moléculas de CTLA4-Ig ou CTLA4^{A29YL104E}-Ig divulgadas em uma co-

administração com outro agente para o tratamento das doenças ou distúrbios acima mencionados. As moléculas de CTLA4-Ig ou CTLA4^{A29YL104E}-Ig da invenção podem ser administradas a um indivíduo, por exemplo, intravenosamente, subcutaneamente e/ou através de inalação. Formulações de CTLA4-Ig ou CTLA4^{A29YL104E}-Ig aplicáveis para administração intravenosa ou subcutânea são descritas no Pedido de Patente No. de Série U.S. 60/752.150, depositado em 20 de Dezembro de 2005, o qual é incorporado aqui por referência em sua totalidade. Formulações de CTLA4-Ig ou CTLA4^{A29YL104E}-Ig também podem incluir formulações baseadas em lipossoma em que os lipossomas podem distribuir moléculas de CTLA4-Ig ou CTLA4^{A29YL104E}-Ig à células ou tecidos alvo. Moléculas de CTLA4-Ig ou CTLA4^{A29YL104E}-Ig podem também ser distribuídas à células ou tecidos alvo através de administração de um vetor viral que compreende um cassete de expressão de gene de CTLA4-Ig ou CTLA4^{A29YL104E}-Ig. A administração e dosagens de uma população de moléculas de CTLA4-Ig ou CTLA4^{A29YL104E}-Ig são descritas nos pedidos de Patente U.S. publicados como US20030083246 e US20040022787, bem como no pedido de Patente U.S. número de série 60/668.774, depositado em 6 de Abril de 2005, todos os quais são aqui incorporados por referência em suas totalidades.

As moléculas de CTLA4-Ig ou CTLA4^{A29YL104E}-Ig conforme descrito aqui, podem estar em uma variedade de formas de dosagens as quais incluem, mas não estão limitadas a, soluções ou suspensões líquidas, tabletes, pílulas, pós, supositórios, microcápsulas ou microvesículas poliméricas, lipossomas e soluções injetáveis ou passíveis de infusão. A forma depende do modo de administração e da aplicação terapêutica. Um modo de administração e regime de dosagem eficazes para as moléculas da presente invenção depende da gravidade e curso da doença, a saúde do indivíduo e resposta ao tratamento e o julgamento do médico que faz o tratamento. Conseqüentemente, as dosagens das moléculas deverá ser titulada aos indivíduos. A inter-relação de dosagens para animais de vários tamanhos e espécie e seres humanos baseada em mg/m² de área de superfície é descrita por Freireich, E. J. e colaboradores (Quantitative Comparison of Toxicity of Anti-

cancer Agents in Mouse, Rat, Hamster, Dog, Monkey and Man. Cancer Chemother. Rep., 50, No. 4, 219-244, Maio de 1966). Ajustes no regime de dosagem podem ser feitos para otimizar a inibição da resposta de crescimento.

5 Doses podem ser divididas e administradas em uma base diária ou a dose pode ser reduzida proporcionalmente, dependendo da situação. Por exemplo, várias doses divididas podem ser administradas diária ou mensalmente ou a dose pode ser proporcionalmente reduzida, conforme indicado pela situação terapêutica específica. Em uma modalidade, a administração é mensal, trimestral, diária, duas vezes ao dia, cerca de cada 10
10 horas, cerca de cada 6 horas, cerca de cada 4 horas, cerca de cada 2 horas, cerca de uma vez a uma hora. De acordo com a prática da invenção, uma quantidade eficaz para tratamento de um indivíduo pode estar entre cerca de 0,1 e cerca de 10 mg/kg de peso corporal do indivíduo. também, a quantidade eficaz pode ser uma quantidade entre cerca de 1 e cerca de 10 mg/kg de
15 peso corporal do indivíduo. As moléculas de CTLA4-Ig ou CTLA4^{A29YL104E}-Ig da invenção também têm aplicação clínica *in vivo*. Elas podem ser usadas para a enumeração de células B7 positivas no diagnóstico ou prognóstico de algumas condições de imunodeficiência, na fenotipificação de leucemias e
20 linfomas e no monitoramento de alteração imunológica após transplante de órgão.

A distribuição das composições descritas aqui pode ser obtida via injeção, distribuição oral, inalação de uma pulverização ou outra dispersão particular, injeção subcutânea, distribuição intravenosa, distribuição tópi-
25 ca, supositório, distribuição ocular, distribuição nasal ou oral. A composição pode ser distribuída via encapsulação em um lipossoma ou outro veículo de distribuição semelhante à membrana. A composição pode ser distribuída via o sangue ou outros fluidos que são previamente tratados com a composição e, então, subseqüentemente transfundidas em um indivíduo.

30 LISTAGEM DE SEQÜÊNCIA

SEQ ID NO: 17 é a seqüência de nucleotídeo que codifica pcS-DhuCTLA4Ig:

GATCTCCCGA TCCCCTATGG TCGACTCTCA GTACAATCTG CTCTGATGCC GCATAGTTAA
GCCAGTATCT GCTCCCTGCT TGTGTGTTGG AGGTCGCTGA GTAGTGC GCG AGCAAAATTT
AAGCTACAAC AAGGCAAGGC TTGACCGACA ATTGCATGAA GAATCTGCTT AGGGTTAGGC
GTTTTGCGCT GCTTCGCGAT GTACGGGCCA GATATACGCG TTGACATTGA TTATTGACTA
GTTATTAATA GTAATCAATT ACGGGGTCAT TAGTTCATAG CCCATATATG GAGTTCGCG
TTACATAACT TACGGTAAAT GGCCCGCCTG GCTGACCGCC CAACGACCCC CGCCCATGA
CGTCAATAAT GACGTATGTT CCCATAGTAA CGCCAATAGG GACTTTCCAT TGACGTCAAT
GGGTGGACTA TTTACGGTAA ACTGCCCACT TGGCAGTACA TCAAGTGAT CATATGCCAA
GTACGCCCC TATTGACGTC AATGACGGTA AATGGCCCGC CTGGCATTAT GCCCAGTACA
TGACCTTATG GGACTTTCCT ACTTGGCAGT ACATCTACGT ATTAGTCATC GCTATTACCA
TGGTGATGCG GTTTTGGCAG TACATCAATG GCGGTGGATA GCGGTTTGAC TCACGGGGAT
TTCCAAGTCT CCACCCCAT GACGTCAATG GGAGTTGTT TTGGCACCAA AATCAACGGG
ACTTTCCAAA ATGTCGTAAC AACTCCGCC CATTGACGCA AATGGGCGGT AGGCGTGTAC
GGTGGGAGGT CTATATAAGC AGAGCTCTCT GGCTAACTAG AGAACCCACT GCTTACTGGC
TTATCGAAAT TAATACGACT CACTATAGGG AGACCCAAGC TTGGTACCGA GCTCGGATCC
ACTAGTAACG GCCGCCAGTG TGCTGGAATT CTGCAGATAG CTTACCAAT GGGTGTACTG
CTCACACAGA GGACGCTGCT CAGTCTGGTC CTTGCACTCC TGTTTCCAAG CATGGCGAGC
ATGGCAATGC ACGTGGCCCA GCCTGCTGTG GTACTGGCCA GCAGCCGAGG CATCGCCAGC
TTTGTGTGTG AGTATGCATC TCCAGGCAA GCCACTGAGG TCCGGGTGAC AGTGCTTCGG
CAGGCTGACA GCCAGGTGAC TGAAGTCTGT GCGGCAACCT ACATGATGGG GAATGAGTTG
ACCTTCTAG ATGATTCAT CTGCACGGGC ACCTCCAGTG GAAATCAAGT GAACCTCACT
ATCCAAGGAC TGAGGGCCAT GGACACGGGA CTCTACATCT GCAAGGTGGA GCTCATGTAC
CCACCGCCAT ACTACCTGGG CATAGGCAAC GGAACCCAGA TTTATGTAAT TGATCCAGAA
CCGTGCCCAG ATTCTGATCA GGAGCCCAA TCTTCTGACA AACTCACAC ATCCCCACCG
TCCCCAGCAC CTGAACCTCT GGGGGGATCG TCAGTCTTCC TCTTCCCCC AAAACCCAAG
GACACCCTCA TGATCTCCCG GACCCCTGAG GTCACATGCG TGGTGGTGA CGTGAGCCAC
GAAGACCCTG AGGTCAAGTT CAACTGGTAC GTGGACGGCG TGGAGGTGCA TAATGCCAAG
ACAAAGCCGC GGGAGGAGCA GTACAACAGC ACGTACCGTG TGGTCAGCGT CCTCACCGTC
CTGCACCAGG ACTGGCTGAA TGGCAAGGAG TACAAGTGCA AGGTCTCCAA CAAAGCCCTC
CCAGCCCCA TCGAGAAAAC CATCTCCAAA GCCAAAGGGC AGCCCCGAGA ACCACAGGTG
TACACCCTGC CCCCATCCCG GGATGAGCTG ACCAAGAACC AGGTCAGCCT GACCTGCCTG
GTCAAAGGCT TCTATCCAG CGACATCGCC GTGGAGTGGG AGAGCAATGG GCAGCCGGAG

AACA ACTACA AGACCAGCC TCCCGTGCTG GACTCCGACG GTCCTTCTT CCTCTACAGC
AAGCTCACCG TGGACAAGAG CAGGTGGCAG CAGGGGAACG TCTTCTCATG CTCCGTGATG
CATGAGGCTC TGCACAACCA CTACACGCAG AAGAGCCTCT CCCTGTCTCC GGGTAAATGA
GTGCGACGGC CGGCAAGCCC CCGCTCCCCG GGCTCTCGCG GTCGCACGAG GATGCTTCTA
GAGGGCCCTA TTCTATAGTG TCACCTAAAT GCTAGAGCTC GCTGATCAGC CTCGACTGTG
CCTTCTAGTT GCCAGCCATC TGTGTTTGC CCCTCCCCG TGCCTTCCTT GACCCTGGAA
GGTGCCACTC CCACTGTCTT TTCTAATAA AATGAGGAAA TTGCATCGCA TTGTCTGAGT
AGGTGTCATT CTATTCTGGG GGGTGGGGTG GGGCAGGACA GCAAGGGGGA GGATTGGGAA
GACAATAGCA GGCATGCTGG GGATGCGGTG GGCTCTATGG CTTCTGAGGC GGAAAGAACC
AGCTGGGGCT CTAGGGGGTA TCCCCACGGC CCCTGTAGCG GCGCATTAAG CGCGGCGGGT
GTGGTGGTTA CGCGCAGCGT GACCGCTACA CTTGCCAGCG CCCTAGCGCC CGCTCCTTTC
GCTTCTTCC CTTCTTCTT CGCCACGTTT GCCCTGTGGA ATGTGTGTCA GTTAGGGTGT
GGAAAGTCCC CAGGCTCCCC AGCAGGCAGA AGTATGCAA GCATGCATCT CAATTAGTCA
GCAACCAGGT GTGGAAAGTC CCCAGGCTCC CCAGCAGGCA GAAGTATGCA AAGCATGCAT
CTCAATTAGT CAGCAACCAT AGTCCC GCCC CTA ACTCCGC CCATCCCGCC CTA ACTCCG
CCCAGTCCG CCCATTCTCC GCCCCATGGC TACTAATTT TTTTATTTA TGCAGAGGCC
GAGGCCGCT CGGCCTCTGA GCTATTCCAG AAGTAGTGAG GAGGCTTTTT TGGAGGCCA
GGCTTTTGCA AAAAGCTTG ACAGCTGAGG GCTGCGATTT CGGCCAAAC TTGACGGCAA
TCCTAGCGTG AAGGCTGGTA GGATTTTATC CCCGCTGCCA TCATGGTTCG ACCATTGAAC
TGCATCGTCG CCGTGTCCCA AGATATGGG ATTGGCAAGA ACGGAGACCT ACCCTGGCCT
CCGCTCAGGA ACGAGTTCAA GTACTTCAA AGAATGACCA CAACCTCTTC AGTGGGAAGT
AAACAGAATC TGGTGATTAT GGTAGGAAA ACCTGGTCTT CCATTCCTGA GAAGAATCGA
CCTTTAAAGG ACAGAATTAA TATAGTTCTC AGTAGAGAAC TCAAAGAACC ACCACGAGGA
GCTCATTTC TTGCCAAAAG TTTGGATGAT GCCTTAAGAC TTATTGAACA ACCGGAATTG
GCAAGTAAAG TAGACATGGT TTGGATAGTC GGAGGCAGTT CTGTTTACCA GGAAGCCATG
AATCAACCAG GCCACCTCAG ACTCTTTGTG ACAAGGATCA TGCAGGAATT TGAAAGTGAC
ACGTTTTTCC CAGAAATGA TTTGGGGAAA TATAA ACTTC TCCAGAATA CCCAGGCGTC
CTCTCTGAGG TCCAGGAGGA AAAAGGCATC AAGTATAAGT TTGAAGTCTA CGAGAAGAAA
GACTAACAGG AAGATGCTTT CAAGTTCTCT GCTCCCCTCC TAAAGCTATG CATTTTTATA
AGACCATGGG ACTTTTGCTG GCTTTAGATC TTTGTGAAG AACCTTACTT CTGTGGTGTG
ACATAATTGG ACAACTACC TACAGAGATT TAAAGCTCTA AGGTAAATAT AAAATTTTAA
AGTGTATAAT GTGTTAACT ACTGATTCTA ATTGTTGTG TATTTTAGAT TCCAACCTAT

GGAAC TGATG AATGGGAGCA GTGGTGAAT GCCTTTAATG AGGAAAACCT GTTTTGCTCA
GAAGAAATGC CATCTAGTGA TGATGAGGCT ACTGCTGACT CTCAACATTC TACTCCTCCA
AAAAAGAAGA GAAAGGTAGA AGACCCCAAG GACTTTCCTT CAGAATTGCT AAGTTTTTTG
AGTCATGCTG TGTTTAGTAA TAGAACTCTT GCTTGCTTTG CTATTTACAC CACAAAGGAA
AAAGCTGCAC TGCTATACAA GAAAATTATG GAAAAATATT CTGTAACCTT TATAAGTAGG
CATAACAGTT ATAATCATAA CATACTGTTT TTTCTTACTC CACACAGGCA TAGAGTGTCT
GCTATTAATA ACTATGCTCA AAAATTGTGT ACCTTTAGCT TTTTAATTTG TAAAGGGGTT
AATAAGGAAT ATTTGATGTA TAGTGCCTTG ACTAGAGATC ATAATCAGCC ATACCACATT
TG TAGAGGTT T TACTTGCTT TAAAAACCT CCCACACCTC CCCCTGAACC TGAAACATAA
AATGAATGCA ATTGTTGTTG TTAACCTGTT TATTGCAGCT TATAATGGTT ACAAATAAAG
CAATAGCATC ACAAATTTCA CAAATAAAGC ATTTTTTTCA CTGCATTCTA GTTGTTGGTTT
GTCCAAACTC ATCAATGTAT CTTATCATGT CTGGATCGGC TGGATGATCC TCCAGCGCGG
GGATCTCATG CTGGAGTTCT TCGCCACCC CAACTTGTTT ATTGCAGCTT ATAATGGTTA
CAAATAAAGC AATAGCATCA CAAATTTAC AAATAAAGCA TTTTTTTCAC TGCATTCTAG
TTGTGGTTTG TCCAAACTCA TCAATGTATC TTATCATGTC TGTATACCGT CGACCTCTAG
CTAGAGCTTG GCGTAATCAT GGTCATAGCT GTTTCCTGTG TGAAATGTT ATCCGCTCAC
AATCCACAC AACATACGAG CCGGAAGCAT AAAGTGAAA GCCTGGGGTG CCTAATGAGT
GAGCTAACTC ACATTAATG CGTTGCGCTC ACTGCCCCTTCCAGTCGG GAAACCTGTC
GTGCCAGCTG CATTAATGAA TCGGCCAACG CGCGGGGAGA GCGGTTTGC GTATTGGGCG
CTCTCCGCT TCCTCGCTCA CTGACTCGCT GCGCTCGGTC GTTCGGCTGC GCGGAGCGGT
ATCAGCTCAC TCAAAGGCGG TAATACGGTT ATCCACAGAA TCAGGGGATA ACGCAGGAAA

GAACATGTGA GCAAAGGCC AGCAAAGGC CAGGAACCGT AAAAAGGCCG CGTTGCTGGC
GTTTTTCCAT AGGCTCCGCC CCCCTGACGA GCATCACAAA AATCGACGCT CAAGTCAGAG
GTGGCGAAAC CCGACAGGAC TATAAAGATA CCAGGCGTTT CCCCCTGGAA GCTCCCTCGT

GCGCTCTCCT GTTCCGACCC TGCCGCTTAC CGGATACCTG TCCGCTTTC TCCCTTCGGG
AAGCGTGGCG CTTTCTCAAT GCTCAGCTG TAGGTATCTC AGTTCGGTGT AGGTCGTTTCG
CTCCAAGCTG GGCTGTGTGC ACGAACCCCGCTCAGCCC GACCGCTGCG CCTTATCCGG
TAACTATCGT CTGAGTCCA ACCCGGTAAG ACACGACTTA TCGCCACTGG CAGCAGCCAC
TGGAACAGG ATTAGCAGAG CGAGGTATGT AGGCGGTGCT ACAGAGTTCT TGAAGTGGTG
GCCTAACTAC GGCTACACTA GAAGGACAGT ATTTGGTATC TCGCTCTGC TGAAGCCAGT

TACCTTCGGA AAAAGAGTTG GTAGCTCTTG ATCCGGCAAA CAAACCACCG CTGGTAGCGG
 TGGTTTTTTT GTTTGCAAGC AGCAGATTAC GCGCAGAAAA AAAGGATCTC AAGAAGATCC
 TTTGATCTTT TCTACGGGGT CTGACGCTCA GTGGAACGAA AACTCACGTT AAGGGATTTT
 GGTCAAGAGA TTATCAAAAA GGATCTTCAC CTAGATCCTT TTAAATTAAA AATGAAGTTT
 TAAATCAATC TAAAGTATAT ATGAGTAAAC TTGGTCTGAC AGTTACCAAT GCTTAATCAG
 TGAGGCACCT ATCTCAGCGA TCTGTCTATT TCGTTCATCC ATAGTTGCCT GACTCCCCGT
 CGTGTAGATA ACTACGATAC GGGAGGGCTT ACCATCTGGC CCCAGTGCTG CAATGATACC
 GCGAGACCCA CGCTCACCAG CTCCAGATTT ATCAGCAATA AACCAGCCAG CCGGAAGGGC
 CGAGCGCAGA AGTGGTCCTG CAACTTTATC CGCCTCCATC CAGTCTATTA ATTGTTGCCG
 GGAAGCTAGA GTAAGTAGTT CGCCAGTTAA TAGTTTGC GC AACGTTGTTG CCATTGCTAC
 AGGCATCGTG GTGTCACGCT CGTCGTTTGG TATGGCTTCA TTCAGCTCCG GTTCCCAACG

TCAAGGCGA GTTACATGAT CCCCCATGTT GTGCAAAAAA GCGGTTAGCT CCTTCGGTCC
 CCGATCGTT GTCAGAAGTA AGTTGGCCGC AGTGTATCA CTCATGGTTA TGGCAGCACT
 CATAATTCT CTTACTGTCA TGCCATCCGT AAGATGCTTT TCTGTGACTG GTGAGTACTC

AACCAAGTCA TTCTGAGAAT AGTGTATGCG GCGACCGAGT TGCTCTTGCC CGGCGTCAAT
 ACGGGATAAT ACCGCGCCAC ATAGCAGAAC TTAAAAGTG CTCATCATTG GAAAACGTTT
 TTCGGGGCGA AACTCTCAA GGATCTTACC GCTGTTGAGA TCCAGTTCGA TGTAACCCAC
 TCGTGCACCC AACTGATCTT CAGCATCTTT TACTTTCACC AGCGTTTCTG GGTGAGCAAA
 AACAGGAAGG CAAAATGCCG CAAAAAGGG AATAAGGGCG ACACGGAAAT GTTGAATACT
 CATACTCTTC CTTTTCAAT ATTATTGAAG CATTATCAG GGTATTGTC TCATGAGCGG
 ATACATATTT GAATGTATTT AGAAAAATAA ACAAATAGGG GTTCCGCGCA CATTTCCCCGA
 AAAGTGCCA CTGACGTCG ACGGATCGGG A

SEQ ID NO: 18 é a seqüência de aminoácido do domínio extra-
 celular de CTLA4 humana:

MHVAQPAVVLASSRGIASFVCEYASPGKATEVRVTVLRQADS
 QVTEVCAATYMMGNELTFLDDSICTGTSSGNQVNLTIQGLRAMDTGLYICK
 5 VELMYPPPYLIGINGTQIYVIDPEPCPDSD

Outras modalidades não limitativas:

A invenção proporciona uma população de célula clonal de Ovário de Hâmster Chinês capaz de produzir CTLA4-Ig. Em uma modalidade, a

população de célula é capaz de produzir mais de 0,5 ou mais gramas de proteína de CTLA4-Ig por litro de cultura líquida e em que a CTLA4-Ig exibe uma proporção molar de ácido siálico para dímero de CTLA4-Ig é de cerca de 6 a cerca de 14 em uma escala de cultura de 1.000 L ou mais. Em uma
5 modalidade, a população de célula foi adaptada a um meio isento de soro quimicamente definido. Em outra modalidade, CTLA4-Ig produzida a partir de cultura da população de célula tem um coeficiente de extinção de $1,00 \pm 0,05 \text{ AU mL cm}^{-1} \text{ mg}^{-1}$. Em uma outra modalidade, a população de célula, quando crescida em cultura, é capaz de produzir polipeptídeos de CTLA4-Ig,
10 em que: (a) cerca de 90% dos polipeptídeos de CTLA4-Ig compreendem uma seqüência de aminoácido de SEQ ID NO: 2 começando com a metionina no resíduo 27; (b) cerca de 10% dos polipeptídeos de CTLA4-Ig compreendem a seqüência de aminoácido de SEQ ID NO: 2 começando com a alanina no resíduo número 26; (c) cerca de 4% dos polipeptídeos de CTLA4-Ig
15 compreendem a seqüência de aminoácido de SEQ ID NO: 2 terminando com a lisina no resíduo número 383; (d) cerca de 96% dos polipeptídeos de CTLA4-Ig compreendem a seqüência de aminoácido de SEQ ID NO: 2 terminando com a glicina no resíduo número 382; e opcionalmente, (e) cerca de menos de 1% dos polipeptídeos de CTLA4-Ig compreendem a seqüência de
20 aminoácido de SEQ ID NO: 2 começando com a metionina no resíduo número 25,

A invenção proporciona uma célula de prole das células descritas acima, em que a célula de prole produz CTLA4-Ig. Em uma modalidade, a célula de prole é obtida a partir de cultura de uma célula durante pelo me-
25 nos 5 gerações. Em outra modalidade, a célula de prole é obtida a partir de cultura de uma célula durante pelo menos 10 gerações. Em outra modalidade, a célula de prole é obtida a partir de cultura de uma célula durante pelo menos 20 gerações. Em outra modalidade, a célula de prole é obtida a partir de cultura de uma célula durante pelo menos 40 gerações, em outra modali-
30 dade, a célula de prole é obtida a partir de cultura de uma célula durante pelo menos 50 gerações, em outra modalidade, a célula de prole é obtida a partir de cultura de uma célula durante pelo menos 75 gerações, em outra

modalidade, a célula de prole é obtida a partir de cultura de uma célula durante pelo menos 100 gerações.

A invenção proporciona uma linhagem de célula produzida a partir de qualquer das células descritas acima. Em uma modalidade, a linhagem de célula é clonal. Em outra modalidade, a linhagem de célula é capaz de produzir: (a) uma proteína de fusão de CTLA4-Ig tendo uma seqüência de aminoácido de SEQ ID NO: 8 (metionina na posição de aminoácido 27 e glicina na posição de aminoácido 382 de SEQ ID NO: 2); (b) uma proteína de fusão de CTLA4-Ig tendo uma seqüência de aminoácido de SEQ ID NO: 5 (metionina na posição de aminoácido 27 e lisina na posição de aminoácido 383 de SEQ ID NO: 2); (c) uma proteína de fusão de CTLA4-Ig tendo uma seqüência de aminoácido de SEQ ID NO: 7 (alanina na posição de aminoácido 26 e glicina na posição de aminoácido 382 de SEQ ID NO: 2); (d) uma proteína de fusão de CTLA4-Ig tendo uma seqüência de aminoácido de SEQ ID NO: 4 (alanina na posição de aminoácido 26 e lisina na posição de aminoácido 383 de SEQ ID NO: 2); (e) uma proteína de fusão de CTLA4-Ig tendo uma seqüência de aminoácido de SEQ ID NO: 4 (metionina na posição de aminoácido 25 e lisina na posição de aminoácido 383 de SEQ ID NO: 2); ou (f) uma proteína de fusão de CTLA4-Ig tendo uma seqüência de aminoácido de SEQ ID NO: 6 (metionina na posição de aminoácido 25 e glicina na posição de aminoácido 382 de SEQ ID NO: 2).

Em outra modalidade, a linhagem de célula é capaz de produzir proteínas de fusão de CTLA4-Ig, em que: (a) cerca de 90% dos polipeptídeos de CTLA4-Ig compreendem uma seqüência de aminoácido de SEQ ID NO: 2 começando com a metionina no resíduo 27; (b) cerca de 10% dos polipeptídeos de CTLA4-Ig compreendem a seqüência de aminoácido de SEQ ID NO: 2 começando com a alanina no resíduo número 26; (c) cerca de 4% dos polipeptídeos de CTLA4-Ig compreendem a seqüência de aminoácido de SEQ ID NO: 2 terminando com a lisina no resíduo número 383; (d) cerca de 96% dos polipeptídeos de CTLA4-Ig compreendem a seqüência de aminoácido de SEQ ID NO: 2 terminando com a glicina no resíduo número 382; e opcionalmente, (e) cerca de menos de 1% dos polipeptídeos de CTLA4-Ig

compreendem a seqüência de aminoácido de SEQ ID NO: 2 começando com a metionina no resíduo número 25,

Em uma modalidade, as proteínas de fusão de CTLA4-Ig, as quais são produzidas a partir de cultura a linhagem de célula, têm um coeficiente de extinção de $1,00 \pm 0,05$ AU mL cm⁻¹ mg⁻¹. Em uma modalidade, a invenção proporciona uma população de célula derivada de uma célula da invenção. Em uma modalidade, a população de célula consiste de pelo menos uma alteração genética adicional quando comparado com a célula originalmente transfectada e em que a população de célula derivada é capaz de produzir CTLA4-Ig. Em outras modalidades, a população de célula consiste de pelo menos 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 alterações genéticas adicionais quando comparado com a célula originalmente transfectada e em que a população de célula derivada é capaz de produzir CTLA4-Ig. Em uma modalidade, a alteração genética compreende pelo menos uma mutação não conservativa no genoma celular ou no cassete de expressão recombinante que codifica a CTLA4-Ig.

Em uma modalidade, a alteração genética compreende pelo menos um ácido nucleico recombinante adicional dentro da célula. Em uma modalidade, a alteração compreende uma mutação do genoma celular. Em uma modalidade, a alteração compreende a adição de um ácido nucleico ao genoma celular ou como um ácido transnucleico, o qual codifica um polipeptídeo anti-apoptótico. Em uma modalidade, o polipeptídeo anti-apoptótico se refere à glicosilação.

Em uma modalidade, alteração genética compreende pelo menos uma mutação do genoma celular ou do cassete de expressão recombinante que codifica a CTLA4-Ig. Em uma modalidade, a população de célula, quando crescida em cultura, é capaz de produzir: (a) uma proteína de fusão de CTLA4-Ig tendo uma seqüência de aminoácido de SEQ ID NO: 8 (metionina na posição de aminoácido 27 e glicina na posição de aminoácido 382 de SEQ ID NO: 2); (b) uma proteína de fusão de CTLA4-Ig tendo uma seqüência de aminoácido de SEQ ID NO: 5 (metionina na posição de aminoácido 27 e lisina na posição de aminoácido 383 de SEQ ID NO: 2); (c) uma

proteína de fusão de CTLA4-Ig tendo uma seqüência de aminoácido de SEQ ID NO: 7 (alanina na posição de aminoácido 26 e glicina na posição de aminoácido 382 de SEQ ID NO: 2); (d) uma proteína de fusão de CTLA4-Ig tendo uma seqüência de aminoácido de SEQ ID NO: 4 (alanina na posição de aminoácido 26 e lisina na posição de aminoácido 383 de SEQ ID NO: 2); (e) uma proteína de fusão de CTLA4-Ig tendo uma seqüência de aminoácido de SEQ ID NO: 4 (metionina na posição de aminoácido 25 e lisina na posição de aminoácido 383 de SEQ ID NO: 2); ou (f) uma proteína de fusão de CTLA4-Ig tendo uma seqüência de aminoácido de SEQ ID NO: 6 (metionina na posição de aminoácido 25 e glicina na posição de aminoácido 382 de SEQ ID NO: 2).

A invenção proporciona uma população de moléculas de CTLA4-Ig tendo uma proporção molar média de grupos ácido siálico para dímero de CTLA4-Ig de cerca de 6 a cerca de 18. A invenção proporciona uma população de moléculas de CTLA4-Ig tendo uma proporção molar média de grupos ácido siálico para dímero de CTLA4-Ig de cerca de 8 a cerca de 18. A invenção proporciona uma população de moléculas de CTLA4-Ig tendo uma proporção molar média de grupos ácido siálico para dímero de CTLA4-Ig de cerca de 11 a cerca de 18. A invenção proporciona uma população de moléculas de CTLA4-Ig tendo uma proporção molar média de grupos ácido siálico para dímero de CTLA4-Ig de cerca de 12 a cerca de 18. A invenção proporciona uma população de moléculas de CTLA4-Ig tendo uma proporção molar média de grupos ácido siálico para dímero de CTLA4-Ig de cerca de 13 a cerca de 18. A invenção proporciona uma população de moléculas de CTLA4-Ig tendo uma proporção molar média de grupos ácido siálico para dímero de CTLA4-Ig de cerca de 14 a cerca de 18. A invenção proporciona uma população de moléculas de CTLA4-Ig tendo uma proporção molar média de grupos ácido siálico para dímero de CTLA4-Ig de cerca de 15 a cerca de 17. A invenção proporciona uma população de moléculas de CTLA4-Ig tendo uma proporção molar média de grupos ácido siálico para dímero de CTLA4-Ig de cerca de 16.

A invenção proporciona uma população de moléculas de CTLA4-

Ig, em que mais de 95% das moléculas são dímeros de CTLA4-Ig. Em uma modalidade, mais de 98% das moléculas são dímeros de CTLA4-Ig. Em uma modalidade, mais de 99% das moléculas são dímeros de CTLA4-Ig. Em uma modalidade, mais de 99,5% das moléculas são dímeros de CTLA4-Ig. Em uma modalidade, de cerca de 95% a cerca de 99,5% das moléculas são dímeros de CTLA4-Ig e cerca de 0,5% a cerca de 5% das moléculas são tetrâmeros de CTLA4-Ig. Em uma modalidade, cerca de 98,6% das moléculas são dímeros de CTLA4-Ig e cerca de 1,2% das moléculas são tetrâmeros de CTLA4-Ig e cerca de menos de 0,7 % das moléculas são monômeros de CTLA4-Ig. A invenção proporciona uma população consistindo de dímeros de CTLA4-Ig. A invenção proporciona uma população de moléculas de CTLA4-Ig, em que a população é substancialmente isenta de monômero de CTLA4-Ig. A invenção proporciona uma população de moléculas de CTLA4-Ig, em que a população é substancialmente isenta de tetrâmero de CTLA4-Ig. A invenção proporciona uma população de monômeros de moléculas de CTLA4-Ig substancialmente isenta de dímero e tetrâmero de CTLA4-Ig. Em uma modalidade, cada monômero de cada dímero de CTLA4-Ig tem pelo menos 3 grupos ácido siálico.

Em uma modalidade, cada monômero de cada dímero de CTLA4-Ig tem de pelo menos 3 grupos ácido siálico a pelo menos 8 grupos ácido siálico. A invenção proporciona uma população purificada de moléculas tetraméricas de CTLA4-Ig, a população sendo substancialmente isenta de dímero de CTLA4-Ig e opcionalmente em que a população compreende uma quantidade que é mais de cerca de 100 gramas. A invenção proporciona uma população purificada de moléculas tetraméricas de CTLA4-Ig, a população sendo substancialmente isenta de monômero de CTLA4-Ig e opcionalmente em que a população compreende uma quantidade que é mais de cerca de 100 gramas. Em uma modalidade, cada molécula tetramérica compreende dois pares de polipeptídeos de CTLA4-Ig, em que cada polipeptídeo tem uma seqüência de aminoácido selecionada do grupo consistindo de SEQ ID NOS: 3-8 e em que cada membro do par de polipeptídeos é covalentemente ligado ao outro membro e em que os dois pares de polipeptídeos

são não covalentemente associados um ao outro. Em uma modalidade, cada molécula tetramérica é capaz de ligação a um CD80 ou CD86. Em uma modalidade, cada molécula tetramérica tem pelo menos uma avidéz 2 vezes maior pelo CD80 ou CD86 quando comparado com um dímero de molécula de CTLA4-Ig. Em uma modalidade, cada molécula tetramérica tem pelo menos uma inibição 2 vezes maior de proliferação ou ativação de células T quando comparado com um dímero de molécula de CTLA4-Ig.

A invenção proporciona uma composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig, em que a composição compreende isoformas dominantes visualizáveis sobre um gel de focalização isoeletrica de CTLA4-Ig o qual tem um ponto isoeletrico, pI , menos de ou igual a 5,1 conforme determinado através de focalização isoeletrica. Em uma modalidade, o pI aumenta após tratamento com neuraminidase. Em uma modalidade, pelo menos 40% das moléculas de CTLA4-Ig exibem um ponto isoeletrico de menos de ou igual a cerca de 5,1 conforme determinado através de focalização isoeletrica. Em uma modalidade, pelo menos 70% das moléculas de CTLA4-Ig exibem um ponto isoeletrico de menos de ou igual a cerca de 5,1 conforme determinado através de focalização isoeletrica. Em uma modalidade, pelo menos 90% das moléculas de CTLA4-Ig exibem um ponto isoeletrico de menos de ou igual a cerca de 2,5 conforme determinado através de focalização isoeletrica. A invenção proporciona uma população de moléculas de CTLA4-Ig tendo um pI de cerca de $2,0 \pm 0,2$ a cerca de $5,0 \pm 0,2$. A invenção proporciona uma população de moléculas de CTLA4-Ig tendo um pI de cerca de $4,3 \pm 0,2$ a cerca de $5,0 \pm 0,2$. A invenção proporciona uma população de moléculas de CTLA4-Ig tendo um pI de cerca de $3,3 \pm 0,2$ a cerca de $4,7 \pm 0,2$. A invenção proporciona um método para preparo de uma composição, a composição compreendendo a molécula de CTLA4-Ig com um pI de cerca de $2,0 \pm 0,2$ a cerca de $5,0 \pm 0,2$, o método compreendendo: (a) sujeição de uma mistura de moléculas de CTLA4-Ig à eletroforese em gel de focalização isoeletrica, em que uma única banda sobre o gel representa uma população de moléculas de CTLA4-Ig com um pI em particular e (b) isolamento da população de moléculas de CTLA4-Ig tendo um pI de cerca de $2,0 \pm 0,2$ a cerca de

5,0 ± 0,2 de modo a preparar uma composição. A invenção proporciona uma composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig, em que as moléculas de CTLA4-Ig são caracterizadas por uma proporção molar média de GlcNAc por mol de dímero de CTLA4-Ig de cerca de 17 a cerca de 25. A invenção

5 proporciona uma composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig, em que as moléculas de CTLA4-Ig são caracterizadas por uma proporção molar média de GlcNAc por mol de dímero de CTLA4-Ig de cerca de 15 a cerca de 35. A invenção proporciona uma composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig, em que as moléculas de CTLA4-Ig são caracterizadas por uma

10 proporção molar média de GalNAc por mol de dímero de CTLA4-Ig de cerca de 1,7 a cerca de 3,6. A invenção proporciona uma composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig, em que as moléculas de CTLA4-Ig são caracterizadas por uma proporção molar média de galactose por mol de dímero de CTLA4-Ig de cerca de 8 a cerca de 17. A invenção proporciona uma

15 composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig, em que as moléculas de CTLA4-Ig são caracterizadas por uma proporção molar média de fucose por mol de dímero de CTLA4-Ig de cerca de 3,5 a cerca de 8,3. A invenção proporciona uma composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig, em que as moléculas de CTLA4-Ig são caracterizadas por uma proporção molar

20 média de manose por mol de dímero de CTLA4-Ig de cerca de 7,2 a cerca de 22. A invenção proporciona uma composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig, em que as moléculas de CTLA4-Ig são caracterizadas por uma proporção molar média de ácido siálico por mol de dímero de CTLA4-Ig de cerca de 6 a cerca de 12. A invenção proporciona uma composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig caracterizada por: (a) uma proporção molar

25 média de GlcNAc por mol de dímero de CTLA4-Ig de cerca de 15 a cerca de 35; e (b) uma proporção molar média de ácido siálico por mol de dímero de CTLA4-Ig de cerca de 6 a cerca de 12. A invenção proporciona uma composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig caracterizada por: (a) uma

30 proporção molar média de GlcNAc por mol de dímero de CTLA4-Ig de cerca de 15 a cerca de 35; (b) uma proporção molar média de GalNAc por mol de dímero de CTLA4-Ig de cerca de 1,7 a cerca de 3,6; e (c) uma proporção

molar média de ácido siálico por mol de dímero de CTLA4-Ig de cerca de 6 a cerca de 12. A invenção proporciona uma composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig caracterizada por: (a) uma proporção molar média de GlcNAc por mol de dímero de CTLA4-Ig de cerca de 15 a cerca de 35; (b) 5 uma proporção molar média de GalNAc por mol de dímero de CTLA4-Ig de cerca de 1,7 a cerca de 3,6; (c) uma proporção molar média de galactose por mol de dímero de CTLA4-Ig de cerca de 8 a cerca de 17; e (d) uma proporção molar média de ácido siálico por mol de dímero de CTLA4-Ig de cerca de 6 a cerca de 12. A invenção proporciona uma composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig caracterizada por: (a) uma proporção molar 10 média de GlcNAc por mol de dímero de CTLA4-Ig de cerca de 15 a cerca de 35; (b) uma proporção molar média de GalNAc por mol de dímero de CTLA4-Ig de cerca de 1,7 a cerca de 3,6; (c) uma proporção molar média de galactose por mol de dímero de CTLA4-Ig de cerca de 8 a cerca de 17; (d) 15 uma proporção molar média de fucose por mol de dímero de CTLA4-Ig de cerca de 3,5 a cerca de 8,3; e (e) uma proporção molar média de ácido siálico por mol de dímero de CTLA4-Ig de cerca de 6 a cerca de 12. A invenção proporciona uma composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig caracterizada por: (a) uma proporção molar média de GlcNAc por mol de díme- 20 ro de CTLA4-Ig de cerca de 15 a cerca de 35; (b) uma proporção molar média de GalNAc por mol de dímero de CTLA4-Ig de cerca de 1,7 a cerca de 3,6; (c) uma proporção molar média de galactose por mol de dímero de CTLA4-Ig de cerca de 8 a cerca de 17; (d) uma proporção molar média de fucose por mol de dímero de CTLA4-Ig de cerca de 3,5 a cerca de 8,3; (e) uma 25 proporção molar média de manose por mol de dímero de CTLA4-Ig de cerca de 7,2 a cerca de 22; e (f) uma proporção molar média de ácido siálico por mol de dímero de CTLA4-Ig de cerca de 6 a cerca de 12,

A invenção proporciona uma composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig, em que a composição exibe um pico por cromatograma de NGNA de cerca de 9,589 \pm 0,3 e um pico por cromatograma de NANA de 30 cerca de 10,543 \pm 0,3. A invenção proporciona uma composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig, em que as moléculas de CTLA-Ig exibem um

perfil de carboidrato conforme mostrado na Figura 7. A invenção proporciona uma composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig, em que as moléculas de CTLA4-Ig exibem um perfil de carboidrato dos Domínios I - IV, em que o Domínio I compreende picos os quais representam oligossacarídeos a-sialilados, o Domínio II compreende picos os quais representam oligossacarídeos mono-sialilados, o Domínio III compreende picos os quais representam oligossacarídeos di-sialilados e o Domínio IV compreende picos os quais representam oligossacarídeos tri-sialilados. Em uma modalidade, a diferença nos tempos de retenção de oligossacarídeos N-ligados entre um primeiro pico no Domínio I e um pico principal no Domínio II é de cerca de 22 a cerca de 28 minutos. A invenção proporciona uma composição compreendendo dímeros de moléculas de CTLA4-Ig, em que pelo menos 0,5 % dos dímeros de moléculas de CTLA4-Ig são cisteinilados, em outra modalidade, pelo menos 1,0% dos dímeros de moléculas de CTLA4-Ig são cisteinilados.

A invenção proporciona uma população de moléculas de CTLA4-Ig, em que a população exibe um perfil de espectrometria de massa conforme mostrado nas Figuras 8 e 10. A invenção proporciona uma população de moléculas de CTLA4-Ig, em que a população exibe um perfil de eletroforese capilar conforme mostrado nas Figuras 20 e 21. A invenção proporciona uma composição de moléculas de CTLA4-Ig tendo uma proporção molar média de grupos ácido siálico para dímero de CTLA4-Ig de cerca de 6 a cerca de 18, em que o dímero de CTLA4-Ig é produzido a partir de células de uma linhagem de célula comercial. A invenção proporciona uma composição de CTLA4-Ig obtida através de qualquer método da invenção. A invenção proporciona uma população de moléculas de CTLA4-Ig, em que as moléculas são glicosiladas em um resíduo de aminoácido asparagina na posição 102 de SEQ ID NO: 2, um resíduo de aminoácido asparagina na posição 134 de SEQ ID NO: 2, um resíduo de aminoácido asparagina na posição 233 de SEQ ID NO: 2, um resíduo de aminoácido serina na posição 155 de SEQ ID NO: 2 ou um resíduo de aminoácido serina na posição 165 de SEQ ID NO: 2. A invenção proporciona uma população de moléculas de CTLA4-Ig, em que a população de moléculas é caracterizada por: (a) uma proporção molar média de GlcNAc

por mol de dímero de CTLA4-Ig de cerca de 15 a cerca de 35; (b) uma proporção molar média de GalNAc por mol de dímero de CTLA4-Ig de cerca de 1,7 a cerca de 3,6; (c) uma proporção molar média de galactose por mol de dímero de CTLA4-Ig de cerca de 8 a cerca de 17; (d) uma proporção molar média de fucose por mol de dímero de CTLA4-Ig de cerca de 3,5 a cerca de 8,3; (e) uma proporção molar média de manose por mol de dímero de CTLA4-Ig de cerca de 7,2 a cerca de 22; (f) uma proporção molar média de ácido siálico por mol de dímero de CTLA4-Ig de cerca de 6 a cerca de 12; (g) um pI, conforme determinado a partir de visualização sobre um gel de focalização isoeletrica, em uma faixa de cerca de $2,4 \pm 0,2$ a cerca de $5,0 \pm 0,2$; (h) MCP-1 de menos de ou igual a 5 ppm; (i) menos de 2,5 % de tetrâmero; (j) menos de 0,5% de monômero; (k) polipeptídeos de CTLA4-Ig da população tendo um aminoácido pelo menos 95% idêntica a qualquer uma de SEQ ID NOS: 2-8; (l) em que moléculas de CTLA4-Ig dentro da população é capaz de ligação ao CD80 e CD86. A invenção proporciona uma população de moléculas de CTLA4-Ig, em que a população de moléculas é caracterizada por: (a) uma proporção molar média de GlcNAc por mol de dímero de CTLA4-Ig de cerca de 15 a cerca de 35; (b) uma proporção molar média de GalNAc por mol de dímero de CTLA4-Ig de cerca de 1,7 a cerca de 3,6; (c) uma proporção molar média de galactose por mol de dímero de CTLA4-Ig de cerca de 8 a cerca de 17; (d) uma proporção molar média de fucose por mol de dímero de CTLA4-Ig de cerca de 3,5 a cerca de 8,3; (e) uma proporção molar média de manose por mol de dímero de CTLA4-Ig de cerca de 7,2 a cerca de 22; (f) uma proporção molar média de ácido siálico por mol de dímero de CTLA4-Ig de cerca de 6 a cerca de 12; (g) um pI, conforme determinado a partir de visualização sobre um gel de focalização isoeletrica, em uma faixa de cerca de $2,4 \pm 0,2$ a cerca de $5,0 \pm 0,2$; (h) MCP-1 de menos de ou igual a 5 ppm; (i) menos de 2,5 % de tetrâmero; (j) menos de 0,5% de monômero; (k) polipeptídeos de CTLA4-Ig da população tendo um aminoácido pelo menos 95% idêntica a qualquer uma de SEQ ID NOS: 2-8; (l) em que moléculas de CTLA4-Ig dentro da população é capaz de ligação ao CD80 e CD86; ou equivalentes farmacêuticos dos mesmos. A invenção proporciona

uma composição compreendendo uma quantidade eficaz das moléculas de CTLA4-Ig e um veículo farmacologicamente aceitável. A invenção proporciona uma composição compreendendo uma quantidade eficaz das moléculas de CTLA4-Ig, em que a composição ainda compreende uma quantidade de monohidrato de maltose. Em uma modalidade, a composição ainda compreende um diluente, adjuvante ou veículo farmacologicamente aceitável. Em uma modalidade, a composição ainda compreende maltose, monohidrato monobásico de fosfato de sódio, cloreto de sódio, hidróxido de sódio e água estéril. Em uma modalidade, a composição ainda compreende sacarose, poloxâmero, monohidrato monobásico de fosfato de sódio, fosfato de sódio anidrico dibásico, cloreto de sódio, hidróxido de sódio e água estéril.

A invenção proporciona uma mistura liofilizada de CTLA4-Ig compreendendo pelo menos 95% de dímero de CTLA4-Ig e não mais do que 5% de tetrâmero de CTLA4-Ig. Em uma modalidade, a mistura compreende pelo menos 98% de dímero de CTLA4-Ig e não mais do que 2% de tetrâmero de CTLA4-Ig. Em uma modalidade, a mistura compreende pelo menos 99% de dímero de CTLA4-Ig e não mais do que 1% de tetrâmero de CTLA4-Ig. Em uma modalidade, a mistura compreende pelo menos 8,0 moles de ácido siálico por mol de dímero de CTLA4-Ig. Em uma modalidade, a mistura compreende cerca de 15,7 a cerca de 31 moles de GlcNAc por mol de dímero de CTLA4-Ig. Em uma modalidade, a mistura compreende cerca de 1,6 a cerca de 3,2 moles de GalNAc por mol de dímero de CTLA4-Ig. Em uma modalidade, a mistura compreende cerca de 9,3 a cerca de 15,5 moles de galactose por mol de dímero de CTLA4-Ig. Em uma modalidade, a mistura compreende cerca de 3,6 a cerca de 7,9 moles de fucose por mol de dímero de CTLA4-Ig. Em uma modalidade, a mistura compreende cerca de 9,7 moles de manose por mol de dímero de CTLA4-Ig. A invenção proporciona um kit farmacêutico compreendendo: (a) um recipiente contendo uma mistura liofilizada de CTLA4-Ig da reivindicação 1; e (b) instruções para reconstituição da mistura liofilizada de CTLA4-Ig em solução para injeção.

A invenção proporciona um método para inibição de proliferação de células T (ou ativação), o método compreendendo contato de uma célula

T com uma quantidade eficaz de a composição de CTLA4-Ig. A invenção proporciona um método para inibição de uma resposta imune em um indivíduo, o método compreendendo administração, a um indivíduo que precisa do mesmo, de uma quantidade eficaz da composição. A invenção proporciona métodos para indução de tolerância imune a um antígeno em um indivíduo, tratamento de inflamação em um indivíduo, tratamento de artrite reumatóide, tratamento de psoríase em um indivíduo, tratamento de lupus em um indivíduo, tratamento de ou prevenção de uma alergia em um indivíduo, tratamento de ou prevenção de doença enxerto vs hospedeiro em um indivíduo, tratamento de ou prevenção de rejeição de um órgão transplantado em um indivíduo, tratamento de esclerose múltipla em um indivíduo, tratamento de diabetes do tipo I em um indivíduo, tratamento de doença inflamatória do intestino em um indivíduo, tratamento de ooforite em um indivíduo, tratamento de glomerulonefrite em um indivíduo, tratamento de encefalomielite alérgica em um indivíduo ou tratamento de miastenia gravis em um indivíduo através de administração de uma composição da invenção em uma quantidade a um indivíduo para tratar a doença ou distúrbio. A composição pode ser combinada com um veículo farmacologicamente aceitável. A invenção proporciona o uso de uma população de moléculas de CTLA4-Ig tendo uma proporção molar média de grupos ácido siálico para dímero de CTLA4-Ig de cerca de 6 a cerca de 18 na fabricação de um medicamento para o tratamento terapêutico e/ou profilático de um distúrbio imune. A invenção proporciona o uso de uma população de moléculas de CTLA4-Ig tendo uma proporção molar média de grupos ácido siálico para dímero de CTLA4-Ig de cerca de 6 a cerca de 18 na fabricação de um agente anti-artrite reumatóide em uma embalagem junto com instruções para seu uso no tratamento de artrite reumatóide. A invenção proporciona um método para inibição de proliferação de células T (ou ativação), o método compreendendo contato de uma célula T com uma quantidade eficaz da composição da invenção em combinação com metotrexato. A invenção proporciona um método para inibição de uma resposta imune em um indivíduo, o método compreendendo administração, a um indivíduo que precisa do mesmo, de uma quantidade

eficaz da composição da invenção em combinação com metotrexato. A invenção proporciona um método para indução de tolerância imune a um antígeno em um indivíduo, o método compreendendo administração, a um indivíduo que precisa do mesmo, de uma quantidade eficaz da composição de qualquer uma das reivindicações 1-64 em combinação com metotrexato.

5 A invenção proporciona um método para produção de uma proteína recombinante, o método compreendendo: (a) expansão de células de mamífero que secretam uma proteína recombinante, em que a expansão é de uma cultura originária para uma cultura líquida de pelo menos 10.000 L, em que a concentração de proteína recombinante é pelo menos 0,5 gramas / L de cultura líquida; e (b) isolamento da proteína recombinante de uma cultura líquida de

10 pelo menos 10.000 L. Em uma modalidade, a expansão da etapa (a) compreende: (i) cultura das células em um meio isento de soro quimicamente definido com pelo menos quatro passagens, de modo a obter uma densidade celular de pelo menos cerca de $1,0 \times 10^5$ células viáveis por mL, em que cada estágio de semente começa em cerca de 2×10^5 por mL e vai até 1-2 mil células por mL; (ii) manutenção das células em cultura durante um tempo suficiente para produzir, a partir da cultura, pelo menos cerca de 0,5 g / L. Em uma modalidade, a proteína é uma glicoproteína. Em uma modalidade, a

20 proteína é uma proteína de CTLA4-Ig. Em uma modalidade, as células de mamífero são a prole células. Em uma modalidade, as células de mamífero são a prole de uma linhagem de célula clonal CHO capaz de produzir Proteínas de fusão de CTLA4-Ig, em que as células CHO têm, estavelmente integradas em seu genoma, pelo menos 30 cópias de um cassete de expressão de CTLA4-Ig. Em uma modalidade, o tempo suficiente é um tempo pelo qual a viabilidade das células não cai abaixo de 30%. Em uma modalidade, o tempo suficiente é um tempo pelo qual a viabilidade das células não cai abaixo de 40%. Em uma modalidade, o tempo suficiente é um tempo pelo qual a viabilidade das células não cai abaixo de 50%. Em uma modalidade, o

30 tempo suficiente é um tempo pelo qual a viabilidade das células não cai abaixo de 60%. Em uma modalidade, o tempo suficiente é um tempo pelo qual a viabilidade das células não cai abaixo de 70% ou 80% ou 90% ou

95%. Em uma modalidade, as pelo menos quatro passagens compreendem: (i) crescimento das células em um volume de cultura de pelo menos 50 mL até uma densidade celular de cerca de 1 milhão a cerca de 2,5 mil células por mL ser atingida, (ii) crescimento das células em um volume de cultura de pelo menos 10 L até uma densidade celular de cerca de 1 milhão a cerca de 2,5 milhão de células por mL ser atingida; (iii) crescimento das células em um volume de cultura de pelo menos 100 L até uma densidade celular de cerca de 1 milhão a cerca de 2,5 milhão de células por mL ser atingida; e (iv) crescimento das células em um volume de cultura de 200 L até uma densidade celular de cerca de 1 milhão a cerca de 2,5 milhão de células por mL ser atingida. Em uma modalidade, galactose é adicionada ao meio isento de soro quimicamente definido. Em uma modalidade, a manutenção de compreende (i) diminuição da temperatura da cultura de $37\pm 2^{\circ}\text{C}$ a $34\pm 2^{\circ}\text{C}$; e (ii) diminuição da temperatura da cultura de $34\pm 2^{\circ}\text{C}$ a $32\pm 2^{\circ}\text{C}$. Em uma modalidade, a temperatura é mantida dentro da faixa de $32\pm 2^{\circ}\text{C}$ durante pelo menos 5 dias. Em uma modalidade, a temperatura é mantida dentro da faixa de $32\pm 2^{\circ}\text{C}$ durante pelo menos 6 dias. Em uma modalidade, a temperatura é mantida dentro da faixa de $32\pm 2^{\circ}\text{C}$ durante pelo menos 7 dias. Em uma modalidade, a temperatura é mantida dentro da faixa de $32\pm 2^{\circ}\text{C}$ durante pelo menos 8 dias. Em uma modalidade, a temperatura é mantida dentro da faixa de $32\pm 2^{\circ}\text{C}$ durante pelo menos 9 dias. Em uma modalidade, a temperatura é mantida dentro da faixa de $32\pm 2^{\circ}\text{C}$ durante pelo menos 10 dias. Em uma modalidade, a temperatura é mantida dentro da faixa de $32\pm 2^{\circ}\text{C}$ durante pelo menos 11 dias. Em uma modalidade, a temperatura é mantida dentro da faixa de $32\pm 2^{\circ}\text{C}$ durante pelo menos 12 dias. Em uma modalidade, a temperatura é mantida dentro da faixa de $32\pm 2^{\circ}\text{C}$ durante pelo menos 13 dias. Em uma modalidade, a temperatura é mantida dentro da faixa de $32\pm 2^{\circ}\text{C}$ durante pelo menos 14 dias. Em uma modalidade, a temperatura é mantida dentro da faixa de $32\pm 2^{\circ}\text{C}$ durante pelo menos 15 dias. Em uma modalidade, a temperatura é mantida dentro da faixa de $32\pm 2^{\circ}\text{C}$ durante pelo menos 16 dias. Em uma modalidade, a temperatura é mantida dentro da faixa de $32\pm 2^{\circ}\text{C}$ durante pelo menos 17 dias. Em uma modalidade, a temperatura é

mantida dentro da faixa de $32\pm 2^{\circ}\text{C}$ durante pelo menos 18 dias. Em uma modalidade, a temperatura é mantida dentro da faixa de $32\pm 2^{\circ}\text{C}$ durante até 18 dias. Em uma modalidade, a temperatura é mantida dentro da faixa de $32\pm 2^{\circ}\text{C}$ até a densidade celular da cultura ser de cerca de 30×10^5 a cerca de 79×10^5 células por mL de cultura líquida. A invenção proporciona um método para produção de uma proteína recombinante, o método compreendendo: (a) expansão de células de mamífero que secretam uma proteína recombinante de uma cultura originária para uma cultura líquida de pelo menos 10.000 L, de modo que a concentração de proteína recombinante é pelo menos 0,5 gramas / L de cultura líquida; e (b) isolamento da proteína recombinante de uma cultura líquida de pelo menos 10.000 L, em que o isolamento ocorre apenas quando a cultura líquida contém mais de ou igual a cerca de 6,0 moles de NANA por mol de proteína. A invenção proporciona um método para produção de uma proteína recombinante, o método compreendendo: (a) expansão de células de mamífero que secretam uma proteína recombinante de uma cultura originária para uma cultura líquida de pelo menos 10.000 L, de modo que a concentração de proteína recombinante é pelo menos 0,5 gramas / L de cultura líquida; e (b) isolamento da proteína recombinante de uma cultura líquida de pelo menos 10.000 L, em que o isolamento ocorre apenas quando a cultura líquida tem uma densidade celular de cerca de 33×10^5 a cerca de 79×10^5 células por mL.

A invenção proporciona um método para produção de uma proteína recombinante, o método compreendendo: (a) expansão de células de mamífero que secretam uma proteína recombinante de uma cultura originária para uma cultura líquida de pelo menos 10.000 L, de modo que a concentração de proteína recombinante é pelo menos 0,5 gramas / L de cultura líquida; e (b) isolamento da proteína recombinante de uma cultura líquida de pelo menos 10.000 L, em que o isolamento ocorre quando a viabilidade celular na cultura líquida não caiu para abaixo de cerca de 20% ou cerca de 30% ou cerca de 38%.

A invenção proporciona um método para produção de uma proteína recombinante, o método compreendendo: (a) expansão de células de

mamífero que secretam uma proteína recombinante de uma cultura originária para uma cultura líquida de pelo menos 10.000 L, de modo que a concentração de proteína recombinante é pelo menos 0,5 gramas / L de cultura líquida; e (b) isolamento da proteína recombinante de uma cultura líquida de pelo menos 10.000 L, em que o isolamento ocorre apenas quando a endotoxina é menos de ou igual a cerca de 76,8 EU por mL de cultura líquida.

A invenção proporciona um método para produção de uma proteína recombinante, o método compreendendo: (a) expansão de células de mamífero que secretam uma proteína recombinante de uma cultura originária para uma cultura líquida de pelo menos 10.000 L, de modo que a concentração de proteína recombinante é pelo menos 0,5 gramas / L de cultura líquida; e (b) isolamento da proteína recombinante de uma cultura líquida de pelo menos 10.000 L, em que o isolamento ocorre apenas quando a biocarga é menos de 1 unidade formação de colônia por mL de cultura líquida.

A invenção proporciona um método para produção de uma proteína recombinante, o método compreendendo: (a) expansão de células de mamífero que secretam uma proteína recombinante de uma cultura originária para uma cultura líquida de pelo menos 10.000 L, de modo que a concentração de proteína recombinante é pelo menos 0,5 gramas / L de cultura líquida; e (b) isolamento da proteína recombinante de uma cultura líquida de pelo menos 10.000 L, em que o isolamento ocorre apenas se pelo menos duas das seguintes condições são reunidas: (i) a cultura líquida contém mais de ou igual a cerca de 6,0 moles de NANA por mol de proteína, (ii) a cultura líquida tem uma densidade celular de cerca de 33×10^5 a cerca de 79×10^5 células por mL, (iii) a viabilidade celular na cultura líquida não caiu para abaixo de cerca de 20% ou cerca de 38% ou (iv) a quantidade CTLA4-Ig na cultura é mais de 0,5 g / L.

Em uma modalidade, o isolamento compreende: (i) obtenção de um sobrenadante de cultura de célula; (ii) sujeição do sobrenadante à cromatografia de troca de ânions para obter um produto de proteína eluído; (iii) sujeição do produto de proteína eluído da etapa (ii) à cromatografia de interação hidrofóbica, de modo a obter um produto de proteína enriquecido; (iv)

sujeição do produto de proteína enriquecido à cromatografia por afinidade para obter um produto de proteína enriquecido eluído; e (v) sujeição do produto de proteína enriquecido eluído de (iv) à cromatografia de troca de ânions.

5 Em uma modalidade, o produto de proteína enriquecido obtido na etapa (iii) é caracterizado pelo fato de que o percentual de qualquer multímero de elevado peso molecular é menos de 25% em peso. Em uma modalidade, a cromatografia de troca de ânions da etapa (ii) é realizada usando um tampão de lavagem compreendendo HEPES a cerca de 75 mM e NaCl a
10 cerca de 360 mM e tendo um pH de cerca de 8,0.

 Em uma modalidade, a cromatografia de troca de ânions da etapa (ii) é realizada usando um tampão de eluição compreendendo HEPES a cerca de 25 mM e NaCl a cerca de 325 mM e tendo um pH de cerca de 7,0. Em uma modalidade, a cromatografia de interação hidrofóbica da etapa (iii) é
15 realizada usando um único tampão de lavagem compreendendo HEPES a cerca de 25 mM e NaCl a cerca de 850 mM e tendo um pH de cerca de 7,0. Em uma modalidade, a cromatografia por afinidade da etapa (iv) é realizada usando um tampão de lavagem compreendendo Tris a cerca de 25 mM e NaCl a cerca de 250 mM e tendo um pH de cerca de 8,0. Em uma modalidade,
20 a cromatografia por afinidade da etapa (iv) é realizada usando um tampão de eluição compreendendo Glicina a cerca de 100 mM e tendo um pH de cerca de 3,5. Em uma modalidade, a cromatografia de troca de ânions da etapa (v) é realizada usando um tampão de lavagem compreendendo HEPES a cerca de 25 mM e NaCl de cerca de 120 mM a NaCl a cerca de 130
25 mM e tendo um pH de cerca de 8,0. Em uma modalidade, a cromatografia de troca de ânions da etapa (v) é realizada usando um tampão de eluição compreendendo HEPES a cerca de 25 mM e NaCl a cerca de 200 mM e tendo um pH de cerca de 8,0. Em uma modalidade, a cromatografia de troca de ânions da etapa (ii) é realizada usando uma coluna tendo uma resina de
30 troca de ânions tendo um grupo amina primária, secundária, terciária ou quaternária. Em uma modalidade, a resina tem um grupo funcional amina quaternária. Em uma modalidade, a cromatografia de interação hidrofóbica da

etapa (iii) é realizada usando uma resina de interação hidrofóbica tendo um grupo funcional fenila, um octila, um propila, um alcóxi, um butila ou um isoamila. Em uma modalidade, o grupo funcional é um grupo funcional fenila. Em uma modalidade, a cromatografia por afinidade da etapa (iv) é realizada usando uma coluna contendo Proteína A. Em uma modalidade, método para o preparo de CTLA4-Ig, o método compreendendo purificação de CTLA4-Ig de uma cultura de célula líquida, de modo que uma CTLA4-Ig purificada (a) tem cerca de 38 ng de MCP-1 por mg de dímero de CTLA4-Ig e (b) compreende menos de 2,5% de tetrâmero de CTLA4-Ig em peso.

Em uma modalidade, a cultura líquida de células compreende uma célula ou uma célula de prole da invenção. A invenção proporciona um método para produção de CTLA4-Ig, o método compreendendo: (a) expansão de células de prole de qualquer linhagem de células CHO comercial que são capazes de produzir CTLA4-Ig, em que a expansão é de uma cultura originária para uma cultura líquida de pelo menos 10.000 L, em que a concentração de CTLA4-Ig é pelo menos 0,5 gramas / L de cultura líquida; e (b) isolamento de CTLA4-Ig de uma cultura líquida de pelo menos 10.000 L, em que a cromatografia é sobre uma coluna com resina de interação hidrofóbica com pelo menos um grupo funcional fenila, em que o isolamento compreende uma etapa de cromatografia de interação hidrofóbica realizada usando um único tampão de lavagem compreendendo HEPES a cerca de 25 mM e NaCl a cerca de 850 mM e tendo um pH de cerca de 7,0.

EXEMPLOS DA INVENÇÃO

Uma série de Exemplos são proporcionados abaixo para facilitar uma compreensão mais completa da presente invenção. Os exemplos a seguir ilustram os modos exemplificativos e prática da presente invenção. Contudo, o escopo da invenção não está limitado às modalidades específicas divulgadas nesses Exemplos, as quais são para fins de ilustração apenas, uma vez que métodos alternativos podem ser utilizados para obter resultados similares.

Os Exemplos a seguir se referem à moléculas de CTLA4-Ig que compreendem seqüências de uma ou mais de SEQ ID NOS: 2, 4, 5, 6, 7, 8,

9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 ou 16. Esses Exemplos não se destinam a ser limitativos e aqueles habilitados na técnica compreenderão que os exemplos podem ser expandidos e adaptados, por exemplo, à outras moléculas de CTLA4-Ig, outras glicoproteínas e outras proteínas relacionadas a ou compreendendo porções de uma proteína da superfamília Ig.

A tabela a seguir apresenta exemplos que se relacionam à CTLA4-Ig e à CTLA4^{A29YL104E}-Ig.

Características de proteína de CTLA4-Ig	Proteína de CTLA4-Ig exemplificativa No. 1-- CTLA4-Ig tendo SEQ ID NO: 1, 2, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10	Proteína de CTLA4-Ig exemplificativa No. 2 -- CTLA4 ^{A29YL104E} -Ig tendo SEQ ID NO: 3 ou 4 ou 11-16
Ligação à B7-1; taxas de on / off; potência, valência	Exemplo 6	
Biocarga	Exemplo 49	
Eletroforese capilar		Exemplo 38
Teor de carboidrato, perfil de HPEAC N-ligado, os Domínios	Exemplo 3 Exemplo 44	Exemplo 22 Exemplo 37
Transfecção de linhagem de célula	Exemplo 12	Exemplo 23
DNA DE CHO	Exemplo 58	Exemplo 55
CHO Proteína de células hospedeira	Exemplo 60	Exemplo 52
Caracterização genética		Exemplo 24
Desagregação	Exemplo 5 Exemplo 33	
Endotoxina	Exemplo 48	Exemplo 48
Enchimento final	Exemplo 30	
Formulações	Exemplo 2	Exemplo 27
Proporções molares de GalNAc, GlcNAc	Exemplo 17, Exemplo 63	Exemplo 36
IEF	Exemplo 50	Exemplo 22
Bioensaio de IL-2	Exemplo 45	Exemplo 40
Imunogenicidade	Exemplo 31	
PK de única dose saudável	Exemplo 66	
MALDI-TOF	Exemplo 8	
Proporções molares de manose, fucose, galactose	Exemplo 18 Exemplo 64	Exemplo 35
Espec. de Massa	Exemplo 7	
MCP-1	Exemplo 59	Exemplo 54
Meio / cultura	Exemplo 9	
PK de macaco	Exemplo 32	
Monômero	Exemplo 4	
Proporções molares de NANA, NGNA	Exemplo 3, Exemplo 16	Exemplo 39

continuação

Características de proteína de CTLA4-Ig	Proteína de CTLA4-Ig exemplificativa No. 1-- CTLA4-Ig tendo SEQ ID NO: 1, 2, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10	Proteína de CTLA4-Ig exemplificativa No. 2 -- CTLA4 ^{A29YL104E} -Ig tendo SEQ ID NO: 3 ou 4 ou 11-16
O-ligado	Exemplo 46	
Oxidação e Deamidação	Exemplo 47	
Correlações de PK	Exemplo 42	
Plasmídeo	Exemplo 1, Exemplo 11, Exemplo 67	
Produção	Exemplo 14 Exemplo 28	Exemplo 19
Proteína A	Exemplo 62	Exemplo 53
Purificação	Exemplo 15 Exemplo 29	Exemplo 20
PK de múltipla dose em RA	Exemplo 34	
SDS-PAGE	Exemplo 51	Exemplo 26 Exemplo 56
SEC – HMW, dímero, monômero, tamanho, homogeneidade	Exemplo 10	Exemplo 25
SPR – ligação à B7.1 (BIAcore)	Exemplo 21	Exemplo 41
Sub-clonagem de linhagens de células	Exemplo 13	Exemplo 24
Triton-X 100	Exemplo 61	Exemplo 57
Mapeamentos trípticos	Exemplo 3, Exemplo 47, Exemplo 65	Exemplo 22

Abreviações:

15N	15 Nanômetro
A280	Absorbância a 280 nm
CTLA4-Ig	Antígeno 4 de Linfócito T Citotóxico/Imunoglobulina; CTLA-4 Ig
API	Ingrediente farmacêutico ativo
AU	Unidades de absorvância
B7	Ligante do receptor de CTLA-4
cfu	Unidade de formação de colônia
CHO	Ovário de Hâmster Chinês
CHOP	Proteína de Ovário de Hâmster Chinês em células hospedeiras
CV	Volume de Coluna

Enchimento de Substância de Fármaco	Concentração de Substância de Fármaco/Etapa de Diafiltração e Enchimento
ELISA	Ensaio Imunoabsorvente enzima-ligado
EU	Unidades de endotoxina
Fc	A região constante de anticorpos
GalNAc	N-Acetil-galactosamina
GlcNAc	N-Acetil-glicosamina
HEPES	Ácido 4-(2-Hidróxi-etil)piperazina-1-etano-sulfônico
HIC	Cromatografia de interação hidrofóbica; Phenyl Sepharose Fast Flow
HMW	Espécies de elevado peso molecular
HPLC	Cromatografia de líquido de elevado desempenho
IgG1	Imunoglobulina da Classe G1
IPC	Controle em-processo
LAL	Lisato de amebócito Limulus
MBR(s)	Registro(s) de lote mestre
MCP-1	Proteína 1 quimiotática de monócito
MTX	Metotrexato
MW	Peso molecular
N/A	Não aplicável
NANA	ácido N-acetilneuramínico; ácido siálico; SA
NMWC	Corte Nominal de Peso molecular
OD	Densidade óptica
PAR	Faixa aceitável provada
Planova	Filtros de remoção viral, tamanho de poro de 15 nm
PP(s)	Parâmetro(s) de processo
PQ	Qualificação de desempenho
psi	Libras por polegada quadrada
psid	Libras por Polegada quadrada, diferencial
psig	Libras por Polegada quadrada; Calibre
QFF	Q Sepharose Fast Flow
QXL	Carga extrema de Q Sepharose
rPA	Proteína recombinante A Sepharose Fast Flow
SA	Ácido siálico; ácido N-acetilneuramínico; NANA
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida/dodecil sulfato de sódio
SOP	Procedimento de operação padrão
Tris	Tris (Hidróximetil) Aminometano
Triton X-100	t-Octilfenóxi-poli-2-etanol; terc-octilfenil éter de polietileno glicol
UF	Ultrafiltração
UV	Ultravioleta
v/v	Volume por Volume
VF	Filtração viral; filtração em nanômetro
VI	Inativação viral

Exemplo 1: Confirmação da seqüência de codificação de CTLA4-Ig no plasmídeo pcSDhuCTLA4-Ig

A seqüência de ácido nucleico anotada do gene de CTLA4-Ig

presente em pcSDhuCTLA4-Ig e a seqüência de aminoácido deduzida correspondente de CTLA4-Ig são mostradas na FIG. 1. O ácido nucleico de pcSDhuCTLA4-Ig foi transfectado em células CHO de forma a gerar transfectantes estáveis que pudessem expressar moléculas de CTLA4-Ig (veja Exemplo 12). Os transfectantes foram selecionados e determinados transfectantes foram subclonados ou expandidos para gerar linhagens de células clonais.

Análise dos dados de seqüência de DNA confirmaram que as junções criadas durante a construção do plasmídeo eram conforme projetado e que os primers de oligonucleotídeo sintéticos usados na reação em cadeia de polimerase geraram a seqüência sinalizadora de oncostatina M correta a montante da seqüência de CTLA4-Ig. As alterações desejadas de cisteína para serina (nas posições 156, 162 e 165 de SEQ ID NO: 2) na região de dobradiça da proteína de fusão foram confirmadas. Esses resíduos de aminoácido são designados em negrito com um asterisco na FIG. 1. Uma alteração de aminoácido adicional de prolina para serina na posição 174 de SEQ ID NO: 2 foi também detectada. Essa alteração foi introduzida durante a síntese de cDNA de IgG₁ através da reação em cadeia de polimerase. Esse resíduo de aminoácido é também designado em negrito com um asterisco na FIG. 1.

A análise dos dados de seqüência de DNA identificou uma diferença adicional quando comparado com as seqüências de nucleotídeo publicadas da região constante de IgG₁ humana e CTLA4 humana. O códon no aminoácido 110 da região de codificação de CTLA4 foi identificado como ACC (treonina) ao invés de GCC (alanina).

Exemplo 2: Formulação de CTLA4-Ig

A composição de CTLA4-Ig para injeção, 250 mg/frasco, é um liofilizado estéril, não pirogênico para administração intravenosa (IV). Uma população de moléculas de CTLA4-Ig é embalada em frascos de vidro com tubulação de sílex do Tipo I de 15 cc. Cada frasco é tampado com uma rolha revestida com fluoro-resina de butila cinza Daikyo D-21-7-S/B2-TR de 20 mm e vedado com uma vedação flip-off branca de alumínio de 20 mm.

Cada frasco de uso único contém 250 mg de composição de CTLA4-Ig a qual é constituída com Água estéril para injeção, USP e ainda diluída com Cloreto de sódio para Injeção a 0,9%, USP, no momento de uso. A composição de CTLA4-Ig para injeção, 250 mg/frasco e a função de cada componente é listada na tabela abaixo.

Tabela 8: Composição de CTLA4-Ig

Componente	Função	mg por Frasco
CTLA4-Ig	Ingrediente ativo	262,5
Monoidrato de maltose	Agente de composição de volume / estabilizante	525
Fosfato de sódio, Mono-básico, Monoidrato ^a	Agente de tamponamento	18,1
Cloreto de sódio ^b	Ajuste de resistência iônica	15,3
Ácido clorídrico	Ajuste de pH	Ajustar o pH para ~ 7,5
Hidróxido de sódio	Ajuste de pH	

^b Esses componentes estão presentes na composição de solução de CTLA4-Ig

A composição de CTLA4-Ig contém aproximadamente 50 mg/mL de CTLA4-Ig em tampão de fosfato de sódio a 25 mM e cloreto de sódio a 50 mM em um pH de 7,5. Durante desenvolvimento anterior, esse sistema tampão foi selecionado baseado na avaliação da estabilidade física e química de CTLA4-Ig como uma função do pH, tipo de tampão, concentração de tampão e concentração de cloreto de sódio. A estabilidade de soluções de CTLA4-Ig foi investigada na faixa de pH de 5 a 9. Os resultados indicaram que a formação de espécies de elevado peso molecular era pH-dependente e a faixa de pH de estabilidade máxima estava entre 7 e 8. Em uma determinação distinta, o efeito do tipo e concentração de tampão foi avaliado, onde descobriu-se que a composição de CTLA4-Ig era igualmente estável no tampão de fosfato de sódio ou tampão de tris em um pH de 8. Adicionalmente, as concentrações de tampão entre 10 a 100 mM não têm qualquer impacto sobre a estabilidade da composição de CTLA4-Ig a 2°-8°C. Similarmente, a presença de cloreto de sódio em uma concentração entre 30 a 500 mM não teve efeito sobre a estabilidade do estado em solução da composição de CTLA4-

Ig armazenada a 2°-8°C.

Baseado nesses resultados, a composição de CTLA4-Ig a 10 mg/mL em tampão de fosfato de sódio a 25 mM e cloreto de sódio a 50 mM em um pH de 7,5 foi selecionada para formulação com uma resistência de 50 mg/frasco. A concentração de CTLA4-Ig foi depois alterada para 50 mg/mL na mesma composição de tampão para permitir o desenvolvimento das composições de CTLA4-Ig com resistências de 200 e 250 mg/frasco.

CTLA4-Ig para injeção é formulada com maltose além de tampão de fosfato de sódio e cloreto de sódio. A função dos excipientes usados nesse produto é listada na tabela acima.

A presença de sais inorgânicos, tais como os componentes de tampão cloreto de sódio e fosfato de sódio, reduz a temperatura de transição do vidro (Tg') do sistema congelado. Além disso, fosfato de sódio dibásico, o qual é formado *in situ* em um pH de 7,5, sofre cristalização preferencial durante congelamento, o que reduz o pH do micro-ambiente da solução congelada. Baseado nessas razões, as quantidades mínimas de tampão de cloreto de sódio e fosfato de sódio foram selecionadas para minimizar seu impacto sobre o processo de liofilização. Maltose é adicionada como um estabilizante o qual atua como um crio- e lio-protetor durante liofilização e quando de subsequente armazenamento do produto de fármaco, respectivamente. A composição de CTLA4-Ig para injeção, 250 mg/frasco, é um frasco estéril para único uso sem conservantes antimicrobianos.

Exemplo 3: Análise do teor de carboidrato de uma composição de CTLA4-Ig

A finalidade do método é proporcionar perfis cromatográficos de oligossacarídeos de CTLA4-Ig N-ligados. Esse procedimento pode ser usado para obter a proporção molar de ácido N-acetil neuramínico (NANA) e ácido N-glicolil neuramínico (NGNA) para proteína em amostras de CTLA4-Ig (ligação total mais livre). NANA e NGNA são duas formas de ácido siálico. A glicosilação sobre a proteína de CTLA4-Ig contém oligossacarídeos N-ligados. Por exemplo, esses oligossacarídeos podem ser liberados através de hidrólise enzimática com PNGase F durante o curso de 22 horas. O perfil

de oligossacarídeos livres é obtido usando cromatografia de troca de ânions em pH elevado empregando detecção eletroquímica. Perfis de carboidrato para os oligossacarídeos N-ligados foram avaliados usando Cromatografia de troca de ânions em pH elevado com Detecção amperométrica pulsada (HPAEC-PAD). Esses perfis foram confirmados e informação estrutural foi obtida usando cromatografia em carbono grafitado poroso (PGC) acoplada com MS. Ambas as técnicas e os resultados são descritos nessa seção. Esse procedimento é exemplificativo para CTLA4-Ig de SEQ ID NO:

Isolamento de oligossacarídeo N-ligado: Clivagem de oligossacarídeos asparagina-ligados (N-ligados) de CTLA4-Ig foi realizado através de hidrólise enzimática usando PNGase F. Para realizar a desglicosilação, CTLA4-Ig foi primeiro reduzida e desnaturada: 1-2 mg de CTLA4-Ig em 176 μ L de tampão de fosfato de sódio a 5 mM contendo SDS a 0,5% e 1% beta-mercaptoetanol foram aquecidos a 100° C durante 2 minutos, então, deixados esfriar para a temperatura ambiente. À mistura esfriada, 16 μ L de NP-40 a 10% foram adicionados. A amostra foi bem misturada e 40 μ L de PNGase F (50.000 U/mL, em tampão de fosfato de sódio a 50 mM) foram adicionados. A amostra foi bem misturada e incubada a 38° C durante 24 horas. Os oligossacarídeos enzimaticamente liberados (glicanas) foram purificados através de cromatografia de líquido de alto desempenho em fase reversa (HPLC) usando uma coluna Phenomenex Luna C18 (4,6 x 150 mm; 5 μ L) acoplada a uma coluna Thermo HyperCarb (4,6 x 100 mm; 5 μ L,) em uma taxa de fluxo de 1,0 mL/minuto; o cromatógrafo usado para o isolamento foi um Waters Alliance 2695 equipado com um detector Waters 2996. As colunas foram primeiro equilibradas com ácido trifluoroacético a 0,05% (TFA). Após injeção da amostra, um gradiente de acetonitrilo foi iniciado, terminando a 15 minutos com uma composição de solvente de TFA a 0,05% em acetonitrilo a 12%. As glicanas foram, então, eluídas da coluna HyperCarb com um gradiente de etapa para TFA a 0,05% em acetonitrilo a 60%. As glicanas foram coletadas enquanto se monitorava através de absorvância de UV a 206 nm e foram concentradas até secagem sob vácuo. Antes de subsequentes injeções, a coluna Luna C18 foi limpa com TFA a 0,05% em acetonitrilo a

40%, isopropanol a 40%, 20% de água.

Preparo de Solução de estoque de NANA (ácido N-acetil neuramínico) (1 mg/mL). Importante: Antes de pesagem, deixar que o padrão de NANA aqueça para a temperatura ambiente. Falha em assim fazer resultará em condensação de água no padrão. Abrir apenas o suficiente para obter a quantidade desejada, então, re-vedar a garrafa hermeticamente e retornar para o congelador, armazenando com dessecante. Pesar precisamente entre 3 e 10 mg do ácido N-acetil neuramínico. Registrar para aproximadamente 0,1 mg. Transferir para um recipiente de tamanho apropriado se pesagem é feita usando papel/bote de pesagem. Adicionar uma quantidade suficiente de água com grau para HPLC para proporcionar uma concentração de 1 mg/mL de solução. Misturar com uma barra de agitação ou através de turbilhonamento até dissolvida. Armazenar entre 2 e 8°C durante até 3 meses em um tubo de polipropileno.

Preparo de Solução de estoque de NGNA (ácido N-glicolil neuramínico) (1 mg/mL) Importante: Antes de pesagem, deixar o padrão de NGNA aquecer para a temperatura ambiente. Falha em assim fazer resultará em condensação de água no estoque. Abrir apenas o suficiente para obter a quantidade desejada, então, re-vedar a garrafa hermeticamente e retornar para o congelador, armazenando com dessecante. Pesar precisamente entre 3 e 10 mg (registrar para aproximadamente 0,1 mg de ácido N-glicolil neuramínico. Registrar para aproximadamente 0,1 mg. Transferir para um recipiente de tamanho apropriado se pesagem é feita usando papel/bote de pesagem. Adicionar um volume apropriado de água com grau para HPLC para proporcionar uma concentração alvo de 1 mg/mL de solução. Misturar com uma barra de agitação ou através de turbilhonamento até dissolvida. Armazenar entre 2 e 8°C durante até 3 meses em um tubo de polipropileno.

Solução de adequabilidade de sistema. Adicionar 0,050 mL de cada de soluções de estoque de NANA e NGNA a 1 mg/mL a 0,900 mL de água com grau para HPLC em um recipiente apropriado. Misturar através de turbilhonamento. Armazenar entre 2 e 8°C durante até 3 meses.

Solução de trabalho de ácido N-acetil neuramínico (0,050

mg/mL). Medir precisamente 0,050 mL de solução de estoque de NANA a 1 mg/mL e adicionar a 0,950 mL de água com grau para HPLC. Misturar através de turbilhamento. Preparar em duplicata no momento de uso.

Solução de trabalho de ácido N-glicolil neuramínico (0,050 mg/mL). Medir precisamente 0,050 mL de solução de estoque de NGNA a 1 mg/mL e adicionar a 0,950 mL de água com grau para HPLC. Misturar através de turbilhamento. Preparar em duplicata no momento de uso.

Preparo de Amostras e placebo de hidrólise. Obter a concentração de proteína para material de CTLA4-Ig do Certificado de Análise (COA). Preparar uma única amostra de placebo de hidrólise através da adição de 0,190 mL de água com grau para HPLC a um tubo para microcentrifuga de 1,5 mL. Preparar duas soluções de amostra a 1 mg/mL e material de referência de CTLA4-Ig usando água com grau para HPLC. Misturar através de turbilhamento.

Hidrólise de Amostras, material de referência de CTLA4-Ig e placebo de hidrólise. Realizar a hidrólise sobre preparados em duplicada de material de referência e amostras em tubos para microcentrifuga de 1,5 mL. Nota: É importante usar tubos para microcentrifuga os quais se encaixarão completamente no bloco de aquecimento. Adicionar 0,010 mL de H₂SO₄ a 1 M a 0,190 mL de diluições de amostra a 1 mg/mL e material de referência de CTLA4-Ig e placebo de hidrólise. Misturar através de turbilhamento e prender a tampa com uma trava para tampa ou fita. Colocar os tubos para microcentrifuga em um bloco de aquecimento a 80°C ± 2°C durante 1 hora ± 2 min. Após incubação, remover os tubos do bloco de aquecimento, colocar os tubos na microcentrifuga e centrifugar para forçar a amostra para o fundo do tubo. Transformar em alíquotas soluções hidrolisadas em frascos para amostrador automático e colocar em um amostrador automático para injeção.

Condições do instrumento. Preparar o sistema de cromatografia de líquido de elevado desempenho (HPLC). Ajustar as condições a seguir. Equilibrar a coluna durante pelo menos uma hora em uma taxa de fluxo de 0,6 mL/min e uma temperatura de 40 °C.

Fase(s) Movel(eis)	A: H2SO4 a 5 mM B: HPLC
Taxa de Fluxo	0,6 mL/ min
Tempo de operacao	25 minutos
Comprimento de onda do detector	206 nm
Temperatura da coluna	40°C
	4°C 5 µL
Tempos de retencao NGNA NANA	9,8 ± 1 minuto (dependente do sistema) 10,8 ± 1 minuto (dependente do sistema)
Condicoes de gradiente	Isocratico

- Adequabilidade de sistema.** Começar análise com uma injeção de fase móvel como o Placebo do Instrumento para avaliar a linha de base do sistema, a qual deverá ser uniforme e estável. Se a linha de base não é uniforme e estável, injeções de placebo adicionais deverão ser feitas. Nota:
- 5 Um desvio da linha de base não deverá exceder a 0,25 AU. Realizar seis injeções repetidas de Solução de adequabilidade de sistema. Calcular a Resolução (R) e placas teóricas (N).

Usando a primeira injeção de adequabilidade de sistema, calcular o número de placas teóricas (N) usando a seguinte equação:

$$\text{Número de placas teóricas: } \rightarrow N = 16 \left(\frac{t}{W} \right)^2$$

- 10 onde:

N = contagem de placa teórica

T = tempo de retenção de pico de NANA, em minutos

W = largura de pico de NANA na linha de base, em minutos

- 15 Calcular os moles de NANA e NGNA no material de referência de CTLA4-Ig e amostras. Padrões de NANA e NGNA são injetados no início e no final de cada operação. Calcular a média das contagens de área para as injeções repetidas de NANA e NGNA. Usar essa área na seguinte equação:

moles de NANA ou NGNA no material de referência Abatacept
ou amostra = $\frac{(X)(Y)}{(Z)}$

(Z)

5 X = moles de NANA ou NGNA em soluções de trabalho calculados na Seção 7.3.1

Y = contagens de área de NANA ou NGNA no material de referência abatacept para amostra para cada preparado (Nota: veja Seção 7.2 e Figura 3 para picos para integrar NANA)

10 Z = área média de NANA ou NGNA repetidos em soluções de trabalho

Em uma modalidade, a resolução entre os picos de NGNA e NANA deve ser $>1,3$. A contagem de placa teórica deve ser $>$ ou $=$ a 4000. A reprodutibilidade de injeção de adequabilidade de sistema avaliada como %RSD das contagens de área de pico de NANA deve ser $\leq 3\%$. A contagem de placa teórica deve ser ≤ 4000 . A reprodutibilidade de injeção de adequabilidade de sistema avaliada como %RSD das contagens de área de pico de NANA deve ser $\leq 3\%$.

Obtenção de perfil de oligossacarídeo N-ligado através de Cromatografia de troca de ânions em pH elevado com Detecção amperométrica pulsada (HPAEC-PAD): HPAEC de oligossacarídeos isolados foi realizada sobre um sistema de cromatografia consistindo de um Waters Alliance equipado com um Detector eletroquímico Waters 464 utilizando uma coluna de troca de ânions Dionex CarboPack PA1 (4 x 250 mm) e uma coluna de proteção Dionex CarboPack. As amostras de oligossacarídeo foram eluídas usando um gradiente de acetato de sódio em hidróxido de sódio a 200 mM (aumentando a concentração de acetato de sódio de 0 mM no momento de injeção para 225 mM a 60 minutos). O detector eletroquímico foi operado sob o modo de pulso com potenciais de pulso E1 = 0,05V (t1 = 0,4 seg), S = 0,75V (t2 = 0,2 seg), E3 = -0,15V (t3 = 0,4 seg). A célula de detecção era composta de um eletrodo de trabalho de ouro, um contra eletrodo de aço inoxidável e um eletrodo de referência de prata/cloreto de prata.

Esse método descreve o procedimento para determinar o perfil

por HPAEC (Cromatografia de troca de ânions em pH elevado) de oligossacarídeos N-ligados liberados de proteína em amostras de CTLA4-Ig. A finalidade do método é proporcionar perfis cromatográficos de CTLA4-Ig, tais como oligossacarídeos N-ligados em Substância de Fármaco de CTLA4-Ig a qual pode ser usada para análise comparativa entre diferentes composições de moléculas de CTLA4-Ig. A glicosilação sobre a proteína de CTLA4-Ig contém oligossacarídeos N-ligados. Esses oligossacarídeos são liberados através de hidrólise enzimática com PNGase F (Peptídeo: N-Glicosidase F) durante o curso de 22 horas. O perfil de oligossacarídeos livres é obtido usando cromatografia de troca de ânions em pH elevado empregando detecção eletroquímica.

Substância de fármaco de CTLA4-Ig bruta	CTLA4-Ig em fosfato de sódio a 25 mM, NaCl a 10 mM, pH = 7,5		
Frascos de recuperação total Waters com setor de silicone/PTFE ligado	Waters Corporation,	Catálogo	No.
	186000234		
RapiGest SF	Waters Corporation,	Catálogo	No.
	186001861		
Sistema Alliance HPLC equipado com: Amostrador automático (refrigerado), Módulo Eluent Degas	Waters Corporation		
Detector eletroquímico modelo 2465			
Coluna: CarboPac PA-1 4 x 250 mm	Dionex Corporation, Catálogo No. 35391		
Coluna de proteção: CarboPac PA-1 4 x 50 mm	Dionex Corporation, Catálogo No. 43096		
Sistema de coleta de dados Empower			

Perfis de oligossacarídeo de Substância de Fármaco são avaliados contra amostras de material de referência concorrentemente operadas. Os resultados são reportados como desvio percentual de domínios e picos selecionados dos mesmos picos nos padrões de referência.

Condições de cromatografia para perfil de oligossacarídeo através de Uma cromatografia de troca de íons

Temperatura da coluna	29 °C			
Taxa de fluxo	1 mL/min			
Fases móveis e condições de gradiente	Programa de gradiente			
1: NaOAc a 500 mM	Tempo			
2: NaOH a 400 mM	(min)	<u>%10</u>	<u>%230</u>	<u>%370</u>
3: Água com grau para HPLC	Inicial			
	0,0	0	30	70
	11,0	0	30	70
	12,0	4	30	66
	20,0	10	30	60
	80,0	45	30	25
	81,0	0	30	70
	100	0	30	70

Ajustes do Waters 2465

Modo

Pulso

Ajustes do Empower

Faixa = 5 μ A

E1 = +0,05V E2 = +0,75V E3 = -0,15V

t1 = 400 mseg t2 = 200 mseg t3 = 400 mseg

Tempo de amostragem (ts) = 100 mseg

Constante de tempo (filtro)t = 0,1 seg

Faixa offset = 5%

Polaridade +

Temperatura = 29 °C

NOTA: Equilibrar a coluna e detector com a fase móvel inicial na taxa de fluxo de análise durante aproximadamente 2 horas ou até a linha de base estar estável antes de fazer as injeções.

Temperatura do amostrador automático ajustada para: 4°C
 Volume de injeção: 60 µL
 Tempo de operação: 100 minutos
 Tempos de retenção aproximados (RT; minutos) de picos dominantes em cada Domínio (veja Figura 1); valores podem variar, dependendo do RT do Padrão de Adequabilidade de sistema (SS)

	RTs aproximados (min)
<u>SS:</u>	18,5
Pico 1A:	20,0
Pico 1B:	20,8
Pico 1C:	21,4
Pico 1D:	22,4
Pico 1E:	23,1
Pico 2:	31,5
Pico 3:	44,8
Pico 4:	58,5

Preparo de Fases móveis para obtenção de perfil de carboidrato de oligossacarídeo por HPAEC

Eluente 1 de HPAEC: acetato de sódio a 500 mM (NaOAc).

- 5 Pesar $20,51 \pm 0,05$ g de Acetato de sódio (anídrico) em um cilindro graduado de 500 mL contendo 400 mL de água com grau para HPLC. Levar o volume para 500 mL com água com grau para HPLC e agitar durante 5 minutos usando uma pipeta sorológica de plástico até completamente misturado. Filtrar a solução através de um filtro de náilon de 0,2 µm. Transferir para uma
- 10 garrafa de eluente de 1 L. Tampar a garrafa frouxamente e purgar com hélio durante 20 minutos. Apertar a tampa e pressurizar a garrafa com hélio. Armazenar a solução em temperatura ambiente sob hélio durante até três semanas.

Eluente 2 de HPAEC: hidróxido de sódio a 400 mM (NaOH).

- 15 Usando um cilindro graduado de 1 L, medir 960 mL de água com grau para HPLC e transferir para uma garrafa de eluente de 1 L limpa. Usando uma

pipeta sorológica de plástico, adicionar 40,0 mL de NaOH a 10 N diretamente na garrafa de eluente e misturar o eluente através de turbilhonamento. Tampar a garrafa frouxamente e purgar com hélio durante 20 minutos. Apertar a tampa e pressurizar a garrafa com hélio. Armazenar a solução em temperatura ambiente sob hélio durante até três semanas.

Eluente 3 de HPAEC: água com grau para HPLC. Encher uma garrafa de eluente de 1 L com aproximadamente 1 L de água com grau para HPLC. Colocar a garrafa de eluente sobre o sistema, tampar frouxamente e purgar durante aproximadamente 20 minutos. Apertar a tampa e pressurizar a garrafa com hélio. Armazenar a solução em temperatura ambiente sob hélio durante até três semanas.

Tampão de fosfato de sódio a 50 mM, azida de sódio a 0,02%, pH = 7,5,

15	NaH ₂ PO ₄ • H ₂ O	6,9 g
	Na N ₃	0,2 g
	H ₂ O	volume final de 1,0 litro

Pesar 6,9 g ± 0,1 g de NaH₂PO₄ • H₂O e 0,2 g NaN₃ e dissolver em 800 mL de H₂O com grau para HPLC em uma garrafa de reagente usando mistura contínua com uma barra de agitação. Usando um medidor de pH, ajustar o pH da solução para 7,5 usando NaOH a 10 M. Levar o volume final para 1,0 litro usando um cilindro graduado de 1 L. Armazenar a solução em temperatura ambiente durante até seis meses.

Solução de trabalho de enzima PNGase F em tampão de fosfato de sódio a 50 mM, azida de sódio a 0,02%, pH = 7,5.

25	Tampão de fosfato de sódio a 50 mM	
	azida de sódio a 0,02%, pH = 7,5	1,8 mL
	PNGase F do Kit, Catálogo No. P0704L	0,2 mL

Pipetear 1,8 mL de tampão de fosfato de sódio a 50 mM, azida de sódio a 0,02%, pH de 7,5 em um frasco criogênico de 1,8 mL. Adicionar 0,2 mL de PNGase F do kit e misturar totalmente. Armazenar a solução a -20°C ou pelo menos durante até seis meses. A solução pode ser transformada em alíquotas antes de congelamento.

Padrão de Adequabilidade de Sistema Externo. Solução de estoque de estaquiose (1,25 mg/mL). Pesar 0,125 g de Estaquiose sobre um papel de pesagem. Usar uma balança analítica e transferir para um frasco volumétrico de 100 mL. Encher até a marca com água com grau para HPLC e misturar totalmente. Transformar em alíquotas em porções de 2 mL em criofrascos Nalgene. Armazenar a solução a -20°C ou pelo menos durante até seis meses.

Padrão de Adequabilidade de Sistema de Estaquiose (12,5 µg/mL). Pipetear 1 mL do estoque a 1,25 mg/mL em um frasco volumétrico de 100 mL. Encher até a marca com água com grau para HPLC e misturar totalmente. Transformar em alíquotas em porções de 200 µL em tubos para microcentrífuga de 0,65 mL. Colocar os tubos em uma caixa de armazenamento apropriadamente rotulada. Armazenar a Solução de Adequabilidade de Sistema a -20°C ou pelo menos durante até seis meses.

PREPARO DE PADRÃO E AMOSTRA

Preparo de Material de Referência. A um frasco contendo 1 mg de RapiGest SF liofilizado, adicionar 625 µL de tampão de fosfato de Na a 50 mM contendo azida de Na a 0,02%, pH de 7,5. A um tubo de Eppendorf de 0,65 mL, adicionar 120 µL do tampão contendo RapiGest SF. Adicionar 40 µL de Material de Referência (~ 50 mg/mL). A concentração final de RapiGest SF deverá ser 0,12 % peso/v. Adicionar 40 µL da solução de trabalho de PNGase F, misturar totalmente, centrifugar a amostra e colocar a 38 ± 2°C durante 22 ± 2 horas (banho de água ou o compartimento do amostrador automático Alliance). Pipetear a amostra em um filtro para centrifuga Microcon YM-100 e centrifugar a 13.000 g durante 30 minutos. Colocar 200 µL de água para HPLC no filtro e enxaguar o filtrado através de centrifugação durante mais 30 minutos a 13.000 g. Submeter o filtrado combinado a turbilhonamento durante 15 segundos e centrifugar a amostra durante 10 segundos. Usando a pipetear transferir a solução resultante (~ 380 µL) para um frasco para amostrador automático de HPLC de recuperação total (item 1.15).

Preparo de amostra. A um tubo de Eppendorf de 0,65 mL, adi-

cionar 120 µL do tampão contendo RapiGest SF. Adicionar 40 µL de amostra de proteína (esse volume deverá ser igual a entre 1 e 2 mg de CTLA4-Ig). A concentração final de RapiGest SF deverá ser 0,12% peso/v. Adicionar 40 µL da solução de trabalho de PNGase F e misturar totalmente através de turbilhonamento durante 10 segundos. Centrifugar a amostra e colocar a 38 ± 2°C durante 22 ± 2 horas (banho de água ou o compartimento do amostrador automático Alliance). Pipetear a amostra em um filtro para centrífuga Microcon YM-100 e centrifugar a 13.000 g durante 30 minutos. Colocar 200 µL de água para HPLC no filtro e enxaguar o filtrado através de centrifugação durante mais 30 minutos a 13.000 g. Submeter o filtrado combinado a turbilhonamento durante 15 segundos e centrifugar a amostra durante 10 segundos. Transferir a solução resultante (~ 380 µL) para um frasco para amostrador automático de HPLC de recuperação total (item 1.15).

ADEQUABILIDADE DE SISTEMA

15 **Estabilização da célula do detector eletroquímico.** Injetar 30 µL do Padrão de Adequabilidade de Sistema Externo de Estaquiouse (12,5 µg/mL). Assegurar que a altura de pico para estaquiouse é \approx 800 nA. Assegurar que não há interferência elétrica excessiva da célula e que a linha de base é uniforme. Um cromatograma de adequabilidade de sistema representativo é mostrado na Figura 2. Se a sensibilidade à estaquiouse ou a linha de base é inaceitável, verificar a composição de tampão, limpar o eletrodo ou substituir o eletrodo. Se interferência excessiva está presente, verificar a célula para assegurar remoção de todas as bolhas de ar. Re-estabilizar a célula e re-injetar padrão de estaquiouse.

25 **Placas teóricas (N).** Determinar o número de placas teóricas (N) baseado no pico de estaquiouse usando a fórmula abaixo. Isso é feito através do sistema de análise de dados Empower ou pode também ser feito manualmente.

$$N = 16 (t / W)^2$$

onde:

30 t: tempo de retenção medido a partir do momento de injeção até o momento de eluição de pico na altura máxima

W: largura de pico através de extrapolação dos lados para a linha de base.

N deve ser ≥ 6000 . Se a contagem de placa é menos de 6000, ajustar o gradiente de operação ou substituir a coluna.

- 5 **Fator de configuração (T).** Determinar o fator de configuração de coluna (T) baseado no pico de estaquiase usando a fórmula abaixo. Isso é feito através do sistema de análise de dados Empower ou pode também ser feito manualmente.

$$T = (W_{0,05} / 2f)$$

- 10 onde:

$W_{0,05}$: largura de pico a 5% de altura (0,05h).

f: a medida (largura) a borda frontal de pico a $W_{0,05}$ para o ápice do pico.

- 15 T deve ser $\geq 1,2$. Se o fator de configuração é mais de 1,2, verificar a composição de tampão, substituir a coluna ou limpar a coluna conforme indicado e re-injetar Padrão de Adequabilidade de Sistema.

- 20 **Verificação do Tempo de Retenção do Padrão de Adequabilidade de Sistema de Estaquiase.** O tempo de retenção é dependente do sistema. O Padrão de Adequabilidade de Sistema de Estaquiase deverá exibir um tempo de retenção de $18,5 \pm 2,0$ minutos.

- 25 Material Padrão de CTLA4-Ig. Observar o perfil de carboidrato do Material de Referência entre as primeiras faixas injetado antes de injeção de amostras. O perfil de carboidrato deverá ser similar àquele mostrado na Figura 1. Os tempos de retenção absolutos são dependentes do sistema.
- 30 Assegurar que a diferença nos tempos de retenção entre os primeiros picos no Domínio I (Pico 1A) e o principal pico no Domínio III (Pico 3) está entre 22 minutos e 28 minutos. Se delineamento dos picos não se assemelha àquele obtido na Figura 1, tomar as ações apropriadas (por exemplo, verificar a função do instrumento, limpar a coluna, verificar/substituir tampões, substituir a coluna) e re-avaliar. O procedimento a seguir pode ser usado para limpar a coluna: desligar a célula e limpar a coluna com Eluente 1 a 80%, Eluente 2 a 20% durante 5 minutos, seguido por Eluente 1 a 50%, Eluente 2 a

50% durante 10 minutos. Re-equilibrar a coluna e célula (com a célula ligada) em condições iniciais e re-avaliar.

SEQÜÊNCIA DE INJEÇÃO

5 Ajustar a seqüência de injeção de oligossacarídeos isolados como segue :

Padrão de estaquiase (30 µL)

Material de Referência (60 µL)

Amostra(s) (60 µL)

Material de Referência (60 µL)

10 É recomendado que □ cinco amostras sejam operadas entre injeções de Material de Referência entre as faixas.

ANÁLISE DE DADOS

15 **Processamento de cromatogramas.** Processar os cromatogramas para o Material de Referência e amostras no Empower. Ajustar parâmetros de integração de modo que o delineamento de pico e a linha de base sejam similares àqueles mostrados na Figura 76. Pode ser preciso colocar as linhas de integração manualmente. Realizar cálculos para áreas de Domínio relativas e áreas de pico relativas, conforme mostrado. Determinar os valores médios para esses parâmetros para o material de CTLA4-Ig e

20 para cada amostra se injeções repetidas foram feitas. Para o Material de Referência, determinar o desvio relativo para os Domínios I, II, III, Picos 1A e 1B para cada réplica com relação à média de todas as réplicas.

Comparação de Perfis de Amostra com perfis de Material de Referência

25 **Comparação Visual.** Determinar se as amostras e Material de Referência têm o mesmo número de Domínios e picos primários. Picos primários são aqueles picos rotulados na Figura 76 (Picos 1A, 1B, 1C, 1D, 2, 3 e 4).

30 **Comparação de Quantificação Relativa.** Comparar as áreas relativas de amostras (Domínios I, II e III e Picos 1A e 1B; se injeções repetidas de amostras foram feitas, usar seus valores médios) com as áreas relativas médias das injeções de CTLA4-Ig entre as faixas. Determinar a diferença relativa dessas áreas a partir dos valores médios de Material de C-

TLA4-Ig.

Cálculos:

Área de Domínio % (Área de Domínio relativa). Calcular a área de Domínio % para os Domínios dos perfis para o Material de Referência e amostras. Refira-se à Figura 76 para padrão de áreas de Domínio. Seguindo o exemplo na Figura 76, calcular as proporções percentuais de domínio usando a informação e fórmula a seguir (tempos de retenção são dependentes do sistema e refletem os resultados na Figura 76):

Domínio I: Soma das áreas de pico em tempos de retenção aproximados de 18-24 minutos (Picos 1A-1E)

Domínio II: Soma dos picos de 26-38 minutos

Domínio III: Soma dos picos de 39-50 minutos

Domínio IV: Soma dos picos de 51-64 minutos

Domínio V: Soma dos picos de 65-75 minutos

NOTA: Janelas de tempo de retenção para os domínios se desviarão de acordo com variações no desempenho cromatográfico diário. Ajustar os tempos conseqüentemente.

Área de domínio individual

Área de domínio % = $x \cdot 100\%$

Soma de todas as áreas de domínio

Para os Domínios I-III, calcular também os valores médios nas injeções de Material de Referência entre as faixas, bem como nas amostras, se injeções repetidas foram feitas.

Área de pico % (Área de pico relativa). Calcular a Área de pico % para os Picos 1A, 1B, 1C e 3 dos perfis para o Material de Referência e amostras. Refira-se à Figura 1 para padrão de áreas de pico; tempos de retenção são dependentes do sistema. Calcular as proporções percentuais de pico usando a informação e fórmula a seguir:

Área de pico individual

Área de pico individual % = $x \cdot 100\%$

Soma de todas as áreas de domínio

Para cada um dos Picos 1A e 1B, calcular também os valores

médios nas injeções de Material de Referência entre as faixas, bem como nas amostras, se injeções repetidas foram feitas.

Cálculo da diferença percentual dos valores médios de Material de Referência. Usar a seguinte fórmula para calcular diferenças percentuais nas áreas relativas médias dos Domínios I-III, Picos 1A e 1B de amostras comparado com Material de Referência:

$$\text{Dif \%} = |RM - S| / RM \times 100$$

onde:

RM = valor de área relativa média de interesse para Material de Referência

S = valor de área relativa média de interesse para a amostra

|| = valor absoluto

Valores exemplificativos. Para que uma operação seja aceitável, os valores exemplificativos devem ser reunidos e todas as injeções relevantes para a amostra devem ter ocorrido com sucesso. Adicionalmente, para cada uma das injeções de Material de Referência entre as faixas, as áreas de Domínio % para os Domínios I, II e III e áreas de pico % para os Picos 1A e 1B devem estar dentro de 15% de seus valores médios.

Análise através de HPAEC-PAD: Oligossacarídeos N-ligados foram clivados de moléculas de CTLA4-Ig e analisados através de HPAEC-PAD. Oligossacarídeos eluem em quatro domínios baseado na quantidade de ácido siálico presente. Domínios foram estabelecidos baseado na migração de padrões de oligossacarídeo e foram confirmados através de MS. O Domínio I representa espécies asialiladas. Os Domínios II, III e IV representam espécies mono-, di- e tri-sialiladas, respectivamente. De forma a caracterizar a estrutura dos oligossacarídeos nos três sítios N-ligados, peptídeos T5, T7 e T14 foram individualmente isolados (refira-se à Tabela 59 para identidade desses peptídeos). Isso foi realizado usando digestão trípica de CTLA4-Ig e coleta manual de picos correspondendo a esses três peptídeos.

Os peptídeos isolados foram tratados com PNGase F para liberar os oligossacarídeos, os quais foram subsequentemente purificados e analisados através de HPAEC-PAD. Peptídeo T5 não produz um bom perfil,

uma vez que ele é difícil de purificar em virtude sua extrema hidrofobicidade. As quantidades de oligossacarídeos clivados são baixas em virtude da baixa recuperação desse peptídeo por meio de uma etapa de cromatografia de fase reversa após digestão triptica.

Tabela 3.2.S.3.1.1.3.T01				
Massas teóricas esperadas e observadas de CTLA4-Ig				
Fragmen- to Nº.	Resíduo Nº.	Massa espera- da (Dáltons)	Massa Obser- vada (Dáltons)	Seqüência Peptídica
T1 + A	-1 - 14	1536,8	1536,8	AMHVAQPAVVLASSR
T1	-1 - 14	1465,8	1465,7	MHVAQPAVVLASSR
T2	15 - 28	1485,7	1485,6	GIASFVCEYASPGK
T3	29 - 33	574,6	574,2	ATEVR
T4	34 - 38	586,7	586,3	VTVLR
T5 ^a	39 - 83	4900,4	c	QADSQVTEVCAATYMMGLNET- FLDDSICTGTSSGNQVNLTIQGLR
T6	84 - 93	1171,4	1171,4	AMDTGLYICK
T7 ^a	94 - 128	3997,5	c	VELMYPPPYLIGIGNGTQIYVID- PEPCPDSQPEPK
T8 ^b	129 - 132	435,2	ND	SSDK
T9 ^b	133 - 158	3345,7	c	THTSPPSPAPPELLGGSSV- FLFPPKPK
T10	159 - 165	834,9	834,4	DTLMISR
T11	166 - 184	2139,3	2138,6	TPEVTCVVDVSHEDPEVK
T12	185 - 198	1677,8	1677,2	FNWYVDGVEVHNAK
T13	199 - 202	500,6	500,3	TKPR
T14 ^a	203 - 211	1189,2	c	EEQYNSTYR
T15	212 - 227	1808,1	1807,4	VVSVLTVLHQDWLNGK
T16	228 - 230	438,5	438,1	EYK
T17	231 - 232	307,4	ND	CK
T18	233 - 236	446,5	ND	VSNK
T19	237 - 244	838,0	837,4	ALPAPIEK
T20	245 - 248	447,5	447,2	TISK
T21	249 - 250	217,2	ND	AK
T22	251 - 254	456,2	456,2	GQPR
T23	255 - 265	1286,4	1286,6	EPQVYTLPPSR
T24	266 - 270	604,7	604,3	DELTK
T25	271 - 280	1161,4	1160,5	NQVSLTCLVK
T26	281 - 302	2544,7	2545,6	GFYPSDIAVEWESNGQPENNYK
T27	303 - 319	1874,1	1873,2	TTPPVLDSDGSFFLYSK
T28	320 - 324	574,7	574,2	LTVDK
T29	325 - 326	261,3	ND	SR
T30	327 - 349	2803,1	2800,8	WQQGNVFSTQK
T31	350 - 356	659,1	659,1	SLSLSPG
T31 + K	350 - 357	787,9	787,0	SLSLSPGK
T2 clip	15 - 23	NE	1045,3	GIASFVCEY
T12 clip	185 - 195	NE	1364,7	FNWYVDGVEVH
T27 clip	303 - 317	NE	1658,5	TTPPVLDSDGSFFLY
T30 clip	327 - 335	NE	1125,3	WQQGNVFSC
T30 clip	327 - 333	NE	878,3	WQQGNVF

ND, Não detectado

NE, não esperado a partir de digestão trípica (essas massas não foram esperadas a partir da digestão, clivagem não-específica)

^aPeptídeos trípticos T5, T7 e T14 têm glicosilação N-ligada. A massa listada é aquela do peptídeo sem glicosilação.

5 ^bPeptídeos trípticos T8 e T9 têm glicosilação O-ligada. A massa listada é aquela do peptídeo sem glicosilação.

^cVárias massas diferentes correspondendo à diferentes glicofórmulas de peptídeos glicosilados foram observadas.

Os perfis por HPAEC-PAD para todos os carboidratos N-ligados de CTLA4-Ig e os três peptídeos são mostrados na FIGS. 55A-D. O painel A mostra o perfil de oligossacarídeo N-ligado da molécula de CTLA4-Ig, enquanto que os painéis B, C e D mostram os perfis para T5, T7 e T14, respectivamente. A quantidade de oligossacarídeos injetados para cada um dos peptídeos é diferente em virtude dos processos de preparo. A maioria dos oligossacarídeos detectados sobre o peptídeo T5 consistem dos oligossacarídeos mono- e di-sialilados. O perfil de T7 contém primariamente espécies de glicanas mono-, di- e algumas tri-sialiladas. Apenas uma pequena quantidade das estruturas tri-sialiladas pode ser detectada sobre T5. O Peptídeo T14 consiste predominantemente de oligossacarídeos asialilados e uma pequena quantidade de oligossacarídeos mono- e di-sialilados.

10
15
20

Os resultados obtidos através de HPAEC-PAD proporcionam informação sobre glicosilação N-ligada sítio-específica. Oligossacarídeos N-ligados da região de CTLA4 de CTLA4-Ig contêm uma maior proporção de espécies sialiladas do que aqueles da região Fc de CTLA4-Ig.

25 **Mapeamento peptídico com tripsina, Asp-N e tripsina/quimiotripsina de CTLA4-Ig:** CTLA4-Ig foi desnaturada e reduzida em tampão de Tris a 50 mM (pH de 8,0) contendo guanidina a 6 M e ditioneitol a 5 mM (DTT). Após uma incubação de 20 minutos a 50° C, iodoacetamida (IAA) foi adicionada para uma concentração final de 10 mM para alquilar tióis livres e a incubação foi continuada durante mais 20 minutos a 50° C no escuro. A mistura alquilada e reduzida foi carregada sobre uma coluna de des-salinização (Amersham NAP-5), então, eluída no volume de vazio com Tris a

30

50 mM, CaCl₂ a 10 mM, pH de 8,0 ou tampão de fosfato de sódio a 50 mM, pH de 7,5. Após dessalinização, CTLA4-Ig reduzida/alquilada foi digerida usando duas diferentes proteases: tripsina ou Asp-N. Para digestão com tripsina mais cquimiotripsina, CTLA4-Ig é não é reduzida nem alquilada.

5 Para digestão com tripsina, tripsina com grau para seqüenciamento (Roche, 2%, peso/peso, enzima/proteína) foi adicionada e incubada durante 4 horas a 37°C. Para digestão com Asp-N, Asp-N com grau para seqüenciamento (Roche, 4%, peso/peso, enzima/proteína) foi adicionada e incubada durante 16 horas a 37°C. Para a digestão com tripsina/quimiotripsina, tripsina com grau para seqüenciamento (Promega, 4%, peso/peso, enzima/proteína) foi adicionada e incubada durante 4 horas a 37°C, então, a-quimiotripsina foi adicionada (Sigma, 4%, peso/peso, enzima/proteína) e incubada durante 16 horas a 37°C. Todas as amostras foram colocadas em um congelador após a digestão.

15 As misturas peptídicas resultantes foram separadas através de eluição em gradiente a partir de uma coluna Waters AtlantisTM dC18 (2,1 x 250 mm) sobre uma Workstation de HPLC Waters Alliance a 0,120 mL/minuto. A coluna foi diretamente conectada ao Espectrômetro de massa Waters Micromass Q-Tof MicroTM equipado com uma fonte de pulverização de íons para coleta dos espectros de massa. Misturas peptídicas foram também separadas sobre uma coluna Varian Polaris C18 (4,6 x 250 mm) a 0,7 mL/minuto usando a mesma Workstation de HPLC. As colunas foram equilibradas com solvente A (TFA a 0,02% em água) e os peptídeos foram eluídos aumentando a concentração de solvente B (acetonitrilo a 95%/TFA a 0,02% em água). Uma válvula de derivação pós-coluna foi usada para dirigir 15% do fluxo para a workstation Q-Tof, a qual foi operada no modo de TOF positivo (m/z 100-2000). A tensão de pulverização de íons típica usada foi de 3000 V.

Análise de CTLA4-Ig através de MS: CTLA4-Ig foi diluída com 30 TRIS a 100 mM, NaCl a 25 mM, pH de 8 para uma concentração final de 0,7 mg/mL. PNGase F (New England Biolabs) foi diluída 30 vezes com TRIS a 100 mM, NaCl a 25 mM, pH de 8 para uma concentração final de 17 U/□L.

Volumes iguais (60 μ L cada) de amostra de fermentação purificada diluída e solução de glicosidase diluída foram misturados e incubados a 37° C durante 4 horas.

5 A CTLA4-Ig desglicosilada resultante (2 μ g) foi carregada sobre uma coluna de extração com cartucho em fase reversa baseada em polímero (copolímero de poliestireno e poli N-vinil-2-pirrolidinona) Waters Oasis® (2,1 x 20 mm). A coluna carregada foi lavada com 5% de solvente B (solvente A: ácido fórmico a 1% em água, solvente B: ácido fórmico a 1% em acetonitrilo) em uma taxa de fluxo de 0,2 mL/minuto durante cinco minutos para
10 dessalinizar, com o eluente desviado para descarte. Ao final de 5 minutos, um gradiente rápido (5% de solvente B a 95% de solvente B em 10 minutos) começou a eluição de CTLA4-Ig da coluna; aqui, o eluente foi dirigido para o espectrômetro de massa (Waters Micromass Q-Tof micro™) a 45 μ L/min após divisão de fluxo (sistema de cromatografia usado foi um Waters Alliance 2695 equipado com um detector Waters 2996).
15

A tensão de capilar para o Q-Tof micro™ foi ajustada a 3kV e a tensão de cone de amostra a 40 V. A média para explorações a cada 0,9 segundos foi calculada em uma exploração; o tempo inter-exploração foi de 0,1 segundo. O Analisador Q-Tof explora de m/z 800 a 2500. Espectros correspondendo à porção maior do que metade da altura de pico máxima (no cromatograma por TIC) são combinadas usando O software Waters MassLynx™. Os espectros combinados foram submetidos à deconvolução no Waters MaxEnt1. A resolução foi ajustada a 1 Da/Canal e o modelo de dano Gaussiano uniforme foi selecionado com largura no ajuste de metade da altura entre 0,5-1 Da. Proporções de intensidade mínima para o pico à esquerda e o pico à direita foram ambas ajustadas a 50%.
20
25

Análise de Oligossacarídeo N-ligado através de Cromatografia de Líquido/Espectrometria de massa (LC/MS) Usando um carbono grafitado poroso (PGC): Oligossacarídeos isolados foram separados sobre

30 uma coluna grafitada porosa (Thermo Hypercarb; 4,6 x 100 mm) usando um Sistema Waters Alliance 2695 HPLC equipado com um detector com conjunto de fotodiodo Waters 2996. Separação de oligossacarídeo foi obtida usan-

do um gradiente em dois estágios de proporções crescentes de acetonitrilo em TFA a 0,05%. Nos primeiros estágios do gradiente, o percentual de acetonitrilo oscilava de 9,6% no momento de injeção para 24% a 80 minutos, no segundo estágio do gradiente, o percentual de acetonitrilo oscilava de 24% a 80 minutos a 60% a 110 minutos. Uma taxa de fluxo de 0,2 mL/minuto foi usada sempre. A corrente de eluição foi monitorada através de detecção por UV a 206 nm e analisada através de espectrometria de massa usando um Waters MicroMass Q-ToF microTM para identificação de massa.

Análise de carboidrato através do método de LC/MS PGC:

10 Isolamento de oligossacarídeo através de desglicosilação da proteína foi realizado através de hidrólise enzimática usando PNGase F (New England Biolabs, Beverly, MA). Para a desglicosilação, entre 1 e 2 mg de glicoproteína em 160 μ L de tampão de fosfato de sódio a 50 mM contendo 0,15% (pe-
15 so/v) de Rapigest SF (Waters Corporation) foram desnaturados aquecendo a 100°C durante 2 minutos. A solução resfriada foi misturada e 40 μ L de PNGase F (50.000 U/mL, em tampão de fosfato de sódio a 50 mM, pH de 7,5) foram adicionados. A amostra foi submetida a turbilhonamento, seguido por incubação a 38° C durante 24 horas. Os oligossacarídeos enzimaticamente liberados foram purificados através de cromatografia de líquido de elevado
20 desempenho. Cromatografia de líquido em fase reversa foi realizada sobre uma coluna Phenomenex Luna 5 μ L C18 (4,6 x 150 mm, Phenomenex, Torrance, CA) acoplada a um Thermo HyperCarb 5 μ L (4,6 x 100 mm, Phenomenex, Torrance, CA) em uma taxa de fluxo de 1,0 mL/min. As colunas foram equilibradas com ácido trifluoroacético a 0,05% (TFA) antes de injeção.
25 Após injeção de amostra (150 μ L da mistura digerida), um gradiente de acetonitrilo foi iniciado terminando a 15 minutos e uma composição de solvente de TFA a 0,05% em acetonitrilo a 12%. As glicanas foram, então, eluídas da coluna HyperCarb através de lavagem com TFA a 0,05% em acetonitrilo a 60%. As glicanas foram detectadas através de absorvância de UV a 206 nm.
30 Picos eluídos de lavagem da coluna Hypercarb foram coletados e concentrados até secagem sob vácuo. Antes de subseqüentes injeções, a coluna Luna C18 foi limpa com TFA a 0,05% em acetonitrilo a 40%, isopropanol a

40%, 20% de água.

Obtenção de perfil dos oligossacarídeos isolados com PGC

O sistema usado para cromatografia PGC dos oligossacarídeos isolados consistia de um Waters Alliance equipado com um detector com conjunto de fotodiodo Waters 2996 utilizando uma coluna Hypercarb (2,1 x 100 mm). As amostras de oligossacarídeo foram eluídas usando um gradiente de acetonitrilo.

Eluição em fase móvel ácida: Gradiente de acetonitrilo em ácido trifluoroacético a 0,05% (TFA). Um gradiente em dois estágios de acetonitrilo crescente foi usado para a separação cromatográfica dos oligossacarídeos. O gradiente linear inicial de volume percentual crescente de acetonitrilo de 9,6% no momento de injeção para 24% a 80 minutos é seguido por um segundo gradiente de volume percentual crescente de acetonitrilo de 24% a 80 minutos para acetonitrilo a 60% a 110 minutos. Uma taxa de fluxo de 0,15 ml/min foi usada por todo o gradiente. A corrente de eluição foi monitorada a 206 nm com um detector de UV Waters, seguido por um Micromass Q-Tof Micro para identificação de massa. Os parâmetros de ionização para a sonda de ESI foram ajustados como segue : Tensão de capilar = 3 kV, Tensão de cone = 45 V, Temperatura da fonte de 80° C e Temperatura de dessolvatação de 175° C.

Eluição em fase móvel básica: Um gradiente de acetonitrilo em hidróxido de amônio a 0,4% (NH₄OH) foi usado para a separação cromatográfica dos oligossacarídeos. Um gradiente linear de volume percentual crescente de acetonitrilo de 10,4% no momento de injeção para 28% a 150 minutos em uma taxa de fluxo de 0,15 mL/min foi usado para produzir o perfil. A corrente de eluição foi monitorada a 206 nm com um detector de UV Waters, seguido por um Micromass Q-Tof Micro para identificação de massa. Os parâmetros de ionização para a sonda de ESI foram ajustados como segue : Tensão de capilar = 3 kV, Tensão de cone = 45 V, Temperatura da fonte de 80° C e Temperatura de dessolvatação de 175° C.

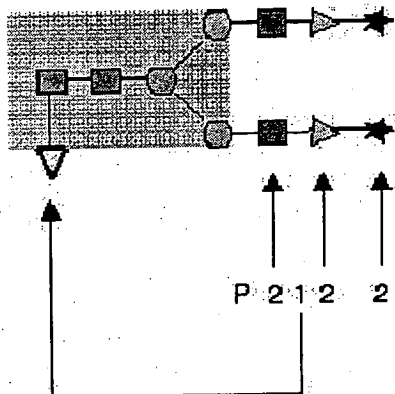
Obtenção direta de perfil de misturas de oligossacarídeo digeridas com PGC: O sistema usado para cromatografia PGC de misturas

de oligossacarídeo digeridas consistia de um Waters Alliance adaptado com uma coluna grafitada porosa Luna C18 e Hypercarb (4,6 x 100 mm, Thermo). O sistema tinha uma interface com um detector com conjunto de fotodiodo Waters 2996 e um Q-ToF Micro (Micromass). Desglicosilação de proteína foi realizada através de hidrólise enzimática usando PNGase F. Para a desglicosilação, entre 1 e 2 mg de glicoproteína em 160 μ L de tampão de fosfato de sódio a 50 mM contendo 0,15% em peso de Rapigest SF (Waters Corporation), foram desnaturados aquecendo a 100° C durante 2 minutos. A solução resfriada foi bem misturada e 40 μ L de PNGase F (50.000 U/mL, em tampão de fosfato de sódio a 50 mM, pH de 7,5) foram adicionados. A amostra foi misturada e, então, incubada a 38° C durante 24 horas. O perfil de oligossacarídeos enzimaticamente liberados foi obtido através de cromatografia de líquido de elevado desempenho. Cromatografia de líquido em fase reversa foi realizada sobre uma coluna Phenomenex Luna 5 μ m C18 (4,6 x 150 mm) acoplada a uma coluna Thermo HyperCarb 5 μ m (4,6 x 100 mm) em uma taxa de fluxo de 1,0 mL/min. As colunas foram equilibradas com ácido trifluoroacético a 0,05% (TFA). Após injeção de amostra (150 μ L de mistura digerida) um gradiente de acetonitrilo foi iniciado, terminando a 11 minutos e uma composição de solvente de TFA a 0,05% em 9% acetonitrilo. Uma troca de coluna foi usada para isolar a coluna Hypercarb e as glicanas são, então, eluídas da coluna HyperCarb com um gradiente linear de percentual crescente de acetonitrilo. Um gradiente inicial de percentual crescente de acetonitrilo de 9% no momento de injeção para 36% a 160 minutos foi usado. O segundo gradiente envolveu um volume percentual crescente de acetonitrilo de 36% a 160 minutos para acetonitrilo a 60% a 170 minutos. Uma taxa de fluxo de 0,15 mL/min foi usada por todos os gradientes de eluição. As glicanas foram detectadas através de absorvância de UV a 206 nm e através de Exploração por MS da faixa de massa de 400 - 3000 m/z. Os parâmetros de MS foram ajustados para os seguintes valores: Capilar 3 kV, Cone 45 V. Antes de subseqüentes injeções, a coluna Luna C18 foi limpa com TFA a 0,05% em acetonitrilo a 40%, isopropanol a 40%, 20% de água.

Análise através de Cromatografia em carbono grafitado po-

rosa: A estruturas dos oligossacarídeos dos Domínios I-IV foram investigadas usando Cromatografia em carbono grafitado poroso (PGC) acoplada a MS. Oligossacarídeos N-ligados foram isolados de CTLA4-Ig e purificados conforme descrito na seção HPAEC-PAD anterior. Os oligossacarídeos foram analisados usando uma Hypercarb (PGC) com um detector de UV, seguido por Q-TOF ESI/MS. O perfil por PGC para os oligossacarídeos N-ligados liberados de CTLA4-Ig através de digestão com PNGase F é mostrado na FIG. 56, com os domínios anotados. A ordem de eluição é a mesma conforme aquela observada em HPAEC-PAD. A estruturas obtidas são mostradas na Tabela 60.

A nomenclatura para denominação dos oligossacarídeos mostrados na Tabela 60 é mostrado abaixo:



A área sombreada de cinza mostra a estrutura central do oligossacarídeo N-ligado, onde P significa digestão com PNGase F e os dígitos subsequentes descrevem o número de resíduos de Manose (círculo), Fucose (triângulos apontando para cima), Galactose (triângulo apontando para a direita) e de ácido siálico (estrela), respectivamente. N-acetil glicosamina (GlcNAc) é representada por um quadrado.

Table 3.2.S.3.1.4.1.T02: N-Linked Oligosaccharide Structures and Masses Detected in Abatacept

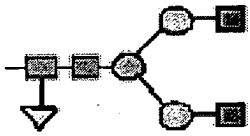
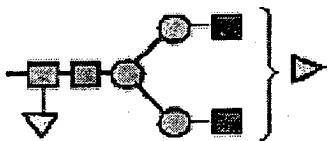
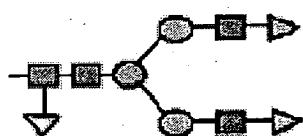
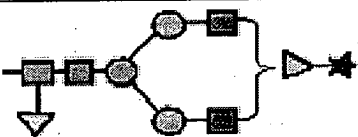
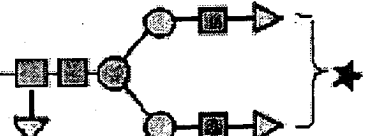
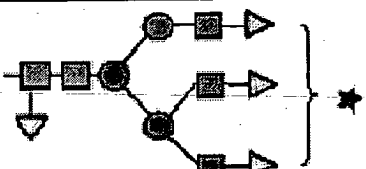
	Estrutura	Massa espe- rada (Dáltons)	Massa obser- vada (Dáltons)
Asialilada			
P2100		1463	1576 [M-H] ⁻ • TFA
P2110		1625	1738 [M-H] ⁻ • TFA
P2120		1787	1900 [M-H] ⁻ • TFA
mono-sialilada			
P2111		1916	1915 [M-H] ⁻
P2121		2078	2077 [M-H] ⁻
P3131		2443	1279 [M-2H] ²⁻

Table 3.2.S.3.1.4.1.T02: N-Linked Oligosaccharide Structures and Masses Detected in Abatacept

di-sialilada			
P2122		2369	1184 [M-2H] ⁻²
P3132		2734	1367 [M-2H] ⁻²
P4142		3099	1549 [M-2H] ⁻²
tri-sialilada			
P3133		3025	1512 [M-2H] ⁻²
P4133		3389	1695 [M-2H] ⁻²

★	NANA
▷	Galactose
■	GlcNAc
●	Mannose
▽	Fucose

5 No Domínio I, seis picos foram identificados, correspondendo aos três oligossacarídeos asialilados (estruturas P2100, P2110, P2120). A diferença de massa de 113 Dáltons entre a estrutura prevista e a massa observada é em virtude de detecção de um aduto de trifluoroácido acético (TFA). Diferentes picos com a mesma massa de 1,463 correspondendo aP2100, indica que, provavelmente, eles são diferentes anômeros.

No Domínio II, seis picos foram identificados, correspondendo

aos três oligossacarídeos biantenários e triantenários (estruturas P2111, P2121 e P3131, respectivamente), cada um contendo um resíduo de ácido siálico (ácido N-acetil neuramínico, NANA).

5 No Domínio III, seis picos foram identificados, correspondendo aos três oligossacarídeos biantenários, triantenários e tetraantenários (estruturas P2122, P3132 e P4142, respectivamente), cada um contendo dois resíduos de ácido siálico (NANA).

10 No Domínio IV, dois picos foram identificados, correspondendo a dois oligossacarídeos triantenários e tetraantenários (estruturas P3133 e P4133), cada um contendo três resíduos de ácido siálico (NANA).

Medição de proporção molar de moles de ácido siálico para moles de moléculas ou dímeros de CTLA4-Ig através de tratamento por hidrólise ácida de moléculas de CTLA4-Ig (veja FIGS. 25 e 26): Nesse método, NANA e NGNA são clivados da proteína através de hidrólise ácida.
15 Os NANA e NGNA liberados são separados através de HPLC sobre uma coluna Rezex Monosaccharide RHM e detectados através de absorvância de UV (206 nm). NANA e NGNA são quantificados baseado nos fatores de resposta de padrões de NANA e NGNA concorrentemente operados. Os resultados do teste são reportados como proporções molares (MR) de NANA e
20 NGNA, respectivamente, para proteína. Esse ensaio determina o número total de moles, ligados e não ligados, de ácido siálico.

Reagente, instrumentação e condições cromatográficas usadas no ensaio: Tampão de operação de fase móvel de ácido sulfúrico a 1M H₂SO₄ (estoque) e H₂SO₄ a 5 mM; solução padrão de NANA a 1 mg/ml;
25 padrão solução de NGNA a 1 mg/ml. Módulo Alliance Chromatographic System -Waters Corporation 2695 Separations com amostrador automático integrado; coluna Rezex Monosaccharide RHM—8 micrômetros, 7,8 x 300 mm, Phenomenex, equipada com coluna de proteção de 7,8 x 50 mm, Phenomenex; Detector-- Detector com conjunto de fotodiodo Waters Corporation 996
30 ou detector de absorvância com comprimento de onda duplo Waters Corporation 2487.

Parâmetro cromatográficos: Fluxo -- 0,600mL/min; Fase móvel

-- H₂SO₄ a 5 mM; Volume de injeção -- 5 microL; Concentração alvo -- 1 mg/ml; Tempo de operação -- 25min; Temperatura da coluna -- 40°C; Temperatura do amostrador automático -- 4°C; Comprimento de onda - 206 nm; Tempo de retenção de NANA (dependente do sistema) - 10,8 min (+ ou - 1 min), Tempo de retenção de NGNA (dependente do sistema) - 9,8 min (+ ou - 1 min.).

Padrão de Adequabilidade de Sistema: Adicionar 50 μ L de cada de NANA e NGNA a 1 mg/mL a 900 μ L de H₂O em um recipiente apropriado. Armazenar a 4°C durante até 3 meses; solução de trabalho de ácido N-acetil neuramínico (0,05 mg/mL); solução de trabalho de ácido N-glicolil neuramínico (0,05 mg/mL).

Hidrólise de Amostras e padrão de material de CTLA4-Ig: Amostras e padrão de material de CTLA4-Ig são diluídos para 1 mg/mL em H₂O para hidrólise. Amostras de CTLA4-Ig e padrão de material de CTLA4-Ig são hidrolisados através da adição de 10 μ L de H₂SO₄ a 1 M a 190 μ L de amostras diluídas e CTLA4-Ig a 1 mg/mL. Hidrólise é realizada em duplicata em tubos para microcentrifuga de 1,5 mL. As tampas são presas com uma trava para tampa ou fita. Os tubos são misturados através de turbilhamento e colocados em um bloco de aquecimento a 80°C durante 1 h. Após incubação, os tubos são removidos do bloco de aquecimento, esfriados para a temperatura ambiente durante 3 min e colocados na centrífuga para uma rápida centrifugação para coletar a amostra do fundo do tubo. Dos tubos, 50 μ L são transformados em alíquota da solução hidrolisada em frasco de amostra, a qual é colocada em um amostrador automático resfriado para injeção. O placebo de hidrólise é feito como um preparado único através da adição de 10 μ L de H₂SO₄ a 1 M a 190 μ L água em tubos para microcentrifuga de 1,5 mL. O placebo é processado conforme as amostras.

Adequabilidade de sistema: Para verificar a Adequabilidade de sistema, seis injeções repetidas do Padrão de Adequabilidade de Sistema (5 μ L cada) foram injetadas, seguido por uma injeção do placebo de hidrólise (5 μ L). Usando a última injeção de Padrão de Adequabilidade de Sistema, a Resolução (R), valores aceitáveis são maiores do que 1,3 e placas teóricas

(N), a contagem de placa teórica aceitável deve ser pelo menos 4000, foram calculadas, respectivamente. Usando as últimas cinco réplicas de adequabilidade de sistema, a reprodutibilidade de contagens de NANA foi calculada e o placebo de hidrólise foi avaliado.

5 **Resolução:** Usando a última injeção de Padrão de Adequabilidade de Sistema, a resolução de pico foi calculada usando a seguinte equação: $R = 2(T_2 - T_1)/(W_2 + W_1)$, onde R é a resolução, T₂ é o tempo de retenção do pico de NANA (pico 2), T₁ é o tempo de retenção do pico de NGNA (pico 1), W₂ é a largura na linha de base de linhas traçadas da tangente para os lados de pico 2, W₁ é a largura na linha de base de linhas traçadas da tangente para os lados de pico 1. A FIG. 25 representa uma injeção de Adequabilidade de sistema típica.

15 **Placas teóricas (N):** Usando a última injeção de Padrão de Adequabilidade de Sistema, a contagem de placa teórica (N) foi calculada usando a seguinte equação: $N = 16(RT^2/W)$, onde N é a contagem de placa teórica, RT é o tempo de retenção do pico de NANA em minutos, W é a largura na linha de base de linhas traçadas da tangente para os lados do pico de NANA. As últimas cinco injeções do Padrão de Adequabilidade de Sistema foram usadas para calcular as contagens de área média e seu desvio padrão para NANA. O desvio padrão relativo era igual ou menos de 3%. O placebo de hidrólise estava isento de quaisquer picos significativos com o tempo de retenção de NANA e NGNA.

25 **Seqüência de injeção:** Uma injeção de cada dos padrões de trabalho de NANA e NGNA foi injetada, seguido pelo material de amostra de CTLA4-Ig hidrolisado (amostras em duplicata), seguido pelo material de CTLA4-Ig hidrolisado. Após as operações com CTLA4-Ig terem terminado, uma injeção de cada dos padrões de trabalho de NANA e NGNA foi injetada.

30 Para determinar os moles de NANA ou NGNA injetados no padrão de trabalho, a seguinte equação é usada: mol de NANA ou NGNA = $(C)(P)(I)/MW$, onde C é a concentração de NANA e NGNA no padrão de trabalho, P é a pureza do padrão, I é o volume de injeção, MW é o peso molecular (309,2 g/mol para NANA e 325,3 g/mol para NGNA).

Para determinar os moles de NANA e NGNA nas amostras de CTLA4-Ig, a seguinte equação é usada: moles de NANA ou NGNA na amostra = $(X)(Y)/Z$, onde X é o número de moles no padrão de trabalho de NANA e NGNA, Y é as contagens médias de NANA e NGNA na amostra de CTLA4-Ig, Z é a área média de NANA e NGNA em duplicata nos Padrões de Trabalho. A partir das injeções em duplicata dos padrões, as contagens de área do padrão de NANA e NGNA devem ter um RSD de menos de 10%.

Para determinar a quantidade injetada em cada amostra, a seguinte equação é usada: moles de proteína = $(C)(D)(I)/MW$, onde C é a concentração de dímero de CTLA4-Ig em g/ml (obtida a partir de análise por UV), D é a diluição para hidrólise (0,95), I é o volume de injeção (0,005 ml) e MW é o peso molecular de dímero de CTLA4-Ig, conforme determinado a partir de espectrometria de massa (92,439g/mol).

A proporção molar (MR) de NANA ou NGNA para proteína de CTLA4-Ig é calculada através da seguinte equação: $MR = A/B$, onde A é o número de moles de NANA ou NGNA e B é o número de moles de moléculas ou dímeros de CTLA4-Ig.

A proporção molar (MR) de ácido siálico, NANA e NGNA para proteína de CTLA4-Ig é calculada através da seguinte equação: $MR = (A+B)/C$, onde A é o número de moles de NANA, B é o número de moles de NGNA e C é o número de moles de moléculas ou dímeros de CTLA4-Ig. Duplicatas de amostras de CTLA4-Ig e padrão de material de CTLA4-Ig devem ter um RSD de menos de 10% em proporções molares para NANA.

Linearidade de respostas determinada através de método de hidrólise de medição do teor de ácido siálico: Respostas de NANA foram demonstradas como sendo lineares com relação às concentrações de padrão de NANA na faixa de 0,5 µg/mL (padrão nominal de NANA de ~0,1% = NANA~QL) a 98,7 µg/mL (padrão nominal de NANA de ~200%). Respostas de NGNA foram demonstradas como sendo lineares às concentrações de padrão de NGNA na faixa de 5,0 µg/mL (padrão nominal de NGNA de ~10%) a 82,0 µg/mL (-160% padrão nominal de NGNA).

Respostas de NANA de material de CTLA4-Ig hidrolisado são

lineares com relação às concentrações de proteína na faixa de 0,25 mg/mL (carga nominal de CTLA4-Ig de 25%) a 2,0 mg/mL de CTLA4-Ig (carga nominal de CTLA4-Ig de 200%). Respostas de NGNA de material de CTLA4-Ig hidrolisado são lineares às concentrações de proteína na faixa de 0,25 mg/mL (carga nominal de CTLA4-Ig de 25%) a 2,0 mg/mL de CTLA4-Ig (carga nominal de CTLA4-Ig de 200%).

Precisão do método de hidrólise de medição do teor de ácido siálico: Precisão foi demonstrada para material de CTLA4-Ig (1 mg/mL) reforçado com padrões de NANA ou NGNA.

10 **Precisão do método de hidrólise de medição do teor de ácido siálico:** Experimentos de validação demonstraram a precisão do instrumento (RSD % < 3%), capacidade de repetição para o preparo de amostras (RSD % < 4%) e reprodutibilidade através de diferentes preparados de amostra, diferentes dias, diferentes instrumentos e diferentes análises (RSD % < 6% para NANA, % RSD < 12% para NGNA). Proporções molares de NANA e NGNA foram consideradas como sendo precisas dentro de uma faixa de 10% e 20%, respectivamente, dos resultados reportados.

15 **Faixa do método de hidrólise de medição do teor de ácido siálico:** A faixa de trabalho para esse ensaio foi mostrada como sendo de 20 0,49 mg/mL a 3,87 mg/mL de material de CTLA4-Ig.

Limite de detecção (DL) do método de hidrólise de medição do teor de ácido siálico: Os valores de DL individuais para Padrões de NANA e NGNA usando um detector com conjunto de fotodiodo (PDA; Sistema de HPLC 1) foram de 0,464 µg/mL e 0,402 µg/mL, respectivamente; os valores de DL individuais para NANA e NGNA usando detector com comprimento de onda duplo (Sistema de HPLC 2) foram de 0,131 µg/mL e 0,111 µg/mL, respectivamente. O DL do método, para ambas as espécies de ácido siálico e baseado no uso do detector mais sensível, foi de 0,5 µg/mL para NANA e NGNA.

30 **Limite de Quantificação (QL) do método de hidrólise de medição do teor de ácido siálico:** Os valores de QL individuais para Padrões de NANA e NGNA usando um detector com conjunto de fotodiodo (PDA;

Sistema de HPLC 1) foram de 1,68 $\mu\text{g/mL}$ e 1,52 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente; os valores de QL para NANA e NGNA usando um detector com comprimento de onda duplo (Sistema de HPLC 2) foram de 0,48 $\mu\text{g/mL}$ e 0,41 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. O QL do método, para ambas as espécies de ácido siálico e
5 baseado no uso do detector mais sensível, foi de 1,7 $\mu\text{g/mL}$ para NANA e NGNA.

Resistência/Robustez: O método foi demonstrado como sendo robusto com relação à estabilidade de solução de amostra refrigerada 48 horas, o uso de diferentes colunas, o uso de diferentes lotes de NANA e
10 NGNA e o uso de fases móveis com alteração da concentração de $\pm 5\%$.

Eletroforese em gel de IEF: O pI da glicoproteína pode também ser medido, antes e após tratamento com neuraminidase, para remover ácidos siálicos. Um aumento no pI após tratamento com neuraminidase indica a presença de ácidos siálicos sobre a glicoproteína. Um gel de IEF pode ser
15 usado para determinar o ponto isoelétrico, o número de isoformas de CTLA4-Ig. Um sistema adequado para operação do gel de IEF é o Multiphore II Electrophoresis System e um gel de IEF com pH de 4,0 a 6,5 (Amersham Biosciences). O tampão de anodo tem a seguinte composição: Ácido glutâmico a 0,1 M em ácido fosfórico a 0,5 M. O tampão de catodo tem a seguinte
20 composição: beta-alanina a 0,1 M. O gel de IEF foi pré-focalizado sob energia (25 watts) e corrente (25 mAmps) constantes até a tensão atingir \square 300V. Padrões de calibração de IEF e amostras da concentração apropriada foram carregados e o gel foi operado sob energia (25 watts) e corrente (25
25 mAmps) constantes com um máximo de 2000V durante 2,5 horas. Após fixação e coloração com azul Coomassie do gel de IEF, bandas de proteína são visualizadas através de um densitômetro. Um gel de IEF típico de preparado de dímero de CTLA4-Ig é mostrado na FIG. 11.

Exemplo 4: Isolamento e Caracterização de Cadeia simples (Monômero) de CTLA4-Ig

30 **Preparo de CTLA4-Ig de cadeia simples nativa:** Amostras de proteína recombinante de CTLA4-Ig preparadas através dos métodos da invenção foram separadas através de SEC de não-desnaturação usando um

2695 Alliance HPLC (Waters, Milford, MA) sobre duas colunas preparativas 21,5 x 300 mm TSK Gel® G3000SW_{XL} (Tosoh Bioscience, Montgomery, PA) aleatoriamente. Trinta injeções (1,0 mL de cada) da amostra a ~50 mg/mL foram separadas sob condições isocráticas usando uma fase móvel consistindo de NaH₂PO₄ a 0,2 M, NaCl a 0,9%, pH de 7,0, em uma taxa de fluxo de 1,0 mL/min. Amostras foram monitoradas em uma absorvância de 280 nm usando um detector Waters 2996 PDA. Análise foi realizada usando os softwares Waters Millennium 4,0™ e Empower Pro®. Frações foram coletadas (1,0 mL de cada) sobre um coletor de frações automático Foxy 200 de 90 a 150 minutos. Frações 16 a 39 (começando a 105 mL e terminando a 129 mL) foram empoadas e concentradas usando concentradores Centricon com um corte de 3500 MW.

A amostra (2,0 mL a ~4 mg/mL) foi ainda cromatografada sob condições de desnaturação usando uma coluna de grau prep HiLoad 26/60 Superdex 200 (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) em uma taxa de fluxo isocrática de 2,0 mL/min usando NaH₂PO₄ a 200 mM, hidrocloreto de guanidina a 6,0 M em um pH de 6,0 como a fase móvel sobre um ÄKTAexplorer™ (Amersham Biosciences). Frações 12-16 foram coletadas, empoadas, o tampão trocado para NaH₂PO₄ a 200 mM, pH de 6,0 usando uma coluna de dessalinização HiPrep 26/10 (Amersham Biosciences) e, finalmente, concentradas.

Preparo de CTLA4-Ig de cadeia simples induzida: CTLA4-Ig de cadeia simples induzida foi preparadas através de desnaturação, redução e alquilação de proteína recombinante de CTLA4-Ig preparada através dos métodos da invenção. Hidrocloreto de guanidina (0,684 g) foi pesado em um tubo de Eppendorf para centrifuga de 1,5 mL e 512 µL de NaH₂PO₄ a 200 mM, pH de 6,0 foram adicionados e submetidos a turbilhonamento até que o hidrocloreto de guanidina estivesse completamente dissolvido. Proteína recombinante de CTLA4-Ig foi desnaturada através da adição de 238 µL de material de CTLA4-Ig (concentração: 50 mg/mL) nos tubos acima e submetido a turbilhonamento, resultando em uma concentração final de CTLA4-Ig de ~10,0 mg/mL em hidrocloreto de guanidina a 6,0 M. A proteína desnaturada

foi reduzida através da adição de 2,6 μL de DTT a 1,0 M e incubação a 37°C durante 90 minutos. A proteína reduzida foi, então, alquilada através da adição de 0,047 g de iodoacetamida sólida na mistura de amostra, seguido por turbilhonamento e incubação a 37°C durante 60 minutos no escuro. A amostra (2,0 mL a ~4,0 mg/mL para cada injeção) foi cromatografada sob condições de desnaturação usando uma coluna de grau prep HiLoad 26/60 Superdex 200 em uma taxa de fluxo isocrática de 2,0 mL/min usando NaH_2PO_4 a 200 mM, hidrocloreto de guanidina a 6,0 M em um pH de 6,0 sobre um AKTAexplorer™. As frações de cadeia simples resultantes (9-12) foram coletadas, empoçadas, o tampão trocado para NaH_2PO_4 a 200 mM, pH de 6,0 sobre uma coluna de dessalinização HiPrep 26/10 e concentradas.

Análise por espectrometria de massa MALDI-TOF de CTLA4-Ig nativa e de cadeia simples induzida: As amostras de cadeia simples (20 μL) foram dessalinizadas e concentradas com C4 ZipTips (Millipore, Billerica, MA), então, eluídas com 20 μL de acetonitrilo a 80% com TFA a 0,1% saturado com ácido sinapínico. A mistura (1,0 μL) foi colocada sobre a cavidade da lâmina de amostra para MALDI e deixada secar ao ar antes de ser colocada no espectrômetro de massa. Os espectros de MALDI-MS foram adquiridos sobre um espectrômetro de massa OmniFlex (Bruker Daltonics, MA) usando um laser de nitrogênio (337 nm). As amostras foram analisadas no modo de íons positivo reflexivo através de extração retardada usando uma tensão de aceleração de 20 kV e um tempo de retardo de 200 ns. Um total de 250 espectros em um único ponto foi somado para cada amostra. Calibração externa foi obtida usando uma mistura de Tripsinogênio (23982 m/z), Proteína A (44613 m/z) e Albumina Bovina (66431 m/z).

Análise de cadeia simples usando cromatografia por exclusão de tamanho desnaturativa (HCl de Guanidina HCl): Sobrenadante de CTLA4-Ig de culturas de célula crescidas coletada em diferentes pontos durante o curso de tempo são preparadas para análise por HPLC. As amostras são preparadas através de pesagem de 0,114 g de hidrocloreto de guanidina (Mallinckrodt Baker Inc.) em um tubo de Eppendorf para centrífuga de 0,65 mL; adição de 125 μL de amostra de CTLA4-Ig no curso de tempo e turbi-

lhonamento para dissolver completamente o HCl de guanidina. Então, imediatamente, adicionar 1,8 μ L de iodoacetamida a 250 mM e misturar e incubar a 37°C durante 30 minutos.

Uma coluna de exclusão por tamanho TSK-GEL®G3000SWXL aleatória (DI de 7,8 mm x 30 cm) com uma coluna de proteção TSK (SWXL, DI DE 6,0 mm x 4,0 cm) é usada para a análise por SEC de cadeia simples realizada sobre o módulo de separação Waters 2695 com um detector 2996 com conjunto de fotodiodo. 25 μ L de cada amostra são injetados sobre a coluna equilibrada com fosfato de sódio a 200 mM, hidrocloreto de guanidina a 6,0 M, pH de 6,0 como a fase móvel. A proteínas são separados sobre a coluna com uma taxa de fluxo de 0,5 mL/min e o cromatograma resultante é coletado durante uma janela de 60 minutos. A integração e quantificação de picos individuais (monômero, cadeia simples, etc.) são realizadas usando o software Empower Pro. Para assegurar que o sistema de HPLC está funcionando apropriadamente, injeções são também feitas sobre a fase móvel, o tampão de amostra de proteína, o Padrão de Adequabilidade de Sistema e o material de CTLA4-Ig presente antes e após injeções de amostra. A resolução de pico e contagem de placa sobre o cromatograma de Padrão de Adequabilidade de Sistema são calculadas.

Análise de cisteinilação de CTLA4-Ig de cadeia simples através de análise por LC/MS de peptídeo: CTLA4-Ig foi desnaturada e reduzida em tampão de Tris a 50 mM (pH de 8,0) contendo guanidina a 6 M e ditioneitol a 5 mM (DTT). Após uma incubação de 20 minutos a 50 °C, iodoacetamida (IAM) foi adicionada para uma concentração final de 10 mM para alquilar os tióis livres e a incubação foi continuada durante mais 20 minutos a 50 °C no escuro. A mistura alquilada e reduzida foi carregada sobre uma coluna de dessalinização (Amersham, NAP-5), então, eluída no volume de vazio com Tris a 50 mM, CaCl_2 a 10 mM, pH de 8,0 ou tampão de fosfato de sódio a 50 mM, pH de 7,5. Após dessalinização, CTLA4-Ig reduzida/alquilada foi digerida usando duas diferentes proteases: tripsina ou Asp-N. Material de CTLA4-Ig foi também submetido à digestão com tripsina /quimiotripsina sem redução e alquilação.

Para digestão com tripsina, tripsina com grau para seqüenciamento (Promega, 2%, peso/peso, enzima/proteína) foi adicionada e a mistura foi incubada durante 4 horas a 37°C. Para digestão com Asp-N, Asp-N com grau para seqüenciamento (Roche, 2%, peso/peso, enzima/proteína) foi adicionada e a mistura foi incubadas durante 16 horas a 37 °C. Para a digestão com tripsina/quimiotripsina, tripsina com grau para seqüenciamento (Promega, 4%, peso/peso, enzima/proteína) foi adicionada e a mistura foi incubada durante 4 horas a 37 °C, então, a-cquimiotripsina foi adicionada (Sigma, 4%, peso/peso, enzima/proteína) e a mistura foi incubadas durante 16 horas a 37 °C. Todas as amostras foram congeladas (-20 °C) após a digestão.

As misturas peptídicas resultantes foram separadas através de eluição em gradiente a partir de uma coluna Waters Atlantis™ dC18 (2,1 x 250 mm) sobre uma Workstation de HPLC Waters Alliance a 0,12 mL/minuto. A coluna foi diretamente conectada ao Espectrômetro de massa Waters Micromass Q-Tof Micro™ equipado com uma fonte de pulverização de íons para coleta dos espectros de massa. Misturas peptídicas foram também separadas sobre uma coluna Varian Polaris C18 (4,6 x 250 mm) a 0,70 mL/minuto usando a mesma Workstation de HPLC. As colunas foram equilibradas com solvente A (TFA a 0,02% em água) e os peptídeos foram eluídos aumentando a concentração de solvente B (acetonitrilo a 95%/TFA a 0,02% em água). Uma válvula de derivação pós-coluna foi usada para dirigir 15% do fluxo para a workstation Q-Tof, a qual foi operada no modo de TOF positivo (*time of flight*) (m/z 100-2000). A tensão de pulverização de íons típica usada foi de 3000 V.

A perda de 113 ± 4 u quando de redução sugeriu que há uma modificação de dissulfeto covalente na proteína. O desvio previsto para cisteinilação é de 119,14 u. Contudo, uma perda de massa real de 111,14 u é esperada quando de redução das espécies com cadeia simples. Perda de 119,14 u resultou da remoção da cisteína e um ganho de 8 u resultou da adição de 8 prótons quando de redução das oito cisteínas intra-cadeia (Cys 47, 74, 92, 118, 197, 157, 303, 361 de SEQ ID NO: 2). Assim, mais 113 ± 4 u sobre a

massa intacta correspondem à cisteinilação com um aminoácido cisteína. A cisteína mais provável de ser modificada é Cys¹⁴⁶, uma vez que a ligação de dissulfeto inter-cadeia está ausente nas espécies com cadeia simples baseado nos dados de MALDI. Usando análise de peptídeo por LC/MS para e-

5 xaminar os peptídeos os quais contêm Cys¹⁴⁶, descobriu-se que material reduzido e não-reduzido mostram tempos de retenção e massas diferentes do material com cadeia simples. Para confirmar a cisteinilação, o peptídeo com cadeia simples contendo Cys¹⁴⁶ foi coletado e analisado usando MALDI.

O pico coletado contendo Cys¹⁴⁶ tem uma massa de 1787,48 u, em concordância com a massa prevista de 1787,51 u para o peptídeo com a cisteinilação de Cys¹⁴⁶ (FIG. 27, painel A). Esse peptídeo, após ser submetido à redução, perde 119,11 u, em concordância com uma perda prevista de 119,14 u; a perda de cisteína (FIG. 27, painel B). O material é, então, ainda manipulado com iodoacetamida produzindo um desvio de 56,99 u, em concordância com um ganho de massa previsto de 57,03 u (FIG. 27, painel C).

10

15

Exemplo 5: Manipulação de formação de Monômero ou Multímero de CTLA4-Ig

Efeitos agonísticos do meio e componentes do meio sobre a formação de cadeia simples: Os efeitos agonísticos de diferentes meios e componentes de meio são determinados para a formação de cadeia simples.

20 Moléculas de CTLA4-Ig podem ser incubadas a 37°C com vários meios e constituintes de meio individuais durante um período de 60 horas e analisados com relação à formação de cadeia simples através de desnaturação em coluna aleatória. Uma resposta agonista devastadora para formação de ca-

25 deia simples é encontrada quando da adição de cisteína a 10 mM ao tampão de formulação. Há uma rápida elevação na formação de cadeia simples a qual tem um pico em torno de seis horas após a adição de cisteína. Essa resposta diminui gradualmente durante as 56 horas restantes. Além disso, a alimentação de +30% gal realizou um aumento mais gradual, mas ainda re-

30 lativamente rápido na formação de cadeia simples. A alimentação de +30% gal é uma composição de galactose e 117E. Essa mistura é adicionada todo dia para alimentar as células. Embora, nesse experimento, cisteína tivesse

sido introduzida em quantidades artificialmente grandes independentes de 117E, há a necessidade de determinar qual dos componentes de 117E pode estar envolvido na formação de cadeia simples.

Componentes específicos de 117E e outros meios são incubados com CTLA4 Ig durante um período de 60 horas e analisados com relação à formação de cadeia simples através de seq. desnaturação em coluna aleatória. Investigação nesse meio se concentra em torno de possíveis componentes de redução e/ou inibidores de dissulfeto, os quais afetarão a formação de cadeia simples baseado em experimentos anteriores, mostrando que o dissulfeto inter-cadeia não está presente. Constituintes de 117E os quais são conhecidos por terem algum efeito de redução sobre dissulfetos foram testados; ácido lipóico, cisteína, metionina e glutatona. Novamente, uma resposta agonista devastadora para formação de cadeia simples é encontrada quando de adição de cisteína ao tampão de formulação. Há uma rápida resposta na formação de cadeia simples, a qual tem um pico em torno de seis horas, após a adição de cisteína. Essa resposta diminui gradualmente ao longo das 56 horas restantes. A principal formação de cadeia simples ocorre com meio contendo cisteína: cisteína, isolados de levedo e meio de fermentação. Os outros componentes contendo enxofre, tais como metionina e glutatona, não têm um efeito ou um efeito muito pequeno sobre a formação de cadeia simples. Não há efeitos observados pelo cloreto de amônio.

A presente invenção, portanto, abrange um método para fornecimento de uma proporção de formas de cadeia simples: dímero de uma proteína, tal proteína capaz de existir na forma de dímero, bem como de cadeia simples, compreendendo as etapas de (1) fornecimento e/ou manutenção de (tal como durante a etapa (2)) um meio de cultura de célula líquido para a cultura de células expressando a referida proteína, no qual a concentração de um agente capaz de reduzir ou inibir a formação de dímero (tal como cisteína) é selecionada para proporcionar a referida proporção e (2) cultura das referidas células para expressar a referida proteína. Adição de e/ou aumento da concentração de tal agente (por exemplo, cisteína) em um meio de cultura de célula líquido proporciona uma maior proporção de formas de cadeia

simples: dímero de tal proteína, enquanto que remoção, diminuição ou eliminação da concentração de tal agente (por exemplo, cisteína) em um meio de cultura de célula líquido diminui a proporção de formas de cadeia simples: dímero da referida proteína.

- 5 Uma modalidade particular desse método é onde a referida proteína é uma glicoproteína capaz de formação de dímero através da formação da ligação de dissulfeto inter-cadeia, tais como as moléculas de CTLA4-Ig da presente invenção.

- 10 ***Efeitos agonísticos de elevado teor de sal sobre a formação de espécies de elevado peso molecular.*** Durante o processo de purificação, CTLA4-Ig é exposta à altas concentrações de sal durante períodos variados de tempo. Os efeitos de altas concentrações de sal são determinados sobre a formação de espécies de elevado peso molecular. CTLA4-Ig (a ~ 50 mg/mL) é incubada na presença de fosfato de sódio a 500 mM, pH = 6,0,
15 37°C. Há um efeito agonístico em altas concentrações de fosfato de sódio; um aumento rápido, sustentado nas formas de espécies de elevado peso molecular, principalmente tetrâmero, é observada durante um período de 100 horas.

- 20 A presente invenção, portanto, abrange um método para redução da proporção de forma dimérica: agregado de uma proteína, tal proteína capaz de existir nas formas de dímero, bem como agregada, durante processamento (tal como durante purificação) de tal proteína, compreendendo o uso de um ou mais líquidos os quais são soluções salinas de não-agregação. Uma "solução salina de não-agregação" se refere a um líquido
25 contendo uma concentração de sal dissolvido no mesmo o qual é, com relação ao mesmo líquido contendo uma concentração maior de tal sal, menos agonística quanto à formação de agregado.

- 30 Uma modalidade particular desse método é onde a referida proteína é uma glicoproteína capaz de formação de dímero através da formação de uma ligação de dissulfeto inter-cadeia, tais como as moléculas de CTLA4-Ig da presente invenção.

Efeitos antagonísticos sobre a formação de cadeia simples:

Os experimentos de modelamento anteriores demonstraram um efeito grande e rápido sobre a formação de cadeia simples através da adição de componentes contendo cisteína. Cisteína é um aminoácido o qual contém uma sulfidril livre. Se a sulfidril está envolvida na formação de cadeia simples, ela deverá ser bloqueada através do uso de compostos antagonísticos. Um de tais compostos é iodoacetamida. Iodoacetamida é um composto solúvel em água que reage de modo rápido com qualquer sulfidril livre para formar uma ligação de tioéter irreversível. CTLA4-Ig é incubada a 37°C com vários meios, cisteína e iodoacetamida durante um período de 60 horas e analisada com relação à formação de cadeia simples através de SEC desnaturante em coluna aleatória e HMW através de seg. não desnaturante em coluna aleatória. Iodoacetamida não apenas bloqueia a formação de cadeia simples, mas também bloqueia a formação de agregado em uma composição de CTLA4-Ig e alto teor de sal. Iodoacetamida não bloqueia a formação de agregado em baixo teor de monômero de ácido siálico. Contudo, a quantidade de agregado formado no material com baixo teor de ácido siálico é comparável com a quantidade formada na composição de CTLA4-Ig.

O modelo proporciona um "insight" sobre um mecanismo que não era anteriormente bem compreendido. Parece que existem pelo menos duas vias principais de formação de agregado no processo com CTLA4-Ig que foram identificadas. A primeira via, a qual produz a grande quantidade de agregado, sulfidril cisteína livre, atua como um agonista para a formação de espécies de cadeia simples. O efeito agonístico da cisteína pode ser bloqueado através da adição de iodoacetamida. Surpreendentemente, a iodoacetamida não é apenas um antagonista para a formação de cadeia simples, mas também para a formação de espécies de elevado peso. Deverá ser notado que o processo é projetado para produzir uma composição que contém uma quantidade aumentada de ácido siálico quando comparado com a fermentação durante a purificação a jusante. Na segunda via, a qual produz muito menos agregado, uma sub-espécie a qual contém baixas quantidades de ácido siálico, não é afetada pela iodoacetamida para a formação de cadeia simples ou agregado.

A presente invenção, portanto, abrange um método para diminuir a proporção de formas de cadeia simples:dímero de uma proteína, tal proteína capaz de existir na forma de dímero, bem como de cadeia simples, compreendendo as etapas de (1) fornecimento e/ou manutenção de (tal como durante a etapa (2)) um meio de cultura de célula líquido para a cultura de células expressando a referida proteína, tal meio contendo um agente antagonístico à formação de cadeia simples (tal como iodoacetamida) e (2) cultura das referidas células para expressar a referida proteína.

A presente invenção também abrange um método para diminuição da proporção de formas de agregado:dímero de uma proteína, tal proteína capaz de existir na forma de agregado, bem como de dímero, compreendendo as etapas de (1) fornecimento e/ou manutenção de (tal como durante a etapa (2)) de um meio de cultura de célula líquido para a cultura de células expressando a referida proteína, tal meio contendo um agente antagonístico à formação de agregado e/ou antagonístico à formação de cadeia simples (tal como iodoacetamida) e (2) cultura das referidas células para expressar a referida proteína.

Uma modalidade particular desse método é onde a referida proteína é uma glicoproteína capaz de formação de dímero através da formação de uma ligação de dissulfeto inter-cadeia, tais como as moléculas de CTLA4-Ig da presente invenção.

Baseado nesses dados, não é difícil imaginar que pelo menos duas vias para a formação de agregado são induzidas em CTLA4-Ig, na principal via, cadeia simples está envolvida na formação de agregado, embora esse ainda não seja um mecanismo completamente claro. A segunda via menor, a qual é independente da formação de cadeia simples, está envolvida na formação de agregado. Essas vias podem ajudar a explicar porque existem pelo menos três formas de espécies de elevado peso molecular que podem ser cromatograficamente separadas. Esses são modelos e devem ser testados durante o processo de fermentação real de forma a determinar os efeitos reais, se houver, e a magnitude dos efeitos. Baseado nesses dados, consideração deverá ser dada à testagem não apenas do processo de

fermentação atual, mas também à fermentação desprovida de cisteína.

Exemplo 6: CTLA4-Ig Dímero e Tetrâmero

Ligação de dímero e tetrâmero de CTLA4-Ig a B7-1 Ig

5 A invenção proporciona métodos para avaliação de ligação de dímero e tetrâmero de CTLA4-Ig a B7-1Ig. Características físicas (por exemplo, coeficiente de difusão, peso molecular, valência de ligação) e parâmetros operacionais do instrumento (por exemplo, taxa de fluxo, densidade de chip) podem influenciar os resultados do ensaio Biacore. Sob limitação de transferência de massa; a taxa de ligação de tetrâmero é aproximadamente 10 20% menor do que o dímero para a mesma concentração molar. Em uma taxa de fluxo especificada, é possível que moléculas tetraméricas penetrem na matriz menos eficientemente comparado com o dímero. Sob um chip imobilizado de B7-1Ig de alta densidade, ligação competitiva de tetrâmero e dímero exibe curvas de inibição comparável. Isso indica que a valência teórica de tetrâmero (quatro) versus dímero (dois) não tem influência sobre a li- 15 gação a B7-1Ig. Concentrações molares de tetrâmero podem ser calculadas baseado em uma Curva Padrão de dímero. Usando essa abordagem, descobriu-se que a ligação de tetrâmero a B7-1Ig tem resposta dose-dependente comparado com dímero.

20 Comparação da potência de ligação de um tetrâmero e um dímero é influenciada pela unidade de medição usada para o preparo de padrões e amostras. Amostras de tetrâmero e dímero podem ser comparadas com uma concentração de 2000 ng/mL. Em uma base em massa (ng/mL), cada espécie mostra uma potência de ligação de aproximadamente 100% 25 usando uma curva padrão da mesma espécie. Contudo, a potência de ligação de tetrâmero era a metade quando determinada sobre uma Curva Padrão de dímero e a potência de ligação de um dímero foi mais do que duplicada quando determinada sobre uma Curva Padrão de tetrâmero. Uma vez que o instrumento Biacore detecta interações moleculares baseado na massa, as unidades de ressonância de sinal (RU) a partir de concentrações idênticas 30 (ng/mL) de tetrâmero e dímero deverão ser as mesmas. Embora o sistema de detecção seja uma função da massa, a interação entre moléculas

ocorre em uma base molar. Portanto, as concentrações molares de dímero de CTLA4-Ig e tetrâmero de CTLA4-Ig são de 21,6 nM e 10,8 nM, respectivamente, a 2000 ng/mL. Usando a concentração molar, as amostras de dímero de CTLA4-Ig e tetrâmero de CTLA4-Ig mostram potência de ligação comparável sobre uma Curva Padrão de dímero. Usando a mesma abordagem de concentração molar sobre uma curva de padrão de tetrâmero de CTLA4-Ig, a amostra de dímero de CTLA4-Ig mostra um aumento extra de 30% na potência de ligação comparado com a amostra de tetrâmero. Essa observação é em virtude de uma diminuição no declínio da Curva Padrão de tetrâmero em altas concentrações, resultando em uma maior concentração calculada para uma determinada taxa de ligação inicial. Uma explicação para essa observação é o efeito da transferência de massa.

Experimento com limitação de transferência de massa indica que a taxa de ligação inicial do tetrâmero de CTLA4-Ig é aproximadamente 20% menor do que aquela do dímero de CTLA4-Ig para o mesmo número de moléculas (isto é, a taxa de ligação do tetrâmero difere do dímero por um fator de 0,8). Essa diferença observada é em virtude do peso molecular das duas espécies e seu efeito sobre a difusão das moléculas para a superfície do chip. O coeficiente de difusão da molécula é inversamente proporcional à raiz cúbica do peso molecular. Um menor coeficiente de difusão indicaria menor movimento das moléculas. Baseado nos respectivos pesos moleculares, o coeficiente de difusão calculado de tetrâmero de CTLA4-Ig é 0,8 vezes aquele do dímero de CTLA4-Ig ou, inversamente, aquele do dímero é 1,25 vezes aquele do tetrâmero. Dados experimental são consistentes com essa observação, onde o dímero de CTLA4-Ig mostra uma potência de 133%, conforme calculado a partir de uma curva padrão de tetrâmero de CTLA4-Ig usando concentrações molares. Limitações de transferência de massa sobre chips de alta densidade são mais pronunciadas em menores taxas de fluxo e menores concentrações de analito. À medida que a taxa de fluxo aumenta, o dímero mostra taxas de ligação iniciais mais rápidas comparado com o tetrâmero. Portanto, o peso molecular aumentado e menor coeficiente de difusão do tetrâmero contribuem para as diferenças na taxa de ligação inicial

comparado com o dímero.

Ligação competitiva de dímero e tetrâmero de CTLA4-Ig a B71Ig indica que o tetrâmero e dímero mostram Valência de ligação similar sob condições limitadas de transferência de massa. Os efeitos de tetrâmero adicional sobre um chip de B7-1Ig inicialmente ligado com dímero ou tetrâmero indicam baixo potencial de ligação. Essa observação não é em virtude de disponibilidade limitada do sítio de ligação, porque o dímero adicional poderia se ligar a chips de B7-1Ig inicialmente ligado com dímero de CTLA4-Ig ou CTLA4-Ig tetrâmero. Penetração limitada na matriz pode explicar a diminuição observada na ligação de tetrâmero.

A natureza pela qual moléculas se ligam sobre o Biacore afeta a interpretação dos resultados. As moléculas de tetrâmero e dímero se difundem em diferentes taxas em virtude de suas diferenças no tamanho molecular sob a condição de limitação de transferência de massa. Além disso, impedimento estérico sobre a superfície de um chip de alta densidade afeta a penetração de subseqüentes moléculas na matriz.

Características físicas, tais como o peso molecular, coeficiente de difusão e ligação de cada espécie precisa ser considerada quando de realização de análises de concentração sobre o Biacore. Padrões usados para comparação do analito de interesse deverão ser do mesmo material. Contudo, tetrâmero ainda pode ser analisado contra padrões de dímero se os padrões e amostras são expressos em uma base molar onde o tamanho molecular é levado em consideração. Os dados apresentados indicam que a ligação de dímero de CTLA4-Ig e tetrâmero de CTLA4-Ig a B7-1Ig é comparável.

Dímero e tetrâmero de CTLA4-Ig mostram taxas de associação (k_{on}) similares. Contudo, o tetrâmero mostra uma menor taxa de dissociação (k_{off}), a qual é atribuída à avidéz em virtude de aumento no número de sítios de ligação.

Análise de cinética de ligação entre duas proteínas, tais como um ligante e um receptor, pode ser realizada sobre o Biacore usando um chip imobilizado com uma baixa densidade de ligante de aproximadamente

600-800 RUs, de modo que a capacidade de ligação máxima (R_{max}) está na faixa de 50-150 RU. A finalidade de um chip de baixa densidade é minimizar os efeitos da avidéz e transporte de massa. A avidéz é observada quando analitos multivalentes permanecem ligados à superfície do chip em virtude
5 proximidade íntima de ligantes disponível à medida que dissociação de sítios de ligação individuais ocorre. Transporte de massa é observado quando há uma diferença significativa na concentrações de analito entre a superfície do chip e a solução bruta.

Em uma modalidade, a molécula de CTLA4-Ig é um dímero consistindo de duas moléculas com cadeia simples ligadas através de uma única
10 ligação de dissulfeto inter-cadeia e contém dois sítios de ligação para moléculas de B7. Em outra modalidade, formação de tetrâmero de CTLA4-Ig, conforme confirmado através de dispersão de luz, SEC e SDS-PAGE, resulta em uma molécula com potencialmente quatro sítios de ligação. A cinética
15 de ligação de monômeros e dímeros purificados é estaticamente comparada com material de dímero de CTLA4-Ig. Não existem diferenças significativas nas taxas k_{on} (p valores $> 0,05$). A taxa k_{off} de tetrâmero é significativamente diferente da taxa k_{off} do dímero. A taxa k_{off} do dímero purificado do pico de clarificação por HIC não é significativamente diferente da taxa k_{off} do material
20 de dímero de CTLA4-Ig. Portanto, o tetrâmero dissocia mais lentamente do que o dímero, indicando um efeito de avidéz em virtude do número aumentado de sítios de ligação pela molécula.

Tetrâmero pode ser separado e dissociado do dímero através de tratamento com guanidina. Esse dímero de CTLA4-Ig tratado com guanidina
25 foi analisado e os resultado indicam que suas características de ligação cinética eram similares àquelas do dímero de CTLA4-Ig formado sob condições fisiológicas. Essa observação sustenta a hipótese de que a diferença observada na taxa k_{off} entre dímero e tetrâmero está relacionada à valência de ligação das moléculas e à natureza inerente do método Biacore, onde a avidéz exerce um papel na cinética de ligação.
30

Purificação por afinidade de material de CTLA4-Ig do pico de clarificação por HIC:

Cromatografia por afinidade em Proteína A-Sepharose: 500 mL de pico de clarificação por HIC foram filtrados através de um sistema com filtro de 0,22 microns de 1 L (Corning, Corning, NY, Parte no. 430517) e carregada sobre a coluna de rProteína A-Sepharose (5 cm x 15 cm), a qual
5 foi pré-equilibrada com solução salina tamponada com fosfato (Sigma, St. Louis, MO, P-4417) em um pH de 7,4. A coluna foi lavada com 700 mL de PBS, pH de 7,4 e eluída com glicina a 100 mM, pH de 3,5. Frações de 50 mL de cada foram neutralizadas para coleta através da adição de 0,5 mL de Tris a 2,0 M, pH de 10 em tubos de coleta. Frações foram ensaiadas em uma
10 absorvância de 280 nm, empoçadas e concentradas usando um cartucho Centriprep YM-3 (Millipore Corporation, Bedford, MA, Parte no. 4203). A solução de proteína purificada foi armazenada a -70° C.

Cromatografia por afinidade PROSEP- rA (proteína recombinante A): 500 mL de pico de clarificação por HIC foram filtrados através de
15 um sistema com filtro de 0,22 microns de 1 L (Corning, Corning, NY, Parte no. 430517) e carregados em uma taxa de fluxo de 25 mL/minuto sobre uma coluna PROSEP-rA High Capacity (Millipore Corporation, Bedford, MA) (25 mm x 28 cm), a qual foi pré-equilibrada com Tris a 25 mM, pH de 8,0 contendo cloreto de sódio 250 mM. O sistema Waters PrepLC equipado com
20 Waters 2767 Sample Manager e um detector com conjunto de fotodiodo Waters 2996 foi usado para essa cromatografia. A coluna foi lavada com tampão de equilíbrio a 25 mM durante 30 minutos em uma taxa de fluxo de 25 mL/minuto e eluída com acetato a 100 mM, pH de 3,0 em uma taxa de fluxo de 25 mL/minuto durante 30 minutos. Frações de 10 mL de cada foram neu-
25 tralizadas para eluição através de coleta sobre 50 µl de Tris a 2,0 M, pH de 10, o foi previamente adicionado aos tubos. Frações tendo alta absorvância a 280 nm foram empoçadas e concentradas usando um cartucho Centriprep YM-3 (Millipore Corporation, Bedford, MA, Parte No. 4203). A solução de proteína purificada foi armazenada a -70° C.

30 **Cromatografia por exclusão de tamanho:** cromatografia foi exclusão de tamanho foi realizada sobre um módulo de separação Waters Alliance 2695 equipado com um detector com conjunto de fotodiodo Waters

2996 (Milford, MA) e um coletor de frações Foxy 200 controlado por um software Millennium³² versão 3.20 ou Empower. Colunas TOSOH BIOSCIENCE aleatória (Montgomery, PA) TSK G3000 SW (21,5 mm x 300 mm) e TSK G3000 SWxL aleatória (7,8 mm x 300 mm) foram usadas para SEC preparativa a analítica, respectivamente. As proteínas eluídas foram monitoradas através de absorvância de UV a 280 nm.

Isolamento preparativo de dímero, tetrâmero e multímero foi obtido através de SEC do material de pico de clarificação por HIC em Proteína A purificada. Trinta amostras (~10 mg cada) de eluato de Proteína A foram injetados sobre uma coluna de SEC preparativa aleatória usando uma fase móvel de tampão de fosfato de sódio monobásico a 100 mM, pH de 7,0 contendo cloreto de sódio a 0,9% em uma taxa de fluxo de 1 mL/min. Frações foram coletadas a cada minuto de 90-160 minutos para cada uma das trinta injeções. O tempo de operação para uma única injeção foi de 180 minutos.

Cada fração foi examinada através de HPLC por exclusão de tamanho analítica em coluna aleatória. Frações 13-15 (contendo multímero), frações 22 e 23 (contendo tetrâmero) e frações 43-49 (contendo dímero) foram empocadas. Frações purificadas multímero, tetrâmero e dímero foram examinadas sobre duas colunas de SEC analíticas com detecção por dispersão de luz dinâmica (DSL).

Análise de ligação bioespecífica de componente de CTLA4-Ig do pico de clarificação por HIC e componentes purificados a B7-1 Ig imobilizada: A ligação bioespecífica de CTLA4-Ig a B7-1Ig imobilizada (sobre um chip CM5) foi medida usando um biosensor BIAcore C SPR-baseado (BIAcore, AB, Piscataway NJ). Material de CTLA4-Ig foi usado para gerar a Curva Padrão. B7-1Ig foi imobilizado em uma densidade de 5000 a 10.000 unidades de ressonância (RU's) sobre um chip sensor CM5 ativado. Padrões de referência de CTLA4-Ig, controles de qualidade e amostras foram injetados em uma taxa de fluxo de 20 µL/min. sobre a superfície do chip sensor B7-1Ig para gerar sensorgramas. A taxa de ligação inicial (RU/s) de CTLA4-Ig sobre B7-1Ig imobilizada foi medida sob condições de difusão limitada sobre uma superfície de B7-1Ig de alta densidade e isso se correlaciona di-

retamente com a concentração ativa de CTLA4-Ig nas amostras. Amostras de padrão, controle de qualidade e concentrações de amostra desconhecidas foram interpoladas a partir da Curva Padrão gerada através de plotagem das RU's versus concentrações de CTLA4-Ig na faixa nominal de 125-8000 ng/mL. Os resultados finais foram expressos como ligação percentuais (Concentração Média Desconhecida / amostra / 2000) x 100.

Determinação de massa molar e raio hidrodinâmico: A separação por SEC foi realizada com uma coluna TSK3000 SWXL e uma coluna de proteção correspondente. A fase móvel consistia de HEPES a 25 mM, NaCl a 850 mM, pH de 7,0, usando condições isocráticas para eluição a 0,8 mL/min. Análises por HPLC foram realizadas em temperatura ambiente e as amostras mantidas a 4°C durante análise. A determinação de massa molar incorporou o Wyatt Dawn EOS utilizando 15 ângulos de dispersão distintos para medir a variação angular dispersão de luz para cada espécie. Um formalismo de plotagem Zimm foi usado para determinação de massa molar, onde a média de seções para cada espécie foi calculada para a massa molar. O valor de incremento de índice refrativo específico (dn/dc) usado para calcular a massa molar absoluta foi de 0,189 obtido usando a) e um Interferômetro Optilab DSP (RI. Determinação de raio hidrodinâmico (R_h) foi realizada in-Line com um detector Photon Correlator QELS posicionado em um ângulo de aproximadamente 90° para a célula de fluxo. A constante de difusão translacional é medida a partir desse sinal e o R_h é calculado usando a relação de Einstein-Stokes. Análise de dados foi realizada usando o software Astra versão 4.90 da Wyatt Technology.

Descobriu-se que os valores de peso molecular e raio hidrodinâmico para espécies diméricas e tetraméricas eram de 86 - 91 kDa e 172 - 199 kDa, respectivamente. Foi observado que as amostra de pico de clarificação continham espécies de HMW adicionais, correspondendo a hexâmero e decâmero através do peso molecular. A faixa dos raios hidrodinâmicos para as espécies diméricas é de 3,8 - 4,7 nm. As faixas dos raios hidrodinâmicos das espécies tetraméricas heterogêneas foram de 5,7 nm a 6,2 - 6,3 nm.

Ligação de dímero e tetrâmero de CTLA4-Ig a B7-1Ig usando ressonância de plasmônio em superfície:

5 Análises de concentração: Análises de concentração das várias espécies de CTLA4-Ig a B7-1Ig foram realizadas sobre um instrumento Biacore 3000 (Biacore, Piscataway, NJ) de acordo com Método 7441-4² com modificações mínimas. Modificações incluem o seguinte: Biacore 3000 foi usado ao invés do Biacore C. A taxa de fluxo foi de 10 μ L/min ao invés de 20 μ L/min. A amostra foi injetada durante 60 segundos em oposição a 15 segundos. A superfície do chip sensor foi re-gerada a 30 μ L/min através de 10 três pulsos curtos de 30 segundos (15 μ L) de citrato de sódio a 10 mM, pH de 4,0, contendo NaCl a 100 mM (tampão de regeneração), seguido por um pulso de 30 segundos de água.

15 Um chip sensor CM5 foi imobilizado com B7-1Ig em uma concentração de 20 μ g/mL em tampão de acetato, pH de 5,0, objetivando uma densidade alvo de 6000-12000 unidades de ressonância (RU). Padrões foram preparados através de diluição serial de material de CTLA4-Ig para concentrações de 62,5-8000 ng/mL (0,675-86,3 nM) e dímero para concentrações de 125-16000 ng/mL (0,675-86,3 nM) em tampão de HBS-EP. Amostras de teste, consistindo de monômero ou dímero, foram diluídas para uma 20 concentração alvo de ~2000 ng/mL e analisadas sobre o Biacore. Concentrações foram determinadas através do software BIAevaluation (versão 4.0.1) usando Curvas Padrões de material de CTLA4-Ig (> 98% de monômero) ou dímero purificado. A potência de ligação é calculada como a concentração percentual determinada sobre o Biacore dividido pela concentração determinada a A280 nm. 25

A taxa de ligação da molécula à superfície fornecida é uma função da concentração, o que permite a determinação de concentrações desconhecidas. Dímero de CTLA4-Ig exibe uma maior taxa de ligação como uma função da concentração (ng/mL) quando comparado com tetrâmero de 30 CTLA4-Ig.

As potências de ligação de dímero e tetrâmero de CTLA4-Ig são resumidas na Tabela 7. Baseado em ng/mL, a potência de ligação de uma

amostra de dímero é calculada a partir da Curva Padrão de dímero e descobriu-se que era de 99,5%; enquanto que uma concentração equivalente de uma amostra de tetrâmero é 47,2%. Inversamente, a potência de ligação da amostra de dímero é calculada a partir de uma Curva Padrão de tetrâmero e descobriu-se que era de 266%; enquanto uma concentração equivalente de uma amostra de tetrâmero é de 103%. Contudo, quando dímero e tetrâmero são expressos como concentrações molares (nM), as potências de ligação de ambas as espécies são comparáveis. A potência de ligação de amostras de dímero e tetrâmero calculada a partir de uma Curva Padrão de dímero são de 99,4% e 94,3%, respectivamente. Sobre uma Curva Padrão de tetrâmero, ela é de 133% e 103%, respectivamente. Curvas Padrões de dímero e tetrâmero são comparáveis baseado nas concentrações molares.

Tabela 9: Potência de ligação de dímero e tetrâmero de CTLA4-Ig

Amostra	Curva Padrão de dímero		Curva Padrão de tetrâmero	
	ng/mL	nM	ng/mL	nM
Dímero	99,5%	99,4%	266%	133%
Tetrâmero	47,2%	94,3%	103%	103%

Valência de ligação: Dímero de CTLA4-Ig (25-1600 nM) ou tetrâmero (25-400 nM) foi pré-misturado em várias proporções molares com B7-1Ig durante três minutos antes de 30 μ L da mistura serem injetados em uma taxa de fluxo de 10 μ L/min sobre um chip B7-1Ig imobilizado com uma densidade de 9392 RU. O chip foi re-gerado após cada injeção através de três pulsos de 30 segundos de tampão de regeneração, seguido por um pulso de 30 segundo de água. As RU's obtidas ao final de cada injeção foram comparadas.

Teoricamente, a valência de ligação da molécula de dímero é de dois; cada cadeia simples consiste de um sítio de ligação. A molécula tetramérica consiste de duas moléculas de dímero e, assim, tem uma valência de ligação de quatro. Para determinar a valência de ligação aparente de dímero e tetrâmero, um ensaio competitivo foi projetado e conduzido sobre o Biacore 3000. No experimento, analitos foram pré-misturados com B7-1Ig em vá-

rias proporções molares durante três minutos antes da mistura ser injetada sobre um chip B7-1lg (9392 RU) em uma taxa de fluxo de 10 μ L/min durante um minuto. A Tabela 10 mostra o percentual de dímero ou tetrâmero que foi competitivamente inibido com quantidades molares crescentes de B7-1lg.

- 5 Em uma proporção molar de 1,25 (B7-1lg) para 1 (dímero ou tetrâmero), uma diferença significativa foi observada na inibição competitiva com monômero a 96,1% e dímero a 84,9%. Contudo, dímero e tetrâmero exibem curvas de inibição similares; isso sugere que as valências são aproximadamente iguais. Além disso, dímero e tetrâmero também mostraram perfis de inibição similares usando chips de menor densidade.
- 10

Tabela 10: Inibição de Dímero e Tetrâmero com B7-1lg.

Proporção molar de B7-1lg	Dímero (inibição %)			Tetrâmero (inibição %)		
	N	média	S.D.	N	média	S.D.
0,02 a 1	1	1,5	n/a	1	3,4	n/a
0,04 a 1	2	1,2	0,2	2	5,1	0,3
0,08 a 1	3	2,9	1,1	3	7,4	0,8
0,16 a 1	4	5,5	0,7	4	12,6	0,9
0,32 a 1	5	14,7	3,3	5	20,9	2,2
0,64 a 1	5	38,1	6,1	4	40,8	3,5
1,25 a 1	5	96,1	2,6	3	84,9	4,6
2,5 a 1	4	99,7	0,1	2	97,5	0,5
5,0 a 1	3	99,9	0,1	1	99,4	n/a
10,0 a 1	2	100,0	0,0	n/a	n/a	n/a
20,0 a 1	1	100,0	n/a	n/a	n/a	n/a

- 15 **Saturação de Chip de B7-1lg: Dímero ou tetrâmero de CTLA4-Ig** (200, 1000 ou 8000 ng/mL) foi inicialmente injetado a 10 μ L/min durante um minuto sobre um chip B7-1lg de alta densidade (6738 RU) seguido por uma série de sete injeções de 1 minuto com monômero ou dímero (200, 1000 ou 8000 ng/mL). O chip foi re-gerado após cada condição através de quatro injeções de 25 μ L de tampão de regeneração, seguido por uma injeção de 25 μ L de água. As RU's obtidas ao final de cada injeção foram comparadas.
- 20

Dímero ou tetrâmero foi repetidamente injetado sobre uma superfície B7-1Ig pré-revestida com dímero ou tetrâmero sem regeneração de superfície. Ligação inicial com tetrâmero não impede subseqüentes injeções de dímero de se ligar, contudo, injeções adicionais de tetrâmero resultam em uma taxa de ligação significativamente diminuída quando comparado com injeção dímero. Ligação inicial com dímero seguido por subseqüentes injeções de dímero resulta em uma ligação aumentada tendendo à saturação. Subseqüente injeção de tetrâmero ao chip pré-revestido com dímero mostra uma diminuição gradual na ligação, indicando uma dissociação de moléculas do chip e uma falta de penetração de tetrâmero na matriz. Resultados similares são observados com injeção inicial de 200 ng/mL ou 8000 ng/mL de moléculas de CTLA4-Ig.

Tetrâmero de CTLA4-Ig tem maior avidéz ao receptor de B7-1Ig: Espécies de CTLA4-Ig, incluindo as porções descartadas de colunas de purificação, tal como os picos de clarificação de colunas de HIC e QFF foram purificados e sua cinética de ligação foi analisada sobre o Biacore.

Espécies de CTLA4-Ig do pico de clarificação por HIC: A coluna de HIC é usada no processo com CTLA4-Ig para remover espécies de elevado peso molecular, tal como DNA. Espécies de CTLA4-Ig do pico de clarificação da coluna de HIC podem ser usadas para subseqüente purificação e análise cinética. O pico de clarificação por HIC foi passado através de uma coluna de Proteína A para capturar todas as espécies CTLA4-Ig e remover outras impurezas que possam estar presentes. O eluato da coluna de proteína A, o qual consistia de uma mistura de todas as espécies de CTLA4-Ig (isto é, dímero, tetrâmero, hexâmero multímero), mostrou taxas de k_{on} e k_{off} aparentes as quais eram comparáveis com o padrão de dímero de CTLA4-Ig. Separação do eluato de Proteína A através de 2 coluna de SEC resultou em três espécies de CTLA4-Ig: dímero, tetrâmero e hexâmero /multímero, com taxas de k_{on} e k_{off} conforme resumido na Tabela 11. O teor de ácido siálico do dímero purificado do pico de clarificação por HIC era baixo comparado com dímero de CTLA4-Ig.

Na Tabela 11, concentrações de amostra de 75-200 nM foram

testadas sobre o chip B7-1Ig (694 RU). Espécies de CTLA4-Ig purificadas do pico de clarificação por HIC mostraram menor ligação comparado com a referência de CTLA4-Ig. Tetrâmero, o qual foi desagregado, proporcionou taxas de k_{on} e k_{off} comparáveis com a referência de CTLA4-Ig.

5 **Tabela 11: Análise cinética de espécies de CTLA4-Ig a partir do pico de clarificação por HIC**

Espécies	$k_{on} \times 10^5$ (1/Ms)	$k_{off} \times 10^3$ (1/s)	$K_A \times 10^7$ (1/M)	K_D (nM)
Padrão de dímero de CLTA4-Ig	4,03	9,65	4,18	23,9
Eluato de Proteína A	3,77	9,73	3,87	25,8
Dímero	1,52	5,88	2,59	38,7
Tetrâmero	1,65	8,07	2,04	48,9
Hexâmero	1,54	12,3	1,25	79,9
Tetrâmero dimerizado	3,12	9,88	3,16	31,7

Análise estatística dos dados foi realizada usando o T-teste de Student baseado em 7 observações do padrão de dímero de CTLA4-Ig e 14 observações de dímero e tetrâmero purificados. Não houve diferença na comparação das taxas de k_{on} do padrão de dímero de CTLA4-Ig com dímero ou tetrâmero purificado. Contudo, a taxa de k_{off} e a K_D foram estatisticamente significativa quando a referência foi comparado com tetrâmero purificado (Tabela 12). Comparando o tetrâmero purificado com dímero purificado, as taxas de k_{on} e k_{off} , bem como a K_D foram estatisticamente diferente. Deverá ser destacado que, embora os dados tenham sido agrupados em dímero e tetrâmero, classificações individuais de amostras (isto é, frontal, lateral, etc.) pode ter características ligeiramente diferentes que podem afetar sua cinética de ligação. Para o dímero, a média das taxas de k_{on} e k_{off} era de $3,3 \pm 1,0 \times 10^5 M^{-1} s^{-1}$ e $8,8 \pm 3,5 \times 10^3 s^{-1}$, respectivamente. As taxas de k_{on} e k_{off} do tetrâmero foram de $2,6 \pm 0,8 \times 10^5 M^{-1} s^{-1}$ e $3,1 \pm 1,4 \times 10^3 s^{-1}$, respectivamente.

Na Tabela 12, Dímero (n = 14) e tetrâmero (n = 14) e padrão de dímero de CTLA4-Ig (n = 7) foram analisados.

Tabela 12: Análise estatística de espécies de CTLA4-Ig

T-teste de Student	p-valores		
	k_{on}	k_{off}	K_D
Padrão de dímero vs. Dímero	0,9118	0,8678	0,7893
Padrão de dímero vs. Tetrâmero	0,1044	0,0000002	0,0002
Dímero vs. Tetrâmero	0,0372	0,000006	0,0004

Espécies de CTLA4-Ig do pico de clarificação de QFF: A coluna de QFF é a última coluna de purificação usada para limpar impurezas residuais do produto. Espécies de CTLA4-Ig foram isoladas do pico de clarificação da coluna de QFF usando o método com 2 colunas SEC e analisadas sobre o Biacore 3000. Os dados mostraram que a cinética de ligação dessa amostra de "pico de clarificação de QFF" foi similar ao padrão de dímero CTLA4-Ig. Além disso, dímero e tetrâmero purificados do pico de clarificação de QFF proporcionaram cinética de ligação similar comparado com aqueles purificados da composição. Além disso, o teor de ácido siálico das frações de monômero purificadas era maior do que aquele do padrão de dímero de CTLA4-Ig.

Tratamento com guanidina (dimerização do tetrâmero): O tetrâmero pode ser convertido ao dímero através de tratamento com guanidina, seguido por diálise em tampão de fosfato e confirmou que existia como um dímero através de seg. analítico. Análise cinética do tetrâmero "dimerizado" do pico de clarificação de HIC mostrou que suas taxas de k_{on} e k_{off} eram similares àquelas do dímero de CTLA4-Ig.

Exemplo 7: Análise intacta através de ionização por eletropulverização (ESI)-MS

CTLA4-Ig foi diluída com TRIS a 100 mM, NaCl a 25 mM, pH de 8 para uma concentração final de 0,7 mg/mL. PNGase F (New England Biolabs) foi diluída 30 vezes com TRIS a 100 mM, NaCl a 25 mM, pH de 8 para uma concentração final de 17 unidades/ μ L. Volumes iguais (60 μ L cada) de amostra diluída e solução de glicosidase diluída foram misturados e incubados a 37°C durante 4 horas.

A CTLA4-Ig desglicosilada resultante (2 μ L) foi carregada sobre

uma coluna com cartucho de extração em fase reversa Waters Oasis® (2,1 x 20 mm). A coluna carregada foi lavada com 5% de solvente B (solvente A: ácido fórmico a 1% em água, solvente B: ácido fórmico a 1% em acetonitrilo) em uma taxa de fluxo de 0,2 mL/minuto durante cinco minutos para dessalinizar, com o eluente desviado para descarte. Ao final de 5 minutos, um gradiente rápido (5% de solvente B a 95% de solvente B em 10 minutos) começou a eluição de CTLA4-Ig da coluna; aqui, o eluente foi dirigido para o espectrômetro de massa (Waters Micromass Q-Tof micro™) a 45 μ L/min após divisão de fluxo (sistema de cromatografia usado foi um Waters Alliance 2695 equipado com um detector Waters 2996).

A tensão de capilar para o Q-Tof micro™ foi ajustada a 3kV e a tensão de cone de amostra a 40 V. A média das explorações (cada 0,9 segundo) foi calculada em uma exploração; o tempo inter-exploração foi de 0,1 segundo. O Analisador Q-Tof explora de m/z 800 a 2500. Espectros correspondendo à porção maior do que metade da altura de pico máxima (no cromatograma por TIC) foram combinados usando o software Waters MassLynx™. Os espectros combinados foram submetidos a uma deconvolução Waters MaxEnt1. A resolução foi ajustada a 1 Da/Canal e o modelo de dano Gaussiano uniforme foi selecionado com largura no ajuste de metade da altura entre 0,5-1 Da. Proporções de intensidade mínima para o pico à esquerda e o pico à direita foram ambas ajustadas a 50%.

Exemplo 8: Ionização por desabsorção a laser matriz-assistida - Time of Flight (MALDI-TOF)

Os espectros de MALDI-MS foram adquiridos sobre um OmniFlex™ (Bruker Daltonics, MA) usando um laser de nitrogênio (337 nm). Amostras de proteínas foram usadas sem dessalinização ou dessalinizadas usando extração em fase sólida na forma de ponteiros de pipeta C4 ZipTip® (Millipore, Bedford MA). As ponteiros de pipeta foram umedecidas com acetonitrilo-água (1: 1 v/v) e equilibradas com ácido trifluoroacético a 0,1% (TFA) antes de uso. As ponteiros de pipeta foram, então, carregadas através de extração e expelindo 10 μ L de amostra da pipeta três vezes. A amostra carregada foi lavada três vezes com 10 μ L de TFA a 0,1%. Amostras de pro-

teína dessalinizadas foram eluídas da pipeta com 10 μ L de acetonitrilo para água (1: 1 v/v). As amostras foram colocadas através de mistura de 1 μ L de amostra (dessalinizada ou contendo tampão) com 1 μ L de solução de matriz e colocando 1 μ L da mistura sobre o alvo de aço inoxidável. A solução de matriz era uma solução saturada de ácido sinápico água para acetonitrilo a 1:1 (v/v) contendo TFA a 0,1%. A mistura foi colocada sobre a lâmina de amostra para MALDI e deixada secar ao ar antes de ser colocada no espectrômetro de massa. Todas as amostra de proteínas foram analisadas no modo de íons linear positivo através de extração retardada usando uma tensão de aceleração de 20 kV e um tempo de retardo de 200 nano-segundos. Um total de 400 espectros *single-shot* foi acumulado de cada amostra. Calibração externa foi obtida usando uma mistura de proteínas padrões contendo tripsinogênio (23982 m/z), Proteína A (44613 m/z) e albumina bovina (66431 m/z).

15 MALDI -TOF MS Análise de Peptídeos por MALDI-TOF/MS

A mistura de peptídeo foi separada através de cromatografia de fase reversa e frações dos picos cromatográficos foram coletadas e evaporadas até secagem. A amostra foi reconstituída em 50 μ L de tampão de fosfato a 25 mM, pH de 7,5. DTT foi adicionado para uma concentração final de 5 mM e as frações foram incubadas a 50 °C durante 20 minutos. Após redução, IAM foi adicionada para uma concentração final de 10 mM e incubada no escuro a 50 °C durante mais 20 minutos.

Os espectros de MALDI-MS foram adquiridos sobre um Omni-Flex (Bruker Daltonics, MA) usando um laser de nitrogênio (337 nm). As amostras foram preparadas através de mistura de 1 μ L de amostra com 1 μ L de solução de matriz. A solução de matriz era uma solução saturada de ácido a-ciano-4-hidróxicinâmico em água: acetonitrilo a 1:1 com TFA a 0,1%. A mistura foi colocada sobre a cavidade da lâmina para amostra de MALDI e deixada secar ao ar antes de ser colocada no espectrômetro de massa. Todos os peptídeos foram analisados no modo de íons positivo refletivo através de extração retardada usando uma tensão de aceleração de 20 kV e um tempo de retardo de 200 nano-segundos. Um total de 100 espectros *single-*

shot foi acumulado de cada amostra. Calibração externa foi obtida usando uma mistura de peptídeos padrões contendo angiotensina II (1046,54 m/z), angiotensina I (1296,68 m/z), substância P (1347,74 m/z), bombesina (1619,82 m/z), ACTH clip 1-17 (2093,09 m/z), ACTH clip 18-39 (2465,20 m/z) e somatostatina (3147,47 m/z).

Exemplo 9: Análise dos efeitos de meios e constituintes de meio sobre espécies de CTLA4-Ig com cadeia simples e multiméricas

Dímero de CTLA4-Ig, uma sub-fração com baixo teor de ácido siálico, uma sub-fração com alto teor de ácido siálico, espécies de monômero frontal e monômero de CTLA4-Ig são preparadas e purificadas. Essas amostras são usadas em uma série de experimentos de modelamento projetados para determinar os efeitos dos meios e constituintes de meio sobre a formação de espécies com cadeia simples e espécies de elevado peso molecular durante tempos entre zero a pelo menos 60 horas. Os efeitos do tampão de formulação, iodoacetamida, fosfato de sódio, cloreto de amônio, meio basal, caldo de fermentação, meio 177e, meio com solução I ácida concentrada, meio com solução II ácida concentrada, insulina, EDTA, cisteína, ácido lipóico, glutatona, metionina e isolados de levedo sozinhos e em combinações são testados.

Exemplo 10: Análise de moléculas de CTLA4-Ig através do tamanho

Um método de cromatografia por exclusão de tamanho (SEG) o qual usa condições de desnaturação pode ser empregado para a quantificação de espécies de proteína de diferentes tamanhos. Em uma modalidade, o método de SEC aleatória usando condições de desnaturação pode ser empregado para a quantificação de espécies de CTLA4-Ig com cadeia simples. CTLA4-Ig com cadeia simples podem ser uma espécie carecendo da ligação em ponte de dissulfeto inter-cadeia. Espécies de CTLA4-Ig com cadeia simples isoladas durante o processo de purificação são referidas como CTLA4-Ig de cadeia simples nativa. A cadeia simples purificada produzida através de redução e alquilação de dímero de CTLA4-Ig é referida como cadeia simples induzida. CTLA4-Ig de cadeia simples nativa e induzida têm as mesmas características.

Materiais:

- Fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4), grau ACS
 Solução de hidróxido de potássio (KOH) a 45% peso/peso, grau ACS
- 5 ACS
 Cloreto de sódio (NaCl), grau ACS
 Pipeteador simples ajustável calibrado, 100 L
- Rainina, (Catálogo No. P-100)
 Água (H_2O), grau para HPLC
 Frascos criogênicos de 2,0 mL Nalgene, (Catálogo No. 5000-10 0020)
- Ácido clorídrico concentrado (HCl) Fisher (Catálogo No. A144-212)
 Solução de hidróxido de sódio a 10N, (NaOH) J.T.Baker, (Catálogo No. 5674-02)
- 15 1000 mL de Unidade de filtro de 0,22 mm Corning, (Catálogo No.430517)
 Tubos de ensaio de polipropileno de 15 mL Falcon, (Catálogo No. 352097)
- 20 Azida de sódio (NaN_3), grau ACS
 Monidrato de fosfato de sódio, monobásico ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)
 Pelotas de hidróxido de potássio (KOH)

Instrumentação e Condições

- Módulo de separação HPLC System Waters 2695
 Coluna Toso Haas 5 □ TSK 3000 SWXL, D.I. de 300 mm x 7,8
 25 mm (Parte No. 08541)
 Coluna de proteção Toso Haas 5 □ TSK 3000 SWXL, D.I. 40 mm x 6,0 mm I.D. (Parte No. 08543)
- Detector Waters 2487
 Detector com comprimento de onda duplo
 30 Comprimento de onda 280 nm
 Taxa de fluxo 1 mL/min
 Sistema de integração Empower

Volume de injeção 20 μ L

Conc. de ensaio Alvo. 10 mg/mL

Fase móvel de KH_2PO_4 a 0,2M, NaCl a 0,9%, pH de 6,8 com

KOH

5

Tempo de operação do ensaio de 20 min

Coluna em temperatura ambiente

Temperatura da amostra 4°C

10 Tempo de retenção de monômero 8,7 min \pm 1,0 min, espécies de HMW a 7,5 min \pm 1,0 min. Se presente, espécies de MW eluirão após o pico monomérico.

Reagentes

Hidróxido de potássio a 4N (KOH a 4N) (100 mL)

Usar um dos seguintes preparados conforme descrito:

15 Adicionar 40 mL de água com grau para HPLC e 11,6 mL de solução a 45% peso/peso de KOH a um frasco volumétrico de 100 mL. Levar o volume para 100 mL com água com grau para HPLC.

20 Em um frasco volumétrico de 100 mL, adicionar 80 mL de água com grau para HPLC, pesar 22,4 gramas de pelotas de KOH e agitar magneticamente até completamente dissolvida. Compor o volume de 100 mL com água com grau para HPLC.

Transferir a solução para uma garrafa de reagente de vidro de 250 mL. Misturar bem através de inversão. Armazenar em temperatura ambiente durante até 1 ano.

Fase móvel (KH_2PO_4 a 0,2 M, NaCl a 0,9%, pH 6,8)

25 Pesar 27,2 gramas de KH_2PO_4 e 9,0 gramas de NaCl em um béquer de 1000 mL. Dissolver os sólidos em 800 mL de água com grau para HPLC usando mistura contínua com uma barra de agitação.

30 Usando um medidor de pH, ajustar o pH da solução para 6,8 usando solução de KOH a 4N. Se o pH excede 6,8, ajustar com HCl concentrado.

Levar o volume final para 1 litro usando um cilindro graduado de 1000 mL. Filtrar a solução através de uma unidade de filtro de 0,22 μ m.

Transferir para uma garrafa de reagente de vidro de 1000 mL e submeter a ultra-som enquanto desfasseifica a vácuo durante 5 +/- 1 minuto. Desgasseificar antes de cada uso.

Armazenar em temperatura ambiente durante até 1 mês.

5 Hidróxido de sódio a 2N (NaOH a 2N)

Transferir 20 mL de NaOH a 10N para um cilindro de vidro graduado de 100 mL.

Levar o volume para 100 mL com água para HPLC.

10 Transferir a solução para uma garrafa de reagente de vidro de 250 mL. Misturar bem através de inversão. Armazenar em temperatura ambiente durante até 1 ano.

15 Pesar 3,45 gramas de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ e 2,92 gramas de NaCl e dissolver com mistura com uma barra de agitação em 900 mL de água com grau para HPLC. Usando um medidor de pH, ajustar o pH da solução para 7,4 com NaOH a 2N. Se o pH excede a 7,4, ajustar com HCl concentrado.

Levar o volume final para 1 litro usando um cilindro graduado de 1000 mL. Filtrar a solução através de uma unidade de filtro de 0,22 μm .

Armazenar a 2 °C - 8 °C durante até 6 meses.

20 **Tampão de armazenamento de coluna (NaN₃ a 0,05% peso/v em Água)**

Pesar 50 \pm 5 mg de azida de sódio e adicionar a mesma a um béquer de 1000 mL com uma barra de agitação magnética.

Adicionar 500 mL de água com grau para HPLC ao béquer e agitar até completamente dissolvida.

25 Levar o volume para 1 L com água. Filtrar a solução através de uma unidade com filtro de 0,22 μm e entornar em uma garrafa de reagente de HPLC de 1000 mL.

Armazenar em temperatura ambiente durante até 6 meses.

30 **Preparo de Espécies de elevado peso molecular e Padrão de Adequabilidade de Sistema**

Isso proporcionará uma diluição a três de Material de Referência de CTLA4-Ig aquecido a não aquecido e uma quantidade de espécies de

elevado peso molecular com uma área percentual de 15% - 30%. Em um tubo de ensaio Falcon de 15 mL, preparar aproximadamente 3 mL de Material de Referência a $10,0 \pm 1,0$ mg/mL usando tampão de diluição de CTLA4-Ig. A concentração inicial de CTLA4-Ig é do COA. Fazer a diluição a $10,0 \pm 1,0$ mg/mL a partir desse valor. Transferir 1,0 mL do Material de Referência diluído, feito em um frasco criogênico, para um criofrasco de 2,0 mL usando uma pipeta de 1 mL e aquecer em um banho de água a 67 ± 2 °C durante 45 ± 2 minutos. Transferir o Material de Referência aquecido feito antes para o tubo de ensaio de 15 mL usando uma pipeta de 1 mL. Gentilmente pipetear para cima e para baixo um volume de 1 mL dos conteúdos do tubo de ensaio para um total de 10 vezes. Esse é o Padrão de Adequabilidade de Sistema.

Condições de armazenamento: Preparar alíquotas de 150 µL do Padrão de Adequabilidade de Sistema em criofrascos de 2,0 mL para armazenamento a -80 ± 5 °C durante até 1 ano. Obter a concentração inicial de Material de Referência e fazer a diluição a $10,0 \pm 1,0$ mg/mL a partir desse valor. Usar um mínimo de 100 µL de Material de Referência e uma quantidade apropriada do tampão de diluição para obter a concentração final de $10,0 \pm 1,0$ mg/mL. Referi-se à seguinte equação para diluições:

20

Tampão de diluição = (volume de alíquota x concentração inicial) - volume de alíquota
a adicionar -

Concentração alvo

Para Substância de Fármaco de CTLA4-Ig, fazer a diluição a $10,0 \pm 1,0$ mg/mL a partir da concentração de proteína usando um mínimo de 100 µL. Transformar em alíquotas de amostra e uma quantidade apropriada do tampão de diluição para obter uma concentração final de $10,0 \pm 1,0$ mg/mL. Refira-se à seguinte equação para diluições:

$(0,1 \text{ mL} \times 50 \text{ mg/mL}) - 0,1 \text{ mL} = 0,4 \text{ mL}$ de tampão de diluição
10 mg/mL

30

Uma vez diluída para $10,0 \pm 1,0$ mg/mL, as amostras podem ser armazenadas a 2 ± 8 °C durante até 24 horas. Para Produto de fármaco

de CTLA4-Ig, fazer a diluição a 10,0 \pm 1,0 mg/mL a partir da concentração de proteína usando um mínimo de 200 μ L. Transformar em alíquotas de amostra e uma quantidade apropriada do tampão de diluição para obter a concentração final de 10,0 \pm 1,0 mg/mL. Refira-se à seguinte equação para diluições:

5

$$\frac{(0,2 \text{ mL} \times 25 \text{ mg/mL})}{10 \text{ mg/mL}} - 0,2 \text{ mL} = 0,3 \text{ mL de tampão de diluição}$$

- Colocar a fase móvel em um reservatório de solvente e água com grau para HPLC em outro. Submeter a ultra-som e desgaseificar a vácuo antes de operação. Ligar o detector e permitir 15 minutos para aquecer antes da operação. Antes que uma nova coluna ou a atual seja usada para análise, submeter a coluna a fluxo com água com grau para HPLC durante pelo menos 20 minutos, seguido por equilíbrio com tampão de fase móvel durante pelo menos 20 minutos. Usar uma taxa de fluxo de 1,0 mL/min.
- 15 Descongelar a 150 μ L. Transformar em alíquotas de Padrão de Adequabilidade de Sistema, adicionar ao frasco para o amostrador automático e colocar o frasco no amostrador automático. Injetar 20 μ L do padrão sob as condições.

- 20 Determinar o percentual de Espécies de elevado peso molecular que elui a aproximadamente 7,5 minutos de acordo com a seguinte fórmula: (na fórmula abaixo, Monômero, na verdade, se refere a dímero.)

$$\text{área \% de espécies de elevado peso molecular} = \frac{(A)}{(A)+(B)} \times 100$$

onde:

A = área de pico de espécies de elevado peso molecular

B = área de pico de monômero

- 25 A área percentual de Espécies de elevado peso molecular não deverá ser de menos de 15%. Se ela é menor do que 15%, adicionar espécies de elevado peso molecular concentradas extra ao Padrão de Adequabilidade de Sistema acima.

Resolução (R). Determinação e avaliação de tempo de re-

- tenção.** Injetar 20 µL de Padrão de Adequabilidade de Sistema. Calcular a resolução entre as espécies de elevado peso molecular (tempo de retenção de aproximadamente 7,5 minutos) e o pico de monômero (tempo de retenção de aproximadamente 8,7 minutos) usando a seguinte equação: (na fórmula abaixo, "monômero", na verdade, se refere a dímero).
- 5

$$\text{Resolução (R)} = \frac{2 (t_2 - t_1)}{W_2 + W_1}$$

onde:

t_1 = tempo de retenção das espécies de elevado peso molecular

t_2 = tempo de retenção de monômero

W_1 = largura de pico de espécies de elevado peso molecular

10

W_2 = largura de pico de monômero

15

A largura de pico é medida em minutos na base do pico após extrapolação dos lados relativamente retos do pico para a linha de base. O tempo de retenção e largura de pico são medidos nas mesmas unidades. Em uma modalidade, (R) deve ser $\geq 1,2$ e o tempo de retenção para o pico deverá ser $8,7 \pm 1,0$ minutos.

Determinação do número de placas teóricas (N)

A partir do cromatograma de Padrão de Adequabilidade de Sistema, determinar a eficiência da coluna calculando o número de placas teóricas (N) de acordo com a seguinte equação:

$$N = 16 \left(\frac{t}{w} \right)^2$$

20 onde:

t = é o tempo de retenção de monômero (em minutos)

w = é a largura (em minutos) na linha de base do monômero obtido através de extrapolação dos lados do pico para a linha de base

Um total de seis (6) injeções de material de CTLA4-Ig será feito.

25

Transformar em alíquotas de 200 µL de material de Referência a 10 mg/mL em um frasco para amostrador automático e colocar o frasco no amostrador automático e injetar seis vezes. Processar os cromatogramas e

calcular a área de pico de dímero para cada cromatógrafo. Somar as áreas de pico de dímero dos seis cromatógrafos e calcular a média, desvio padrão e RSD % de acordo com as seguintes equações:

$$\frac{X_1 + X_2 + X_3 \dots X_n}{n_x}$$

onde:

- 5 $X_{1,2,3,\dots}$ = um valor específico em um conjunto de dados
 n_x = um conjunto de valores (x)

5.4.4.2 Calcular o desvio padrão como segue:

$$\sqrt{\frac{n \sum x^2 - (\sum x)^2}{n(n-1)}}$$

onde:

- 10 n = número de valores (x) em um conjunto de dados
 x = um valor em um conjunto de dados

5.4.4.3 Calcular o desvio padrão relativo % (RSD) como segue:

$$\text{RSD \%} = \frac{\text{Desvio padrão}}{\text{Média}} \times 100$$

Média

Exemplo de uma seqüência de injeção:

AMOSTRA	INJECAO
Placebo de tampão de diluição	1 Injeção
Adequabilidade de Sistema	1 Injeção
Material de referência	6 Injeções
Amostra #1	2 Injeções
Amostra #2	2 Injeções
Amostra #3	2 Injeções
Material de referência	1 Injeção
Placebo de tampão de diluição	1 Injeção

15 Integração de Picos

Integrar todas as áreas de pico no cromatograma de 5,5 a 11,8 minutos. Ampliar a linha de base do cromatograma para assegurar que a área total de todas as espécies LMW e HMW são incluídas na integração.

Desconsiderar picos na amostra que correspondem aos picos no controle. O pico de volume de inclusão (11,8-13,5 minutos) e picos posteriores não são considerados nesse cálculo. Contudo, se a área no volume de inclusão é 0,1% ou maior do que a área total, ela deverá ser anotada. O pico de dímero elui a $8,7 \pm 1,0$ minutos, o pico de espécies de elevado peso molecular elui a $7,5 \pm 1,0$ minutos e as espécies de baixo peso molecular (por exemplo, monômero, se presentes) eluirão após o pico de dímero. Qualquer outro pico que não as espécies de elevado peso molecular, dímero ou espécies de baixo peso molecular que tem absorvância a 280 nm acima de 0,1% de área da área total de pico deverá ser anotado. Calcular a área percentual como segue:

(A referência ao "monômero de Abatacept" nesse Exemplo se refere a dímero de CTLA4-Ig).

$$7.2.1 \text{ Área \% de espécies de HMW} = \frac{(B)}{(A) + (B) + (C)} \times 100$$

$$7.2.2 \text{ Área \% de espécies de LMW} = \frac{(C)}{(A) + (B) + (C)} \times 100$$

$$\text{Área \% de monômero} = 100 - (\text{área \% de HMW} + \text{área \% de LMW})$$

onde:

A = área de pico de monômero de abatacept

B = área total de todos os picos com tempos de retenção menores do que o monômero de abatacept

C = área total de todos os picos com tempos de retenção maiores do que o pico de monômero de abatacept (excluindo volume de inclusão)

Amostras foram separadas através de cromatografia por exclusão de tamanho usando um Water's Alliance® 2695 (Milford, MA) sobre duas colunas 7,8 x 300 mm TSK Gel G3000SWXL™ (Tosoh Biosep, Montgomery, PA) colocadas em série empregando uma coluna de proteção de 6,0 x 40 mm. 25 microlitros de cada amostra purificada foi injetados e separados sob condições isocráticas usando Na_2HPO_4 0,1M, Na_2SO_4 a 0,1M, pH de 6,8 a 1,0 mL/min. Amostras foram detectadas a 280 nm usando um detector

996 PDA (conjunto de fotodiodo) (Waters, Milford, MA) e analisadas usando um software de cromatografia Millennium 4.0™ (Waters, Milford, MA):

Os cromatogramas sobrepostos de material com cadeia simples nativo e induzido da cromatografia por exclusão de tamanho aleatória analítica desnaturante mostram um tempo de retenção médio (6 réplicas) de 27,96 ± 0,02 e 27,99 ± 0,02, respectivamente. Descobriu-se que a área média de pico para cadeia simples nativa era de 495525,0 ± 9589,6 e, para cadeia simples induzida, era de 463311,8 ± 7997,2 (Tabela 13). Os espectros sobrepostos de MALDI-TOF de material de cadeia simples nativo e induzido têm picos que são muito amplos, com uma largura na linha de base cerca de 15000 unidades de massa. Isso é esperado em virtude da heterogeneidade da glicosilação em ambas as amostras. O ponto de ápice do pico de cadeia simples em cada espectro de massa foi usado para calcular a massa média. As massas médias para CTLA4-Ig com cadeia simples nativa e induzida são de 45694,426 ± 297,735 e 45333,086 ± 264,778 unidades de massa, respectivamente, baseado na análise de seis réplicas (Tabela 14). Espera-se que a massa da cadeia simples nativa seja maior do que aquela da cadeia simples induzida, porque sobre a cadeia simples nativa há uma cisteína extra (massa do resíduo de 103 Dáltons) sobre Cys¹⁴⁶ de SEQ ID NO: 2, enquanto que a cadeia simples induzida é um resultado de redução seletiva de uma única ligação em ponte de dissulfeto inter-cadeia, seguido por alquilação, que adiciona um grupo acetila (massa de 58 Dáltons).

Esses dados mostram que os materiais nativos e induzidos produzem resultados equivalentes através de cromatografia SEC desnaturante aleatória e análise por MALDI-TOF. Esses resultados demonstram a comparabilidade entre os materiais de CTLA4-Ig com cadeia simples nativos e induzidos.

Tabela 13: Dados de HPLC SEC de cadeia simples nativa e induzida

Réplicas	Induzida		Nativa	
	Tempo de retenção	Área de pico	Tempo de retenção	Área de pico
	(min)	(xV*seg)	(min)	(xV*seg)
1	27,985	470199	27,968	505576
2	27,979	464424	27,941	499800
3	27,977	469509	27,934	505708
4	27,998	469081	27,954	482472
5	28,027	453103	27,991	490434
6	28,016	453555	27,985	489160
Média	27,997	463311,8	27,962	495525,0
Desvio padrão	0,021	7997,2	0,023	9589,6
RSD %	0,074	1,726	0,083	1,935

Tabela 14: Dados de Espectrometria de massa MALDI-TOF de cadeia simples nativa e induzida

Réplicas	Massa de CS induzida	Massa de CS nativa
1	45397,896	45597,475
2	45432,199	45621,300
3	45256,929	45543,839
4	45433,849	45555,893
5	45381,812	45634,620
6	45348,376	45340,712
Média	45375,177	45548,973
Desvio padrão	66,265	108,043
RSD %	0,15	0,24

- A presença de cisteínas dentro de uma cadeia polipeptídica permite a formação de ligações de dissulfeto, as quais podem ser intramoleculares ou intermoleculares, levando à formação de complexos de proteínas diméricas ou multiméricas. A CTLA4-Ig existe como um dímero (em que o dímero é composto de dois monômeros tendo qualquer uma das seguintes seqüências: (i) 26-383 de SEQ ID NO: 2, (ii) 26-382 de SEQ ID NO: 2; (iii) 27-383 de SEQ ID NO: 2, (iv) 26-382 de SEQ ID NO: 2), (v) 25-382 de SEQ ID NO: 2 e (vi) 25-383 de SEQ ID NO: 2) mantidas juntas através de uma ligação de dissulfeto entre C¹⁴⁶ sobre cada cadeia. A redução dessa ligação de dissulfeto pode resultar na formação de duas cadeias de proteína equivalentes mantidas juntas através de forças eletrostáticas não covalentes.

Quando submetida à condições de desnaturação que sobrepujam ou superam as forças eletrostáticas de atração, tal CTLA4-Ig pode dissociar completamente, resultando em duas estruturas de proteína idênticas de aproximadamente 46 kDa. A estrutura resultante é referida como cadeia simples ou monômero. A presença da cadeia simples pode ser monitorada através de cromatografia por exclusão de tamanho em coluna aleatória operando sob condições de desnaturação.

Uma subpopulação de moléculas de CTLA4-Ig contém uma modificação sobre Cys¹⁴⁶: a ligação de dissulfeto presente na maioria da população é trocada para um aminoácido de cisteína livre (referido como cisteinilação). O dímero de CTLA4-Ig é predominantemente uma proteína com um peso molecular de aproximadamente 92.000. Ele é compreendido de duas cadeias polipeptídicas glicosiladas as quais são mantidas juntas através de uma ligação de dissulfeto inter-cadeia em Cys¹⁴⁶ e interações não covalentes (também referida como "dímero" de CTLA4-Ig). A proteína purificada existe como uma população heterogênea e contém modificações, tais como glicosilações e variações nos N- e C-términos.

Uma população distinta de moléculas de CTLA4-Ig existe, a qual carece da ligação de dissulfeto inter-cadeia. Essa população não covalentemente ligada existe dentro do pico de dímero frontal gerado através de cromatografia por exclusão de tamanho. Descobriu-se que o dímero frontal carece da ligação de dissulfeto inter-cadeia. As espécies de CTLA4-Ig as quais carecem da ligação de dissulfeto inter-cadeia são modificadas através de cisteinilação em Cys¹⁴⁶, modificação a qual ocorre sobre >99% das espécies com cadeia simples, baseado em dados por ESI-MS intacta. Cisteinilação em Cys¹⁴⁶ e o enriquecimento de carboidratos O-ligados são as duas principais modificações sobre as espécies de CTLA4-Ig com cadeia simples. O dímero frontal é submetido a uma cromatografia por exclusão de tamanho desnaturante, resultando em isolamento do pico de CTLA4-Ig com cadeia simples. O material monomérico frontal purificado foi comparado com CTLA4-Ig com e sem extração em fase sólida (SPE) e analisado sobre MALDI. O monômero frontal purificado contém duas espécies dominantes: uma

- espécie principal a 47005 u para SPE-tratado ou 46897 u para não-tratado; uma espécie menor a 95070 u para SPE-tratado ou 96172 u para não-tratado. O material de CTLA4-Ig também contém duas espécies dominantes: uma espécie principal a 91518 u para SPE-tratado ou 91143 u para não-tratado; uma espécie menor a 45660 u para SPE-tratado ou 46014 u para não-tratado.

	1 exemplo	2 exemplo
Dímero por homogeneidade de tamanho (HPLC)	≥ 95,5 Área % ≥ 97,0% Área %	≥ 95,5 Área % ≥ 97,0% Área %
Espécies de elevado MW por homogeneidade de tamanho (HPLC)	≤ 3,0 Área %. ≤ 2,0 Área %.	□ 3,0 Área %. ≤ 2,0 Área %.
Espécies de baixo MW por homogeneidade de tamanho (HPLC)	□ 0,5 Área %	≤ 0,5 Área %

- A composição de CTLA4-Ig, em uma modalidade, tem as seguintes características quando de análise por Homogeneidade de Tamanho (HPLC) de dímero, espécies de elevado MW e espécies de baixo MW (monômero, cadeia simples):

- ≥ 97,0% de Dímero
- ≤ 2,0% de espécies de HMW
- ≤ 0,5% de espécies de LMW (por exemplo, monômero, cadeia simples)

- Em outra modalidade, a composição de CTLA4-Ig tem as seguintes quantidades características de cada espécie:

- ≥ 95,5% de dímero
- ≤ 3,0% de espécies de HMW
- ≤ 0,5% de espécies de LMW (por exemplo, monômero, cadeia simples)

Sumário de análise por SE-HPLC de Processo com lotes de CD-CHO1

	Processo com CD-CHO1 n = 109	
	dímero	HMW
Média (%)	99,4	0,6
CV %	0,3%	45,7%
Mínimo (%)	98,4	0,2
Máximo (%)	99,8	1,6
Intervalo de tolerância de 95%	□ 98,7	□ 1,3

- O percentual de monômero oscilava de 98,4 a 99,8%, com um valor médio de 99,4% para Substância de Fármaco fabricada usando o Processo com CD-CHO1. O percentual de espécies de HMW variava de 0,2 a 1,6%. O valor médio foi de 0,6%, com um CV de 45,7%. O intervalo de tolerância de 95% foi $\geq 98,7\%$ para o dímero e $\leq 1,3\%$ para as espécies de HMW. O percentual de espécies de HMW dos lotes variava de um valor mínimo de 0,4% para um valor máximo de 2,1%. O percentual médio de espécies de HMW foi de 0,8%, com um CV % de 40%. Em todos os casos, as espécies ou monômeros de LMW estavam abaixo do limite de detecção (DL = 0,1%).
- 10 O intervalo de tolerância de 95% (proporciona cobertura para 99% da área da população) para CTLA4-Ig fabricada do processo com CD-CHO1 foi $\leq 1,3$ e $\leq 1,8\%$, respectivamente, para as espécies de HMW. Os intervalos de tolerância de 95% para o dímero na Substância de Fármaco do Processo com CD-CHO1 foram de 98,7% e 96,5%, respectivamente.

15

Sumário de dados combinados para CTLA4-Ig

	dímero (n = 143)	HMW (n = 141) ^a
média (%)	99,3	0,6
CV %	0,5	46,9
Mínimo (%)	94,8	0,2
Máximo (%)	99,8	2,1
Intervalo de tolerância de 95%	$\geq 97,3$	$\square 1,8$
CV % (entre-sítio)	0,3%	26,4%
CV % (dentro do-sítio)	0,5%	44,2%
CV % (sítio total)	0,6%	51,4%

- A Tabela acima mostra que o percentual de espécies de HMW oscilava de 0,2 a 2,1%, com uma média de 0,6%. O dímero oscilava de 94,8% a 99,8%, com um valor médio de 99,3% e uma precisão de 0,3%. A variação entre-sítio, dentro do-sítio e variação de sítio total para o dímero estava dentro de 0,3 a 0,5%. A variação entre sítio para a HMW foi de 26,4%. A variação dentro do-sítio e sítio-total para as espécies de HMW foram de 44,2 e 51,4%, respectivamente. O intervalo de tolerância de 95% para o dímero (97,3%) e as espécies de HMW (1,8%) estavam dentro da
- 20

especificação.

EXEMPLO 11: Construção de Vetor

Construção do vetor de expressão pcSD: O vetor de expressão, pcSD, foi construído a partir do vetor pcDNA3 comercialmente disponível (Invitrogen, Carlsbad, CA) conforme mostrado na FIG. 28. O cassete do gene de resistência à neomicina foi removido do plasmídeo pcDNA3 através de digestão com a endonuclease de restrição *Nae* I. A endonuclease de restrição *Nae* I cria extremidades cegas. Os fragmentos de DNA foram separados através de eletroforese em gel de agarose e a parte principal do vetor pcDNA3 de 3,821 kb foi purificada do gel. O fragmento de DNA contendo o gene que codifica redutase de dihidrofolato de camundongo (*dhfr*) e um promotor de SV40 foram isolados do plasmídeo pSV2-dhfr através de digestão do plasmídeo com as endonucleases de restrição *Pvu* II e *Bam*H I. O fragmento de 1,93 kb correspondendo ao cassete do gene *dhfr* foi separado e purificado através de eletroforese em gel de agarose. As extremidades cortadas 3' geradas através de digestão com *Bam*H I foram enchidas usando o fragmento Klenow de DNA polimerase I para gerar extremidades cegas. Esse fragmento isolado foi ligado na parte principal do vetor pcDNA3 de 3,8 kb com extremidade cega para criar o vetor de expressão pcSD. Esse vetor de expressão tem as seguintes características: um promotor de citomegalovírus (CMV), seguido por um sítio de clonagem múltipla, um sinal de polia-denilação de hormônio de crescimento bovino (BGH) e uma seqüência de término de transcrição, uma seqüência de cDNA de *dhfr* de camundongo para seleção e amplificação e um gene de resistência à ampicilina e a origem de replicação pUC para seleção e manutenção em *Escherichia coli*.

Construção do vetor de expressão pcSDhuCTLA4-Ig: Um fragmento de DNA de 1,2 quilobase (kb) contendo uma seqüência que codifica uma proteína de CTLA4-Ig foi isolado do plasmídeo pCDM8-CTLA4-Ig através de digestão com as enzimas de restrição *Hind* III e *Xba* I. O fragmento de 1,2 kb *Hind* III/*Xba* I foi ligado no vetor piLN previamente digerido com as enzimas de restrição *Hind* III e *Xba* I. A estrutura de plasmídeo resultante, designada piLN-huCTLA4-Ig, é mostrada na FIG. 21. O plasmídeo

piLN-huCTLA4-Ig foi usado como a fonte da seqüência de codificação de CTLA4-Ig usada na construção do vetor de expressão final pcSDhuCTLA4-Ig.

O vetor final para expressão do gene de CTLA4-Ig foi construído conforme mostrado na FIG. 29. Um fragmento de DNA de 1,2 kb contendo o gene de CTLA4-Ig foi isolado do plasmídeo piLN-huCTLA4-Ig através de um procedimento de digestão por restrição com duas etapas. O plasmídeo piLN-huCTLA4-Ig foi primeiro digerido com a enzima de restrição *Hind* III. As extremidades cortadas 3-prime resultantes foram enchidas através de tratamento com o fragmento Klenow de DNA polimerase I. O plasmídeo foi, então, digerido com a enzima de restrição *Xba* I para liberar o fragmento de 1,2 kb contendo o gene de CTLA4-Ig. Esse fragmento foi purificado e ligado aos fragmentos *EcoR* V e *Xba* I isolados da digestão por restrição de pcSD. Os sítios de restrição *EcoR* V e *Xba* I estão localizados no sítio de clonagem múltipla do pcSD entre o promotor de CMV e um cassete contendo o sinal de poliadenilação de hormônio de crescimento bovino e seqüência de término de transcrição. Isso colocou o fragmento do gene de CTLA4-Ig sob o controle do promotor de CMV. Esse plasmídeo é designado pcSDhuCTLA4-Ig e compreende SEQ ID NO: 1.

Exemplo 12: Transfecção de vetor de expressão de CTLA4-Ig para obter linhagens de células estáveis

Esse Exemplo e o Exemplo 13 descrevem uma população recentemente transfectada de células da qual clones individuais foram selecionados e expandidos e, assim, os clones expandidos são diferentes das células depositadas na ATCC como No. de Acesso CRL-10762. A linhagem de células CHO anterior trazendo um vetor de expressão contendo DNA que codifica a seqüência de aminoácido correspondendo à CTLA4-Ig (DNA tendo Número de Acesso à ATCC 68629) é descrita na Patente U.S. No. 5.434.131. Resumidamente, um plasmídeo de expressão (por exemplo, pCDM8) contendo cDNA que foi depositado sob No. de Acesso ATCC 68629, foi transfectado através de lipofecção usando procedimentos padrões em células CHO *dhfr* negativas para obter linhagens de células que expres-

sam estavelmente CTLA4-Ig. Seleção de linhagens de células CHO B7 positivas com relação à atividade de ligação a B7 no meio usando imunocoloração resultou em um transfectante estável que expressa CTLA4-Ig. Essa população heterogênea de células transfectadas foi designada a linhagem de células de Ovário, CTLA4-Ig-24, e foi depositada na ATCC sob o Tratado de Budapeste em 31 de Maio de 1991 tendo Número de Acesso à ATCC CRL-10762.

A linhagem de células de Ovário de Hâmsster Chinês, DG44, contém uma deleção do gene que codifica a enzima reductase de dihidrofolato. O plasmídeo de expressão pcSDhuCTLA4-Ig contém uma cópia do gene de reductase de dihidrofolato (*dhfr*). Inserção do plasmídeo pcSDhuCTLA4-Ig no genoma de DG44 resulta em complementação funcional da deleção do *dhfr*. Essa complementação funcional pode ser usada para a seleção de transfectantes na presença de metotrexato (MTX) e amplificação de *dhfr* e genes adjacentes.

A linhagem de células 1D5 que secreta CTLA4-Ig humana foi construída através de transfecção da linhagem de células DG44 com o plasmídeo de expressão pcSDhuCTLA4-Ig, conforme mostrado na FIG. 29. O DNA de plasmídeo foi introduzido em células DG44 através de eletroporação usando procedimentos padrões conhecidos na técnica. Transfectantes foram selecionados usando um meio mínimo essencial (MEM; JRH Biosciences, Inc., Kansas) suplementado com Soro Bovino Fetal a 5% (v/v) submetido à diálise. Sobrenadantes de cultura dos transfectantes foram selecionados com relação à produção de IgG humana usando um método ELISA em sanduíche. Um anticorpo anti-IgG humana de bezerro Fc-específico foi usado como o anticorpo de captura. Anticorpo anti-IgG humana de bezerro conjugado à peroxidase de armorrícia foi usado para detectar a IgG humana. Transfectantes expressando altos níveis do gene de CTLA4-Ig humana foram selecionados para amplificação adicional.

Amplificação de gene dos transfectantes selecionados foi realizada através da adição de MTX ao meio de cultura em uma concentração final de 100 nM. MTX é um análogo de ácido fólico que atua como um inibidor

competitivo de reductase de dihidrofolato. Adição de MTX ao meio permitiu seleção de transfectantes contendo múltiplas cópias do gene *dhfr* e níveis elevados de reductase de dihidrofolato. Transfectantes também contendo múltiplas cópias de do gene de CTLA4-Ig adjacente foram identificados usando o método ELISA específico para IgG humana. Um clone que produz CTLA4-Ig, designado 1D5, foi selecionado para desenvolvimento adicional, em parte descrito no Exemplo 13.

Exemplo 13: Subclonagem de Stably Transfected Células

A linhagem de células 1D5 foi submetida à clonagem em agar macio. Subclones derivados da clonagem em agar macio foram analisados com relação à produção de IgG humana usando o método ELISA. Subclones selecionados foram avaliados quanto à produção de CTLA4-Ig e propriedades de crescimento. O subclone protótipo, designado 1D5-100A1, foi selecionado.

A linhagem de célula 1D5-100A1 foi adaptada a partir de meio DE (JRH Biosciences, Inc., Kansas, o qual contém matérias primas originárias de animal, para um meio quimicamente definido designado CD-CHO (Tabela 15). Meio CD-CHO é um meio isento de componente animal patenteado fabricado pela Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA.

Tabela 15: Composição de Meio Y de Processo

Componente	Concentração
CD-CHO 25x Solúveis em ácido I	40,0 mL/L
CD-CHO 25x Solúveis em ácido II	40,0 mL/L
CD-CHO 25x Sais I	40,0 mL/L
CD-CHO 25x Sais II	40,0 mL/L
L-Glutamina	0,585 g/L
insulina r-humana (10 mg/mL de solução)	0,1 mL/L
Metotrexato (solução a 20 mM)	5 µL/L
Bicarbonato de sódio	2,22 g/L
Água	Conforme requerido
solução de HCl a 1 N	0 - 5 mL/L para ajustar o pH
solução de NaOH a 10 N	0 - 10 mL/L para ajustar o pH

A linhagem de célula 1D5-100A1 foi cultivada e passada em meio DE de acordo com um protocolo padrão de cultura tecidual. As células foram, então, transferidas para um meio composto de 50% de meio DE e 50% de meio CD-CHO. Após várias passagens nesse meio, as células foram

transferidas para T-frascos contendo 100% de meio CD-CHO. As células foram crescidas em 100% de meio CD-CHO durante várias passagens. As células adaptadas foram, então, submetidas à clonagem através de diluição limitativa.

5 Células da linhagem de célula 1D5-100A1 CD-CHO-adaptada foram clonadas através de diluição limitativa usando meio isento de soro. As células 1D5-100A1 foram cultivadas em um alvo de 1 célula/cavidade em lâminas de microtitulação com 96 cavidades contendo meio MCDB suplementado. MCDB é uma formulação de meio quimicamente definida distribuída pela Sigma-Aldrich, St. Louis, MO. O meio MCDB foi suplementado com glutamina a 4 mM, 500 µg/mL de insulina humana recombinante, MTX a 100 nM e meio condicionado a 10%. O meio condicionado era um sobrenadante esterilizado em filtro de uma cultura da linhagem de célula 1D5-100A1 CD-CHO adaptada crescida em meio MCDB.

15 Cavidades contendo uma única colônia foram identificadas e os clones avaliados quanto à produção de CTLA4-Ig usando o método ELISA. Clones selecionados foram expandidos de lâminas de microtitulação com 96 cavidades para lâminas de cultura de células com 6 cavidades. As culturas foram ainda expandidas em T-frascos de 25 cm² e, então, em garrafas giratórias.

20 As culturas na garrafa giratória foram avaliadas quanto à titulação de CTLA4-Ig, teor de ácido siálico em CTLA4-Ig e crescimento. Três clones foram selecionados para avaliação adicional em Bio-reatores e caracterização adicional. Estoque de pesquisa do frasco congelado da linhagem de célula clonal 1D5-100A1,17 armazenado a -80°C foi usado para gerar um banco de célula.

25 **Exemplo 14: Produção de CTLA4-Ig em Bio-reatores via um processo com alimentação em batelada**

30 ***Cultura em escala comercial de Células de mamífero em suspensão Expressando CTLA4-Ig:*** Esse Exemplo descreve a produção de moléculas de CTLA4-Ig compreendendo monômeros de SEQ ID NO: 2, a partir de células CHO *dhfr*-negativas cultivadas em suspensão. Os métodos

descritos nesse Exemplo podem ser adaptados e estendidos para a produção de outras proteínas recombinantes incluindo, mas não limitado a, proteínas secretadas tais como citocinas e outros hormônios, proteínas secretadas que são membros da superfamília Ig ou compreendem uma porção de uma

5 proteína da superfamília Ig e geralmente qualquer proteína expressa em células CHO. Um fluxograma de processo para as etapas de cultura de CTLA4-Ig é mostrado na FIG. 10.

Os frascos de cultura (por exemplo, T-175 e Frascos de Erlenmeyer), garrafas giratórias e sacos para célula foram usados para as etapas de

10 expansão de inóculo do processo de cultura de CTLA4-Ig para propagar serialmente células de um frasco congelado para proporcionar um número suficiente de células viáveis para inocular um bio-reator de 20.000 L.

Um único frasco de células é removido da fase vapor de um congelador de armazenamento de nitrogênio líquido e descongelado em um

15 banho de água a 37°C. Os conteúdos todos do frasco são assepticamente transferidos para um tubo para centrífuga cônico de 15 mL estéril. Meio CD-CHO é adicionado para levar o volume final para 10 mL. A célula suspensão é centrifugada, o sobrenadante descartado e a pelota de célula resuspensa em 10 mL de Meio de cultura de células CD-CHO. As células resuspensas

20 são transferidas para um frasco T-175 contendo 10 mL de Meio CD-CHO. A densidade de células viáveis e a viabilidade percentual da cultura no frasco T-175 são determinadas. Um critério para a viabilidade percentual nessa etapa de $\geq 84\%$ foi estabelecido. Meio CD-CHO é adicionado ao frasco T-175 para obter uma densidade alvo de células viáveis de $1,7-2,6 \times 10^5$ células/mL.

25

O frasco T-175 é incubado a 37°C em uma atmosfera de dióxido de carbono a 6% durante um máximo de quatro dias para obter um número de células final alvo de $\geq 6 \times 10^6$ células viáveis. Após a etapa com frasco T-175, a cultura é expandida usando uma série de fracos para agitador, garra-

30 fas giratórias de 1 L e 2 L, conforme mostrado na FIG. 10. Em cada passagem, as células são cultivadas em uma densidade alvo de $2,0 \times 10^5$ células viáveis/mL, em que as culturas são objetivadas para ter uma viabilidade ce-

lular de cultura final $\geq 80\%$. As culturas são incubadas em Meio CD-CHO a 37°C em uma atmosfera de dióxido de carbono a 6% durante um máximo de quatro dias.

5 Expansão da cultura ocorre em uma série de sacos para célula
(20 L, 100 L e 200 L) de forma a inocular adicionalmente um bio-reator de
1000 L. Material de cultura de célula da etapa de expansão de inóculo em
garrafas giratórios de 2 L é empocado para inocular um saco de célula de 20
L em uma densidade de cultura alvo de $2,0 \times 10^5$ células viáveis/mL. Uma
10 condição para a densidade final de células viáveis na etapa de expansão de
inóculo em garrafa giratória de 2 L de $1,0$ a $2,0 \times 10^6$ células/mL e uma viabi-
lidade celular percentual mínima de $\geq 80\%$ foi estabelecida. Quando de ino-
culação, a cultura em saco de célula de 20 L é incubada em Meio CD-CHO a
 37°C em uma atmosfera de dióxido de carbono a 6% durante um máximo de
quatro dias. Para cada subsequente passagem (sacos para célula de 100 L
15 e 200 L), as células são cultivadas em uma densidade alvo de $2,0 \times 10^5$ célu-
las viáveis/mL, em que as culturas são objetivadas para ter uma viabilidade
celular de cultura final $\geq 80\%$. As culturas são incubadas em Meio CD-CHO a
 37°C em uma atmosfera de dióxido de carbono a 6% durante um máximo de
quatro dias. Valores exemplificativos para a densidade final de células viá-
20 veis expansão etapa de inóculo em saco de célula de 20 L, 100 L e 200 L de
 $1,0$ a $2,0 \times 10^6$ células/mL e uma viabilidade celular percentual mínima de \geq
80% foram estabelecidos. Esses valores exemplificativos asseguram que um
número suficiente de células viáveis é usado para inocular o bio-reator de
1000 L.

25 O objetivo das etapas de expansão de inóculo em bio-reator de
cultura de 1000 L e 4000 L do processo com CTLA4-Ig é proporcionar um
número suficiente de células viáveis para inocular o bio-reator de produção
de 20.000 L.

30 Os bio-reatores de cultura são operados no modo em batelada
usando Meio de cultura de células CD-CHO. A temperatura, pH, oxigênio
dissolvido, pressão, agitação e taxas de fluxo de gás para ar, oxigênio e dió-
xido de carbono são controladas através de um sistema de controle distribu-

ido (DCS) e proporcionam condições para crescimento ótimo da cultura nos bio-reatores de cultura. Os bio-reatores de cultura são operados a 37°C. Amostras de cultura são removidas dos bio-reatores de cultura para a determinação de densidade de células viáveis, viabilidade percentual e concentrações de metabólito.

5 O bio-reator de cultura de 1000 L é inoculado com inóculo da etapa de expansão em saco de célula de 200 L para uma densidade alvo inicial de células viáveis de 1,0 a $3,0 \times 10^5$ células viáveis/mL. a cultura é incubada em Meio CD-CHO a 37°C durante um máximo de 5 dias. Valores exemplificativos para a densidade final de células viáveis etapa de expansão de inóculo no bio-reator de cultura de 1000 L é de 1,0 a $2,0 \times 10^6$ células/mL e a viabilidade celular percentual mínima é $\geq 80\%$.

15 O bio-reator de cultura de 4000 L é inoculado com inóculo da etapa de expansão no bio-reator de cultura de 1000 L para uma densidade alvo inicial de células viáveis de 1,0 a $3,0 \times 10^5$ células viáveis/mL. A cultura é incubada em Meio CD-CHO a 37°C durante um máximo de 6 dias. Valores exemplificativos para a densidade final de células viáveis na etapa de expansão de inóculo no bio-reator de cultura de 4000 L é de 1,0 a $2,0 \times 10^6$ células/mL e a viabilidade celular percentual mínima é $\geq 80\%$. Esses valores exemplificativos asseguram que um número suficiente de células viáveis é usado para inocular o bio-reator de produção de 20.000 L.

25 O bio-reator de cultura de 20.000 L é inoculado com inóculo da etapa de expansão no bio-reator de cultura de 4000 L para uma densidade alvo inicial de células viáveis de 1,0 a $1,8 \times 10^5$ células viáveis/mL. A cultura é incubada em Meio CD-CHO a 37°C durante um máximo de 6 dias. Valores exemplificativos para a densidade final de células viáveis na etapa de expansão no bio-reator de cultura de 20.000 L é de 1,0 a $2,0 \times 10^6$ células/mL e a viabilidade celular percentual mínima é $\geq 80\%$. Esses valores exemplificativos asseguram que um número suficiente de células viáveis é usado antes de iniciar a fase de produção no bio-reator de produção de 20.000 L.

30 ***Produção em escala comercial de CTLA4-Ig:*** A fase de produção da presente invenção que ocorre em um bio-reator de produção de

- 20.000 L produz proteína de CTLA4-Ig em alta quantidade e alta qualidade, o que envolve operações de cultura tendo um desvio de temperatura em duas etapas. A cultura de 20.000L que é incubada em Meio CD-CHO a 37°C durante um máximo de 6 dias (conforme descrito acima) é submetida a um
- 5 desvio de temperatura (T-desvio) de 37°C para 34°C no dia 6 (o final da fase de crescimento logarítmico). Doze horas após o desvio de temperatura de 37°C para 34°C, Meio CD-CHO é suplementado com um meio de alimentação eRDF modificado (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA; Tabelas 16, 17) e essa alimentação é fornecida diariamente ao reator de produção como um bolo
- 10 (1% peso/peso).

Tabela 16: Composição do meio de alimentação eRDF

Componente	Concentração
Meio eRDF-1 (Invitrogen Corp.)	16,47 g/kg
Dextrose	30,29 g/kg
D-Galactose	12,38 g/kg
L-Glutamina	4,02 g/kg
Insulina r-humana (10 mg/mL de solução)	0,98 mL/kg
Isolado de levedo TC	4,90 g/kg
Água	Conforme requerido
solução de HCl a 1 N	0 - 5 mL/kg para ajustar o pH
solução de NaOH a 10 N	0 - 2 mL/kg para ajustar o pH

Tabela 17: Composição do meio eRDF-1

Componente	Concentração (mg/L)
Sulfato cúprico 5 H ₂ O	0,0008
Sulfato ferroso 7 H ₂ O	0,220
Sulfato de magnésio (MgSO ₄)	66,20
Sulfato de zinco 7 H ₂ O	0,230
Piruvato de sódio	110,0
Ácido DL tioóctico Lipóico	0,050
Ácido linoleico	0,021
L-Alanina	6,68
L-Arginina	581,44
L-Asparagina	94,59
L-Ácido aspártico	39,93
L-Cistina 2 HCl	105,38
L-Ácido glutâmico	39,7
Glicina	42,8
L-Histidina HCl-H ₂ O	75,47
L-Isoleucina	157,40
L Leucina	165,30
L Lisina HCl	197,26

L-Metionina	49,24
L-fenilalanina	74,30
L-Prolina	55,3
L-Hidróxiprolina	31,5
L-Serina	85,10
L-Treonina	110,8
L-Triptofano	18,40
L-Tirosina 2 Na 2H ₂ O	108,10
L-Valina	108,9
Ácido Para Amino Benzóico	0,51
Vitamina B12	0,339
Biotina	1,00
Pantotenato de D-Ca	1,29
Cloreto de colina	12,29
Ácido fólico	1,96
i-Inositol	46,84
Niacinamida	1,47
Piridoxal HCl	1,00
Piridoxina HCl	0,420
Riboflavina	0,21
Tiamina HCl	1,59
Putrescina 2HCl	0,020

A cultura de 20.000L é incubada em Meio CD-CHO suplementado diariamente com meio de alimentação eRDF a 34°C durante um máximo de 4 dias. No dia 10, a cultura de 20.000 L é submetida a um segundo desvio-T de 34°C para 32°C. A cultura de produção de 20.000 L no bio-reator de

5 produção foi mantida a 32°C durante um máximo de 8 dias. No dia 18, a amostra de cultura foi analisada com relação aos seguintes valores exemplificativos: densidade de células viáveis na etapa de produção no bio-reator de cultura de 20.000 L é de 3,0 a 8,0 x 10⁶ células/mL; viabilidade celular percentual mínima é ≥ 38%; proporção molar final de ácido siálico (descrita em

10 alguma parte aqui) é ≥ 6; e titulação final de produto de proteína de CTLA4-Ig é de 0,5 a 1,3 g/L. Esses valores exemplificativos asseguram que um produto de proteína de qualidade e quantidade suficientes está sendo produzido pela linhagem de células CHO recombinante e que a cultura de células de mamífero de 20.000 L está pronta para ser coletada. À cultura no bio-reator

15 durante a fase de produção, é fornecida uma alimentação em bolo diária usando meio eRDF modificado (Tabela 16, 17), como segue : começando 12

horas após o desvio de temperatura inicial (37°C para 34°C), um mínimo de 1% de volume de cultura foi adicionado como meio de alimentação; se o nível de glicose cai para abaixo de 3 g/L, um volume calculado é adicionado para levar o nível de glicose de volta para 3 g/L.

- 5 A fase de produção teve uma duração de 18 dias na escala de 20.000 L. Amostras foram tomadas em uma base diária do bio-reator de produção para análise. Por exemplo, a amostra usada para contagem de células foi corada com azul de tripano (Sigma, St. Louis, Mo.). A contagem de células e determinação de viabilidade celular foram realizadas usando um
- 10 hemocitômetro para conter células viáveis coradas sob o microscópio. Para análise de metabólitos, uma amostra adicional transformada em alíquotas foi centrifugada durante 20 minutos a 2000 rpm (4°C) para empelotar as células. O sobrenadante foi analisado com relação à titulação de proteína, ácido siálico, glicose, lactato, glutamina, glutamato, pH, pO₂, pCO₂, amônia e LDH,
- 15 usando técnicas e protocolos convencionalmente praticados na técnica.

Exemplo 15: Purificação de CTLA4-Ig recombinante

- Cromatografia de troca de ânions QXL para purificação de CTLA4-Ig:*** A etapa de cromatografia de troca de ânions no processo com CTLA4-Ig usa uma resina de troca de ânions Q Sepharose Extreme Load
- 20 (QXL). Essa resina é fornecida pela GE Healthcare, Waukesha, WI (formalmente Amersham Biosciences). A etapa de cromatografia QXL é para capturar e concentrar o dímero de CTLA4-Ig do material em-processo das etapas de operação de coleta para processamento adicional a jusante.

- 25 Uma coluna com diâmetro interno de 1,0-2,0 m é empacotada com resina QXL em uma altura de 17 a 30 cm, representando um volume de cerca de 643 L a 1018 L. A coluna é qualificada para uso determinando a altura equivalente a uma lâmina teórica (HETP) e assimetria (A_s) da coluna empacotada. Uma HETP de 0,02 a 0,08 cm e uma A_s de 0,8 a 1,2 são empregadas para qualificação da coluna QXL.

- 30 A operação da coluna QXL é realizada em temperatura ambiente. O caldo de cultura de células clarificado é carregado sobre uma coluna QXL equilibrada. A etapa de cromatografia QXL é realizada usando uma ta-

xa de fluxo máxima de 99,4 L/min. A pressão de entrada da coluna é mantida abaixo de 35 psig. A carga máxima de proteína de CTLA4-Ig para a coluna QXL é de 28 gramas de CTLA4-Ig por litro de resina.

5 A coluna de cromatografia QXL é primeiro sanitizada com uma solução de hidróxido de sódio a 1N. A sanitização é realizada usando 2 a 4 volumes de coluna (CV) da solução de hidróxido de sódio a 1N. A sanitização está completa quando a condutividade do efluente da coluna é igual a 169 ± 33 mS/cm e a coluna é mantida durante 60 a 120 minutos.

10 Após etapa de sanitização, a coluna é equilibrada com um tampão de HEPES a 75 mM, cloreto de sódio a 360 mM, pH de 8,0. O equilíbrio está completo quando um mínimo de 3 CV de tampão de equilíbrio foi passado através da coluna e o pH do efluente é de $8,0 \pm 0,2$ e a condutividade do efluente é de $13,4 \pm 1,0$ mS/cm.

15 O material em-processo da etapa de operação de coleta é carregado sobre a coluna de QXL. A coluna é lavada com um mínimo de 10 CV de tampão de Lavagem (HEPES a 75 mM, NaCl a 360 mM, pH de 8,0) e a absorbância a 280 nm (A_{280}) do efluente da coluna é medida ao final da etapa de lavagem. CTLA4-Ig é, então, eluída da coluna com um tampão de HEPES a 25 mM, NaCl a 325 mM ou NaCl a 850 mM, pH de 7,0. O eluato é
20 desviado para um vaso de coleta quando a A_{280} aumenta para $\geq 0,02$ unidades de absorbância (AU) acima do valor de AU ao final da etapa de lavagem. O eluato é coletado até que a A_{280} da borda guia do pico de eluição diminua para um valor de $\square 1,0$ AU.

25 Um dímero de produto de CTLA4-Ig com uma proporção molar de moles de ácido siálico para moles proteína de CTLA4-Ig que é ≥ 8 é coletado e um reservatório de material de espécies de elevado peso molecular de CTLA4-Ig está presente a $\leq 25,7\%$. O material de espécies de elevado peso molecular de CTLA4-Ig, o qual inclui tetrâmeros, pode, então, ser ainda
30 purificado para uso como uma substância distinta para os métodos de tratamento descritos aqui.

HIC em Phenyl Sepharose FF para purificação de CTLA4-Ig.

A etapa de cromatografia de interação hidrofóbica (HIC) usa resina Phenyl

Sepharose Fast Flow (GE Healthcare, Waukesha, WI (formalmente Amersham Biosciences)). A etapa de HIC reduz o nível de material de espécies de elevado peso molecular de CTLA4-Ig presente no reservatório de produto de QXL. O dímero de CTLA4-Ig não se liga à resina de HIC sob as condições de carregamento usadas para a etapa de HIC.

5 Uma coluna com diâmetro interno de 1,0 a 2,0 m é empacotada com resina Phenyl Sepharose Fast Flow para uma altura de 18 a 22 cm, representando um volume de cerca de 680 a 852 L. A coluna é qualificada para uso determinando a HETP e A_s da coluna empacotada. Uma HETP de 10 0,02 a 0,08 cm e uma A_s de 0,8 a 1,2 são empregadas para qualificação da coluna de HIC.

A operação da coluna de HIC é realizada em temperatura ambiente. O reservatório de eluato da etapa na coluna QXL é carregada sem outro tratamento à coluna de HIC equilibrada. A etapa de HIC é operada em 15 uma taxa de fluxo máxima de 65,4 L/min e em uma pressão de operação de ≤ 13 psig. A carga máxima de proteína de CTLA4-Ig aplicada à coluna de HIC é de 10,0 g de proteína de CTLA4-Ig por litro de resina. Múltiplos ciclos da etapa de HIC podem ser empregados baseado na quantidade proteína de CTLA4-Ig presente no reservatório de eluato de QXL.

20 A coluna de HIC é primeiro sanitizada com uma solução de hidróxido de sódio a 1 N. A sanitização está completa quando 2 a 4 CV da solução de hidróxido de sódio a 1N passaram através da coluna. A coluna é, então, mantida durante 60 a 120 minutos para assegurar essa sanitização.

Após a etapa de sanitização, a coluna é equilibradas com um 25 tampão de HEPES a 75 mM, cloreto de sódio a 2,55 M, pH de 7,0. O equilíbrio está completo quando um mínimo de 3 CV de tampão de equilíbrio passou através da coluna e o pH do efluente é de $7,0 \pm 0,3$ e a condutividade é de 71,5 a 75,5 mS/cm.

O eluato da etapa QXL é aplicado à coluna de HIC equilibrada. A 30 coluna é, então, lavada com o tampão de equilíbrio até que a A_{280} do efluente diminua para entre 0,8 e 1,0 AU. O efluente contendo proteína de CTLA4-Ig de cada ciclo da etapa de HIC é filtrado através de um filtro de acetato de

celulose de 0,2 μm em um vaso de coleta de aço inoxidável comum. Esse reservatório de produto de HIC é mantido no vaso de coleta a 2° a 8°C. O tempo máximo de contenção no vaso de coleta é de 3 dias.

5 Um dímero de produto de CTLA4-Ig com uma proporção molar de moles de ácido siálico para moles proteína de CTLA4-Ig que é ≥ 8 é coletado e um reservatório de material de espécies de elevado peso molecular de CTLA4-Ig está presente a $\leq 2,5\%$.

Cromatografia por afinidade em proteína A recombinante para purificação de CTLA4-Ig: A resina de afinidade por proteína A recombinante Sepharose Fast Flow (rPA) usada no processo de produção de CTLA4-Ig a jusante é obtida da GE Healthcare (Waukesha, WI (formalmente Amersham Biosciences)). A coluna da etapa de cromatografia rPA ainda purifica a proteína de CTLA4-Ig. Essa etapa remove DNA e proteína de células hospedeiras, incluindo proteína 1 quimiotática de monócito (MCP-1).

15 Uma coluna com diâmetro interno de 80 a 140 cm é empacotada com resina rPA para uma altura de 18 a 25 cm, representando um volume de cerca de 339 a 372 L. A coluna é qualificada para uso determinando a HETP e A_s da coluna empacotada. Uma HETP de 0,02 a 0,08 cm e uma A_s de 0,8 a 1,2 são empregadas para qualificação da coluna. O número máximo de uso para a resina rPA estabelecido em um estudo de vida útil da resina é

20 60.

A operação na coluna de rPA é realizada em temperatura ambiente. O reservatório de produto da inativação viral é carregado sobre a coluna de rPA equilibrada. A etapa de rPA é operada em uma taxa de fluxo máxima de 26,7 L/min e uma pressão de operação de \square 13 psig. A carga máxima de proteína de CTLA4-Ig aplicada à coluna de rPA é de 25 g de proteína de CTLA4-Ig por litro de resina.

25 A coluna de rPA é equilibrada com um tampão de Tris a 25 mM, NaCl a 250 mM, pH de 8,0. Equilíbrio está completo quando um mínimo de 3 CV de tampão de equilíbrio passou através da coluna e os valores de pH e condutividade dos efluentes estão entre 7,8 a 8,2 e 23,0 a 27,0 mS/cm, respectivamente.

30

O reservatório de produto da etapa de inativação viral é aplicado à coluna de rPA equilibrada. A etapa de cromatografia rPA inclui duas etapas de lavagem. A primeira etapa de lavagem é realizada usando um mínimo de 5 CV de um tampão de Tris a 25 mM, NaCl a 250 mM, Triton X-100 a 0,5%, pH de 8,0 para remover material fracamente ligado da coluna de rPA. A segunda etapa de lavagem é realizada usando um tampão de Tris a 25 mM, NaCl a 250 mM, pH de 8,0. A segunda etapa de lavagem usa um mínimo de 5 CV para remover o Triton X-100 residual da coluna de rPA.

A proteína de CTLA4-Ig é eluída da coluna de cromatografia rPA com um tampão de glicina a 100 mM, pH de 3,5. O eluato é desviado para um vaso de coleta quando a A_{280} aumenta para $\geq 0,2$ AU acima da linha de base. O efluente da coluna é filtrado através de um filtro de acetato de celulose de 0,2 μ m em um vaso de coleta equipado com um agitador. O eluato é coletado até que a A_{280} da borda guia do pico de eluição diminua para um valor de $\leq 0,2$ AU. O pH do eluato empochado é ajustado para um pH de 7,5 $\pm 0,2$ com um tampão de HEPES a 2 M, pH de 8,0. O reservatório de produto da etapa de cromatografia rPA é mantido a $2 \pm 8^\circ\text{C}$ durante um máximo de 3 dias.

Um dímero de produto de CTLA4-Ig com uma proporção molar de moles de ácido siálico para moles proteína de CTLA4-Ig que é ≥ 8 é coletado; um reservatório de material de espécies de elevado peso molecular de CTLA4-Ig está presente a $\leq 2,5\%$; e um reservatório de MCP-1 ≤ 38 ng/mL está presente.

Cromatografia de troca de ânions QFF para purificação de CTLA4-Ig: A etapa de cromatografia de troca de ânions no processo de produção de CTLA4-Ig produção a jusante usa uma resina de cromatografia de troca de ânions Q Sepharose Fast Flow (QFF) (GE Healthcare (Waukesha, WI (formalmente Amersham Biosciences)). O objetivo da etapa de cromatografia QFF é reduzir os níveis residuais de proteína A e proporcionar redução adicional de DNA de célula hospedeira do reservatório de produto da etapa de filtração viral. A etapa em coluna QFF é também usada para controlar a proporção molar de ácido siálico para proteína de CTLA4-Ig do re-

servatório de produto da etapa de cromatografia QFF e proporcionar controle adicional de níveis de materiais de HMW de CTLA4-Ig em-processo. O ponto de controle primário em-processo para a redução de Material de HMW de CTLA4-Ig é a etapa de HIC.

5 Uma coluna com diâmetro interno de 60 a 140 cm é empacotada com resina QFF para uma altura de 28 a 35 cm, representando um volume de cerca de 536 a 667 L. A coluna é qualificada para uso determinando a HETP e A_s da coluna empacotada. Uma HETP de 0,02 a 0,08 cm e uma A_s de 0,8 a 1,2 são empregadas para qualificação da coluna.

10 A operação na coluna QFF é realizada em temperatura ambiente. O reservatório de produto da etapa de filtração viral é carregado sobre a coluna QFF equilibrada. A etapa QFF é operada em uma taxa de fluxo máxima de 38,7 L/min e uma pressão de operação de \square 35 psig. A carga máxima de proteína de CTLA4-Ig aplicada à coluna QFF é de 25 g de proteína
15 de CTLA4-Ig por litro de resina.

A coluna de cromatografia QFF é primeiro sanitizada com uma solução de hidróxido de sódio a 1 N. A sanitização é realizada usando 2 a 4 CV da solução de hidróxido de sódio a 1N. A sanitização está completa quando a condutividade do efluente da coluna é igual a 136 a 202 mS/cm e
20 a coluna é mantida durante 60 a 120 minutos.

Após a etapa de sanitização, a coluna é equilibrada com um tampão de HEPES a 25 mM, cloreto de sódio a 100 mM, pH de 8,0. O equilíbrio está completo quando um mínimo de 4 CV de tampão de equilíbrio passou através da coluna e o pH do efluente é de 7,7 a 8,3 e a condutividade é de 10,5 a 12,9 mS/cm.
25

O reservatório de produto da etapa de filtração viral contido em sacos de bioprocessamento é transferido para um vaso de coleta de aço inoxidável estéril.

O reservatório de produto da etapa de filtração viral é aplicado à
30 coluna QFF equilibrada. A etapa de cromatografia QFF inclui duas etapas de lavagem. A primeira etapa de lavagem é realizada usando um mínimo de 5,0 CV de um tampão de HEPES a 25 mM, NaCl a 120 mM, pH de 8,0. A

segunda etapa de lavagem é realizada usando um mínimo 5,0 CV de um tampão de HEPES a 25 mM, NaCl a 130 mM, pH de 8,0.

O dímero de CTLA4-Ig é eluído da coluna de cromatografia QFF usando um tampão de HEPES a 25 mM, NaCl a 200 mM, pH de 8,0. A coleta de eluato é iniciada quando a A_{280} do efluente começa a aumentar. Durante eluição, o efluente da coluna é filtrado através de um filtro de acetato de celulose de 0,2 μ m no vaso de coleta de aço inoxidável. O eluato é coletado até que a absorbância da borda guia do pico de eluição diminua para \approx 0,2 AU acima da linha de base. O vaso de coleta é, então, esfriado para 2 \approx a 8°C. O tempo de contenção máximo para que o produto da etapa de cromatografia QFF empoce a 2 \approx a 8°C é 3 dias.

Um dímero de produto de CTLA4-Ig com uma proporção molar de moles de ácido siálico para moles proteína de CTLA4-Ig que é ≥ 8 é coletado; um reservatório de material de espécies de elevado peso molecular de CTLA4-Ig está presente a $\leq 2,5\%$; um reservatório de material de baixo peso molecular de CTLA4-Ig (por exemplo, monômero de CTLA4-Ig) está presente a $\leq 0,5\%$; e um reservatório de MCP-1 $\leq 9,5$ ng/mL está presente.

O sistema Pall Filtron TFF é usado na etapa de concentração e diafiltração do processo de produção de CTLA4-Ig a jusante. O objetivo dessa etapa é concentrar o produto da etapa de cromatografia QFF. Empoçar para 45 a 55 g/L e trocar o tampão de eluição usado na etapa de cromatografia QFF pelo tampão final usado para Composições de CTLA4-Ig. O produto de proteína de CTLA4-Ig concentrado empoçado é transferido através de um filtro de fluoreto de polivinilideno de 0,2 μ m e para um saco de bio-processo de 50 L.

Exemplo 16: CTLA4-Ig-Proporção molar Determinação de Amino monossacarídeos

Esse Exemplo proporciona métodos para obter proporções molares de amino monossacarídeos (N-acetil galactosamina, N-acetil glicosamina) para proteína em amostras de CTLA4-Ig.

Instrumentação: Sistema de eletroforese em capilar Beckman P/ACE MDQ CE System; sistema de detecção com Detector Beckman La-

ser-Induced-Fluorescence (LIF) (acoplado com P/ACE MDQ); Capilar não revestido (d.i. de 25 μ m; d.e. de 360 μ m), comprimento total de 27-31 cm para acomodar P/ACE MDQ ou 5510 PolyMicro Technologies, Cat. No. TSP025375; Misturador Maxi-Mix Thermolyne, (VWR Catálogo No. 58810-185)

5

Reagentes:

Solução de hidrólise (solução aquosa de HCl a 4 N)

Adicionar 160 mL de HCl a 6 N e 80 mL de água com grau para HPLC a uma garrafa de vidro de 250 mL.

10

Agitar para misturar bem.

Armazenar a 2-8 $^{\circ}$ C durante até 6 meses.

Solução de Derivatização I (solução aquosa de APTS a 0,1 M)

Adicionar 192 μ L de água com grau para HPLC a 10 mg de pó de APTS em um frasco de vidro.

15

Submeter o frasco a turbilhamento 5-10 segundos para dissolver completamente o APTS.

Armazenar a -20° C durante até um ano.

Solução de Derivatização II (ácido acético a 1 M e NaBH₃CN a 0,25 M)

20

Diluir 20 μ L ácido acético com 320 μ L água com grau para HPLC (diluição de 17 vezes) em um tubo para centrífuga a 0,4 mL para fazer uma solução de ácido acético a 1 M.

Pesar $2,0 \pm 0,5$ mg de NaBH₃CN em um frasco criogênico.

Usando a seguinte fórmula, adicionar um volume apropriado da solução de ácido acético a 1 M para fazer 0,25 M NaBH₃CN a 0,25 M.

25

Volume (μ L) = $103 \times (\text{peso de NaBH}_3\text{CN em mg}) / (62,84 \text{ g/mol} \times 0,25 \text{ moles/L})$

• Cianoborohidreto de sódio (NaBH₃CN) deverá ser armazenado no escuro em um secador.

30

• Sub-divisão do reagente em uma série de criofrascos de 2,0 mL para armazenamento é recomendada para evitar abertura repetida da garrafa de reagente original como segue:

• Pesar $1,0 \text{ g} \pm 0,2 \text{ mg}$ de cianoborohidreto de sódio em um crio-

frasco de 2,0 mL. Transformar em alíquota os conteúdos todos de cianoborohidreto de sódio da garrafa original dessa maneira.

- Tampar hermeticamente e rotular os criofrascos seqüencialmente (1,2,3, etc.) junto com o nome do reagente, número de lote e uma data de expiração de 6 meses.

• Os frascos deverão ser vedados com parafilme para evitar umidade.

- Pesar cianoborohidreto de sódio para a Solução de Derivatização II não mais do que três vezes a partir do mesmo criofrasco. Anotar isso e do número de seqüência do criofrasco na folha de dados do laboratório.

- Um pico de reagente observado no perfil de CE ou pobre rotulação pode ocorrer após abertura repetida do criofrasco ou com esse lote de cianoborohidreto de sódio em particular. Se isso afeta os resultados, descartar o criofrasco que está sendo usado e pesar reagente de um criofrasco com o próximo número de seqüência ou de um novo lote de cianoborohidreto de sódio.

Tampão de re-acetilação (bicarbonato de sódio a 25 mM, pH de 9,5)

Pesar 0,210 \pm 0,02 g de bicarbonato de sódio em um béquer de vidro limpo de 100 mL.

- Adicionar 90 mL de água com grau para HPLC e misturar sobre uma placa de agitação até os sais estarem completamente dissolvidos.

Ajustar o pH para 9,5 \pm 0,1 com NaOH a 10 N.

- Adicionar água com grau para HPLC para levar o volume final para 100 mL. Filtrar (etapa 1.26) a solução e armazenar em temperatura ambiente durante até 3 meses.

Tampão de Operação (tetraborato de sódio a 60 \pm 5 mM, pH de 9,25)

Pesar 1,21 \pm 0,02 g de tetraborato de sódio em um béquer de vidro limpo de 100 mL.

- Adicionar 90 mL de água com grau para HPLC e misturar sobre uma placa de agitação até os sais estarem completamente dissolvidos.

Ajustar o pH para 9,25 \pm 0,10 com NaOH a 10 N.

Adicionar água com grau para HPLC para levar o volume final

para 100 mL para uma concentração final de 60 \pm 5 mM.

Para uma solução a 55 mM, pesar 1,11 g (\pm 0,02) de tetraborato de sódio e seguir as instruções acima para dissolução e titulação.

5 Para uma solução a 65 mM, pesar 1,31 g (\pm 0,02) de tetraborato de sódio e seguir as instruções acima para dissolução e titulação.

Armazenar em temperatura ambiente durante até 3 meses. Preparar tampão fresco se a resolução de pico é obtida (valor R < 1,0).

10 Opcional: Diluir solução de tampão de tetraborato (MicroSolv) através da adição de 120 mL de água ultra pura a 80 mL de tampão de tetraborato de sódio a 150 mM para uma concentração final de 60 mM (\pm 5 mM). Titular com NaOH a 10N para levar o pH da solução para 9,25 (\pm 0,1).

Para uma solução de tetraborato a 55 mM, diluir 66 mL de tampão de tetraborato de sódio a 150 mM em 114 mL de água ultra pura. Titular conforme acima.

15 Para uma solução de tetraborato a 65 mM, diluir 78 mL de tampão de tetraborato de sódio a 150 mM em 102 mL de água ultra pura. Titular conforme acima.

Armazenar a solução em temperatura ambiente durante um máximo de 3 meses.

20 Preparar tampão fresco se a resolução de pico é obtida (valor R < 1,0).

Soluções de enxágüe de capilar

Solução de NaOH a 10 N

25 Adicionar 1 mL de solução de NaOH a 10 N em um tubo de plástico graduado de 15 mL contendo 9 mL de água com grau para HPLC. Misturar bem através de turbilhamento 5-10 seg.

Armazenar a solução em temperatura ambiente durante até 6 meses.

Solução de HCl a 6N:

30 Adicionar 1 mL de solução de HCl a 6 N em um tubo de plástico graduado de 15 mL

contendo 5 mL de água com grau para HPLC. Misturar bem através de turbilhamento 5-10 seg.

Armazenar a solução em temperatura ambiente durante até 6 meses.

3.6.3 Solução de metanol a 80%:

5 Adicionar 8 mL de metanol com grau para HPLC em um tubo de plástico graduado de 15 mL contendo 2 mL de água com grau para HPLC. Misturar bem através de turbilhonamento 5-10 seg.

Armazenar a solução em temperatura ambiente durante até 6 meses.

Soluções de estoque de Padrão de Monossacarídeo

10 N-Acetil Glicosamina (GalNAc)

Pesar precisamente 5 □ 1 mg de GalNAc em um frasco criogênico de 2,0 mL.

Adicionar 1 mL de água com grau para HPLC e misturar bem através de turbilhonamento até dissolvida.

15 Registrar a concentração precisa da solução (mg/mL).

N-Acetil Galactosamina (GlcNAc)

Pesar precisamente 5 □ 1 mg de GlcNAc em um frasco criogênico de 2,0 mL.

20 Adicionar 1 mL de água com grau para HPLC e misturar bem através de turbilhonamento até dissolvida.

Registrar a concentração precisa da solução (mg/mL).

N-Acetil Manosamina (ManNAc)

Pesar precisamente 5 □ 1 mg de ManNAc em um frasco criogênico de 2,0 mL.

25 Adicionar 1 mL de água com grau para HPLC e misturar bem através de turbilhonamento até dissolvida.

Registrar a concentração precisa da solução (mg/mL).

30 Armazenar Soluções de estoque de Padrão de Monossacarídeo a -20 °C durante até 1

ano.

Solução de trabalho de monossacarídeo I: Solução de trabalho de padrão interno

Diluir a solução de estoque de ManNAc 100 vezes com água com grau para HPLC através da adição de 20 μ L de solução de estoque de ManNAc em um frasco criogênico de 2 mL o qual já contém 1980 μ L de água com grau para HPLC. Submeter a turbilhamento aproximadamente 5 a 10 segundos.

Armazenar a solução de trabalho de padrão interno a 2-8 °C durante até 6 meses.

Solução de trabalho de monossacarídeo II: Solução de Trabalho Padrão de Mistura Amino

10 Em um frasco criogênico de 2,0 mL contendo 1960 μ L de água com grau para HPLC, adicionar 20 μ L de soluções de estoque de GalNAc e GlcNAc, respectivamente. Submeter a turbilhamento aproximadamente 5 a 10 segundos.

15 Armazenar a solução de Trabalho Padrão de Mistura Amino a 2-8 °C durante até 6 meses.

Soluções de amostra e Material de Referência.

Descongelar as amostras de proteína a 2-8 °C e misturar ligeiramente através de inversão.

20 Diluir as amostras e Material de Referência com água com grau para HPLC para cerca de 1,0 mg/mL. Anotar a concentração para três situações representativas.

Condições de operação CE

Tampão de Operação (etapa 2.5) tetraborato de sódio a 60 mM, pH de 9,25

25 Temperatura de cartucho do capilar 25 °C

Tensão de 25-30 kV, modo positivo

Condição do detector: Detector LIF, Excitação: 488 nm, Emissão: 520 nm.

30 Injeção de amostra Modo de injeção sob pressão, 20 s a 0,5 PSI

Tempo de operação 10 minutos

Armazenamento de amostra 10 °C

Procedimento

Nota: Usar uma pipeta de 10 μL e micro ponteiras para transferir volumes de amostra de 10 μL e pipetas de tamanho apropriado para transferir outros reagentes (veja faixas na etapas 2.10 a 2.14).

Hidrólise

- 5 Em um tubo para centrifuga de 0,65 mL, adicionar 10 μL de solução de trabalho de ManNAc e 200 μL de Solução de Hidrólise a 4 N (etapa 3,1). Isso serve como uma corrente de sistema.

- 10 Em um tubo para centrifuga de 0,65 mL, adicionar 10 μL de solução de trabalho de ManNAc e 10 μL de Solução Padrão de Mistura Amino (etapa 3,9). Adicionar ainda 200 μL de Solução de Hidrólise a 4N. Isso serve como padrão de monossacarídeo para quantificação e Adequabilidade de sistema. Preparar em duplicata.

- 15 Em um tubo para centrifuga de 0,65 mL, adicionar 10 μL de solução de trabalho de ManNAc e 10 μL de solução de Material de Referência de CTLA4-Ig (aproximadamente 1 mg/mL).

Adicionar ainda 200 μL de solução de HCl a 4N. Preparar em duplicata.

- 20 Em um tubo para centrifuga de 0,65 mL, adicionar 10 μL de solução de trabalho de ManNAc e 10 μL de solução de amostra (aproximadamente 1 mg/mL). Adicionar ainda 200 μL de solução de HCl a 4N. Preparar em duplicata.

- 25 Submeter a turbilhamento as amostras durante aproximadamente 10 segundos e centrifugar durante aproximadamente 5-10 segundos. Colocar as amostras em uma prateleira para frasco com 96 posições e incubar em um forno a 95o C durante 6 horas.

Após hidrólise, colocar as amostras hidrolisadas a -20o C durante 10 minutos para esfriar.

- 30 Centrifugar rapidamente as amostras hidrolisadas até que qualquer condensado seja forçado para o fundo do tubo (5-10 segundos em alta velocidade). Evaporar as amostras até secagem em um SpeedVac.

Nota: Desligar o calor do SpeedVac e ajustar a taxa de evaporação em "Baixa".

Reconstituir cada amostra com 100 µL de água com grau para HPLC e submeter a turbilhamento 10-15 seg. Evaporar as amostras até secagem em um SpeedVac.

Nota: Desligar o calor do SpeedVac e ajustar a taxa de evaporação em "Baixa".

Re-acetilação

Reconstituir cada amostra com 10 µL de tampão de re-acetilação M6 e submeter a turbilhamento 5-10 seg. para misturar bem. Adicionar 4 µL de reagente de re-acetilação M3 a cada tubo. Submeter a turbilhamento durante aproximadamente 5-10 segundos. Incubar sobre gelo durante 30 minutos.

Nota: O tampão de re-acetilação (M6) e reagente (M3) podem ser substituídos, respectivamente, por NaHCO₃ a 25 mM (adicionar 20 µL) preparado no local e anidrido acético (adicionar 4 µL).

Evaporar as amostras até secagem em um SpeedVac.

Nota: Desligar o calor do SpeedVac e ajustar a taxa de evaporação em "Baixa".

Reconstituir cada amostra com 100 µL de água com grau para HPLC e submeter a turbilhamento 10-15 seg. Evaporar as amostras até secagem em um SpeedVac.

Nota: Desligar o calor do SpeedVac e ajustar a taxa de evaporação em "Baixa".

Derivatização

Colocar a micro centrífuga no forno para equilibrar para a temperatura do forno de 55 °C.

Reconstituir cada amostra com 10 µL de Solução de Derivatização I (solução de APTS a 0,1 M, etapa 3,2). Submeter a turbilhamento aproximadamente 5-10 segundos.

Adicionar 5 µL da Solução de Derivatização II (HAc a 1M e Na-BH₃CN a 0,25 M, etapa 3.3). Submeter a turbilhamento aproximadamente 5-10 segundos e centrifugar.

Carregar rapidamente os frascos de amostra na centrífuga pré-

aquecida e colocar a centrífuga de volta no forno a 55 °C. Incubar durante 3 horas enquanto centrifuga a 2000 rpm. Isso impede a condensação de solvente sobre a superfície do frasco.

Preparo de instrumentação

- 5 Instalar um novo capilar, enxaguar no modo de alta pressão (80 PSI) usando as seguintes etapas:

NaOH a 1 N durante 20 minutos.

água com grau para HPLC durante 10 minutos.

tampão de tetraborato de sódio a 60 mM durante 10 minutos.

10 **Operação**

Antes cada operação, operar as seqüências de lavagem/enxágüe para enxaguar o capilar.

Então, operar o Padrão de Adequabilidade de Sistema (padrão de monossacarídeo) para assegurar que o sistema é adequado.

- 15 Uso de NaOH a 1N pode causticar o interior de capilares de diferentes vendedores e causa um desvio nos tempos de migração por toda a operação. Se isso faz com que o tempo de migração do último pico (GlcNAc) seja maior do que 10,0 minutos, pode ser necessário substituir NaOH a 1N por NaOH a 0,1N ou água com grau para HPLC para o enxágüe da etapa 2.

- 20 Quando uso de um capilar equivalente e do procedimento de lavagem acima não é adequado, uso de metanol a 80% e/ou HCl a 1N pode ser necessário para que o último pico (G1cNAc) esteja dentro dos valores exemplificativos de 10,0 minutos.

Preparo de injeção

- 25 Após derivatização, deixar as amostras esfriar para a temperatura ambiente. Centrifugar aproximadamente 10 segundos em temperatura ambiente, até o condensado ser forçado para o fundo do tubo.

- 30 Adicionar 85 µL de água com grau para HPLC a cada tubo para levar o volume final de cada amostra para 100 µL. Submeter a turbilhamento durante 5-10 segundos.

Transferir 10 µL de amostra de cada tubo para um micro frasco para CE e adicionar 190 µL de água com grau para HPLC a cada tubo.

Submeter a turbilhonamento durante 5-10 segundos.

Etapas de enxágüe e seqüência de injeção:

Nota: Para cada quatro injeções, trocar o Tampão de Operação de CE por Tampão de Operação de CE recentemente preparado (em virtude do efeito de depleção iônica). Realizar enxágüe do capilar a 40 psi.

5

Etapa	Descrição	Tempo de operação (min)
1 (enxágüe)	Água com degrau para HPLC	1
2 (enxágüe)	Refira-se à seção 5.4.2.3	3
	NaOH a 1N ou NaOH a 0,1N OU água com degrau para HPLC <i>Nota: Quando usando água para HPLC para a etapa de enxágüe 2, as etapas 1, 2 e 3 podem ser combinadas em uma única operação de 3 minutos.</i>	1
3 (enxágüe)	água com degrau para HPLC	1
4 (enxágüe)	Tampão de tetraborato de sódio a 60 mM	5
5 (enxágüe)	Placebo (Marcador de padrão interno)	10
6 (enxágüe)	Repetir 1 - 4	10
7 (enxágüe)	Adequabilidade de Sistema (prep 1 de padrão de mono)	10
8 (enxágüe)	Repetir 1 - 4	10
9	Adequabilidade de Sistema (prep1 de padrão de mono)	10
10 (enxágüe)	Repetir 1 - 4	10
11	Adequabilidade de Sistema (prep 2 de padrão de mono)	10
12 (enxágüe)	Repetir 1 - 4	10
13	Adequabilidade de Sistema (prep 2 de padrão de mono)	10
14 (enxágüe)	Repetir 1 - 4	10
15	Prep 1 de CTLA4-Ig	10
16 (enxágüe)	Repetir 1 - 4	10
17	Prep 2 de CTLA4-Ig	10
18 (enxágüe)	Repetir 1 - 4	10
19	Prep 1 de amostra 1	10
20 (enxágüe)	Repetir 1 - 4	10
21	Prep 1 de amostra 1	10
22 (enxágüe)	Repetir 1 - 4	10
23	Prep 2 de amostra 1	10
24 (enxágüe)	Repetir 1 - 4	10
25	Prep 2 de amostra 1	10
26 (enxágüe)	Repetir 1 - 4	10
27	Prep 1 de amostra 2	10
28 (enxágüe)	Repetir 1 - 4	10
29	Prep 1 de amostra 2	10
30 (enxágüe)	Repetir 1 - 4	10
31	Prep 2 de amostra 2	10
32 (enxágüe)	Repetir 1 - 4	10
33	Prep 2 de amostra 2	10
34 (enxágüe)	Repetir 1 - 4	10
35	Prep 1 de amostra 3	10
36 (enxágüe)	Repetir 1 - 4	10
37	Prep 1 de amostra 3	10

38 (enxágüe)	Repetir 1 - 4	10
39	Prep 2 de amostra 3	10
40 (enxágüe)	Repetir 1 - 4	10
41	Prep 2 de amostra 3	10
42 (enxágüe)	Repetir 1 - 4	10
43	Material prep 1 e CTLA4-Ig	10
44 (enxágüe)	Repetir 1 - 4	10
45	Material prep 2 e CTLA4-Ig	10
46 (enxágüe)	Repetir 1 - 4	10
47	Adequabilidade de Sistema (prep 1 de padrão de mono)	10
48 (enxágüe)	Repetir 1 - 4	10
49	Adequabilidade de Sistema (prep 1 de padrão de mono)	10
50	Repetir 1 - 4	10
51	Adequabilidade de Sistema (prep 2 de padrão de mono)	10
52	Repetir 1 - 4	10
53	Adequabilidade de Sistema (prep 2 de padrão de mono)	10

Adequabilidade de sistema

Nota: Valores de Adequabilidade de sistema são determinados usando as primeiras injeções de padrão de adequabilidade de sistema, a menos que de outro modo especificado.

- 5 O eletroferograma do primeiro padrão de adequabilidade de sistema deverá ser similar àquele mostrado na Figura 81, onde o pico 1 é GalNAc; o pico 2 é ManNAc; o pico 3 é GlcNAc.

- 10 *Nota: Quando outros instrumentos de CE que não Beckman PACE MDO têm de ser usados, o comprimento do capilar poderia ser diferente daquele especificado nesse método em virtude de várias configurações de cartuchos contendo o capilar de separação. Isso causaria variações no tempo de migração de analito, bem como intensidade de pico.*

- 15 A resolução entre dois picos vizinhos é calculada para os primeiros padrões de Adequabilidade de Sistema pelo instrumento de acordo com a seguinte equação:

$$R = \frac{2(t_2 - t_1)}{(W_1 + W_2)}$$

onde:

R = resolução

t_2, t_1 = tempos de migração dos dois picos vizinhos, respectivamente

W_1, W_2 = larguras de pico na linha de base dos dois picos vizinhos, respectivamente

O valor R deve ser $\leq 1,0$. Se $R < 1,0$, enxaguar o capilar com as seqüências de lavagem/enxágüe; se o problema persiste, substituir o tampão antigo por Tampão de Operação recentemente preparado ou substituir o capilar. Para a última injeção de Adequabilidade de sistema, o último pico (GlcNAc) deve ter um fator de configuração $< 1,4$ usando a seguinte fórmula:

$$T = W_{0,85}/2f$$

onde:

10 T = fator de configuração

$W_{0,85}$ = largura de pico a 5% da altura

f = largura do pico frontal no pico máximo

Se $T \leq 1,4$, enxaguar o capilar com as seqüências de lavagem/enxágüe; se o problema persiste, substituir o tampão antigo por tampão de operação recentemente preparado ou substituir o capilar.

15

As injeções repetidas mostram aos seguintes valores exemplificativos:

- Proporção de área de pico de GlcNAc vs. ManNAc: RSD $\leq 10\%$ (calculada na etapa 7,1)

20

- Tempo de migração de GlcNAc deverá ser $\leq 10,0$ minutos

- Perfil deverá ser equivalente à Figura 81, onde os três picos

são observados

e o padrão interno (ManNAc) é o pico de número 2.

Se qualquer um dos valores exemplificativos acima não é atingido antes de testagem das amostras, primeiro aumentar a tensão se o tempo de migração de GlcNAc é maior do que 10,0 minutos. Em seguida, se a proporção de área de pico é $> 10\%$, preparar tampão de CE fresco tendo certeza de seu pH ou substituir o capilar. Após ajuste do instrumento, repetir injeções de Adequabilidade de Sistema. Quando de análise do perfil de pico, se uma diminuição significativa na altura de pico de ManNac ocorre, verificar se determinados cabos de fibra óptica no módulo de LIF não estão mal alinhados.

30

- Determinar o RSD percentual para o padrão monossacarídico através de comparação da proporção de áreas de pico dos componentes do padrão interno e padrão de monossacarídeo. Dividir a área de pico para cada componente monossacarídico pela área de pico do padrão interno para cada injeção de padrão de monossacarídeo. Calcular o RSD percentual para GalNAc e GlcNAc para os dois padrões entre as faixas. O RSD deverá ser \leq 10%. Se esse valor médio exemplificativo não é obtido, então, o capilar deverá ser enxaguado ou substituído conforme acima.

Cálculos

- 10 Calcular a Proporção de área de pico de GalNAc e GlcNAc com relação ao padrão interno (ManNAc). Usado sobre injeções repetidas dos primeiros quatro Padrões de Adequabilidade de sistema de modo a ir de encontro aos valores exemplificativos acima e realizar os mesmos cálculos sobre todos os Padrões de Adequabilidade de sistema injetados antes e após amostra(s) entre faixas.

Proporção de área de pico = Dividir a área de pico para cada componente de monossacarídeo (GlcNAc, GalNAc) pela área de pico do padrão interno (ManNAc) para cada injeção de Padrão de Adequabilidade de Sistema.

- 20
$$\text{Proporção de área de pico} = \frac{\text{área de pico de monossacarídeo}}{\text{Área de pico de ManNAc}}$$

Calcular uma média das proporções de área de pico para GlcNAc e GalNAc nos Padrões de Adequabilidade de sistema. Calcular também um desvio padrão (S.D.) e desvio padrão relativo percentual (RSD %)

- 25 **Valores exemplificativos:** RSD para a área de pico

Proporção de GlcNAc \leq 10%.

Dois Padrões de Adequabilidade de sistema entre as faixas injetados antes e após

- amostra(s): RSD percentual para a proporção de área de pico de GlcNAc e GalNAc \leq 10%.

Se esse valor exemplificativo médio não é obtido (RSD > 10%), então, o capilar precisa ser re-enxaguado com os procedimentos de enxá-

güe e aquelas amostras e padrões de monossacarídeo entre as faixas precisam ser operadas novamente. Se o valor exemplificativo médio ainda não é obtido, substituir o capilar e enxágüe. Operar as amostras e padrões de monossacarídeo entre as faixas novamente.

$$\text{Desvio padrão} = \sqrt{\frac{n\sum x^2 - (\sum x)^2}{n(n-1)}}$$

5 onde:

n = número de medições na amostra

x = medições individuais

RSD % = desvio padrão x 100

área de pico média medida

10 **Cálculo da proporção molar de GalNAc/Proteína:**

$$R_{\text{GalNAc}} = \frac{A_{\text{GalNAc}} \times A_{\text{ManNAc0}} \times V_{\text{GalNAc0}} \times C_{\text{GalNAc0}} \times MW_{\text{Abatacept}}}{A_{\text{ManNAc}} \times A_{\text{GalNAc0}} \times V_p \times C_p \times MW_{\text{GlcNAc}}}$$

onde:

R_{GalNAc} = proporção molar de GalNAc vs. proteína

A_{GalNAc} = área de pico (\square V.sec) de GalNAc na amostra

A_{ManNAc} = área de pico (\square V.sec) de ManNAc na amostra

15 A_{ManNAc0} = área de pico (\square V.sec) média de ManNAc em padrão de monossacarídeo

A_{GalNAc0} = área de pico (\square V.sec) média de GalNAc em padrão de monossacarídeo

20 V_{GalNAc0} = volume de GalNAc contido em solução de trabalho de monossacarídeo usada para hidrólise (em \square L)

V_p = volume de amostra de proteína usada para hidrólise (em μ L)

C_p = concentração de amostra de proteína usada para hidrólise (em mg/mL)

25 $MW_{\text{Abatacept}}$ = Peso molecular de Material de Referência Abatacept conforme o Certificado de Análise (COA)

MW_{GlcNAc} = Peso molecular de GalNAc (221,2 daltos)

Padroes entre faixas

Quando de calculo das proporoes molares de material de C-TLA4-Ig e amostras, usar todos os oito Padroes de Adequabilidade de sistema entre as faixas. Calcular as medias das reas de pico para incluso
5 nessa equaao. Essa deve ser usada para as primeiras tres amostras. Para todas as outras amostras, sempre usar a rea media de pico dos proximos quatro padroes de monossacardeo entre as faixas e os quatro padroes anteriores de monossacardeo entre as faixas para calculos da proporao molar.
10 lar.

Calculo da proporao molar de GlcNAc/Protena

$$R_{\text{GlcNAc}} = \frac{A_{\text{GlcNAc}} \times A_{\text{ManNAc0}} \times V_{\text{GlcNAc0}} \times C_{\text{GlcNAc0}} \times MW_{\text{CTLA4-Ig}}}{A_{\text{ManNAc}} \times A_{\text{GlcNAc0}} \times V_p \times C_p \times MW_{\text{GlcNAc}}}$$

onde:

R_{GlcNAc} = proporao molar de GlcNAc vs. protena

A_{GlcNAc} = rea de pico (\square V.sec) de GlcNAc na amostra

15 A_{ManNAc} = rea de pico (\square V.sec) de ManNAc na amostra

A_{ManNAc0} = rea de pico (\square V.sec) media de ManNAc em padro de monossacardeo

A_{GlcNAc0} = rea de pico (\square V.sec) media de GlcNAc em padro de monossacardeo

20 V_{GlcNAc0} = volume de GlcNAc contido em soluao de trabalho de monossacardeo usada para hidrlise (em \square L)

C_{GlcNAc0} = concentraao de GlcNAc contido em soluao de trabalho de monossacardeo usada para hidrlise (em mg/mL)

25 V_p = volume de amostra de protena usada para hidrlise (em μ L)

C_p = concentraao de amostra de protena usada para hidrlise (em mg/mL)

$MW_{\text{CTLA4-Ig}}$ = Peso molecular de Material de Referncia de C-TLA4-Ig

MW_{GlcNAc} = Peso molecular de GlcNAc (221,2 daltos)

Valores exemplificativos. O RSD percentual para as duas proporoes de rea de pico para Padro de Adequabilidade de Sistema amino entre as faixas no dever exceder a 10%. A proporo molar mdia para amino monossacardeos no Material de Referncia dever ser dentro da faixas especificadas na tabela diretamente abaixo. Para cada componente, o RSD % para os quatro resultados (injeo em duplicata de preparados em duplicata) deve ser $\leq 25\%$.

Tabela - Faixa de proporo molar de Material de Referncia de CTLA4-Ig

Monossacardeo	Faixa
GalNAc	2,0-3,2
GlcNAc	18-32

Exemplo 17: Determinao de proporo molar de aminomonossacardeos (GalNAc e GlcNAc) atravs de eletroforese capilar (CE)

Em uma modalidade, a composio de CTLA4-Ig tem a caracterstica de ter de cerca de 15-35 moles de GlcNAc / mol de protena e de cerca de 1,7-3,6 moles de GalNAc / mole protena. O exemplo a seguir descreve um mtodo de determinao dessas proporo molares.

Reagentes: Soluo de hidrlise (HCl a 4N); Soluo de Derivatizao I (cido 8-amino-1,3,6-tri-sulfnico a 0,1M, sal de trissdio (APTS) soluo aquosa); Soluo de Derivatizao II (NaBH_3CN a 0,25 M em cido actico a 1M); Tampo de re-acetilao (bicarbonato de sdio a 25 mM, pH9,5); Tampo de Operao (tetraborato de sdio a 60 \pm 5 mM, pH de 9,25); Soluo de enxge de capilar (NaOH a 1N; HCl a 1N; metanol a 80%); Soluo de estoque de Padro de Monossacardeo de GalNAc, GlcNAc e ManNAc em uma concentrao de 5 mg/ml; Soluo de trabalho de monossacardeo I: Soluo de trabalho de padro interno  uma diluio a 100 vezes de soluo de estoque de ManNAc; Soluo de trabalho de monossacardeo II: Soluo de Trabalho Padro de Mistura Amino, uma diluio a 100 vezes de soluo de estoque de GalNAc e GlcNAc.

Instrumentação: O sistema de CE é Beckman P/ACE MDQ CE System; Detector: sistema de detecção induzido a laser Beckman (LIF) acoplado com P/ACE MDQ; capilar não revestido (d.i. de 25 μm , d.e. de 360 μm) comprimento total de 27-31 cm para acomodar P/ACE MDQ.

5 **Condições de operação do capilar de eletroforese:** Tampão de Operação (tetraborato de sódio a 60 mM, pH de 9,25); Temperatura de cartucho do capilar: 25°C; Tensão: 25-30 kV, modo positivo; Condição do detector: Detector LIF, excitação a 488 nm, emissão a 520 nm; Injeção de amostra: modo de injeção sob pressão, 20s a 0,5PSI; Tempo de operação: 10
10 min; Armazenamento de amostra: 10°C.

Hidrólise: 10 μL de solução de trabalho de ManNAc e 200 μL de HCl a 4N foram misturados para fazer o sistema de placebo. 10 μL de solução de trabalho de ManNAc e 10 μL de Solução Padrão de Mistura Amino foram misturados com 200 μL de HCl a 4N para fazer o Padrão de monosacarídeo. 10 μL de solução de trabalho de ManNAc e 10 μL de dímero de
15 CTLA4-Ig (aproximadamente 1 mg/ml) foram misturados com 200 μL de HCl a 4N para fazer a amostra de teste. Todos os tubos foram submetidos a turbilhamento durante 10 seg e centrifugados durante 10 seg, seguido por incubação a 95°C durante 6 horas. Após a etapa de hidrólise, as amostras
20 foram colocadas a -20°C durante 10 min para esfriar. As amostras foram centrifugadas durante 10 seg e evaporadas até secagem em um SpeedVac.

Re-acetilação: Amostras hidrolisadas e secas foram reconstituídas com 100 μL de água com grau para HPLC. As amostras reconstituídas foram re-acetiladas através da adição de 10 μL de tampão de re-N-
25 acetilação M6 (Glyko) e 4 μL de reagente de re-acetilação M3 (Glyko), seguido por mistura e com incubação sobre gelo (30 min). As amostras foram centrifugadas durante 10 seg e evaporadas até secagem em um SpeedVac.

Derivatização: Amostras reconstituídas (100 μL de água com grau para HPLC) foram equilibradas 55°C, seguido pela adição de 10 μL de
30 Solução de Derivatização I, uma rápida mistura e adição de 5 μL de Solução de Derivatização II. As amostras foram carregadas em uma centrífuga pré-aquecida e incubadas durante 3 horas a 55°C enquanto centrifugava a 2000

rpm.

Injeção de CE: O volume final das amostras após derivatização foi levado para 100 μL através da adição de água com grau para HPLC e 10 μL de amostras foram transferidos para um micro frasco para CE com 190 μL água com grau para HPLC. Antes de injeções de amostra, o cartucho de CE foi enxaguado extensivamente com água com grau para HPLC (tempo de operação de 1-3 min), seguido por um enxágue de equilíbrio com tampão de Operação (tempo de operação de 5 min). Após o enxágue inicial, padrões de monossacarídeo e amostras para análise foram injetados no cartucho de CE (tempo de operação de 10 min). Após a operação de injeção de cada padrão ou amostra de teste, o cartucho de CE foi enxaguado e equilibrado com água com grau para HPLC e tampão de Operação. O eletroferograma da Adequabilidade de sistema deverá ser similar à FIG. 30.

Cálculos:

15 Calcular a proporção de área de pico de GalNAc e GLCNAc com relação ao padrão interno ManNAc.

Proporção de área de pico = área de pico de monossacarídeo (GalNAc ou GlcNAc)/área de pico de ManNAc

em que o desvio padrão relativo (RSD) para a proporção de área de pico é igual ou menor do que 10%.

20 Calcular a proporção monossacarídeo (por exemplo, GalNAc) para proteína de CTLA4-Ig:

Proporção_{GalNAc} = $(A_{\text{GalNAc}} \times A_{\text{ManNAcO}} \times V_{\text{GalNAcO}} \times C_{\text{GalNAcO}} \times \text{MW}_{\text{dímero de CTLA4-Ig}}) / (A_{\text{ManNAc}} \times A_{\text{GalNAcO}} \times V_p \times C_p \times \text{MW}_{\text{GalNAc}})$

25 Proporção_{GalNAc} = proporção molar de GalNAc versus proteína

A_{GalNAc} = área de pico ($\square\text{V}\cdot\text{seg}$) de GalNAc na amostra

A_{ManNAc} = área de pico ($\square\text{V}\cdot\text{seg}$) de ManNAc na amostra

A_{ManNAcO} = área média de pico ($\square\text{V}\cdot\text{seg}$) de ManNAc no padrão de monossacarídeo

30 A_{GalNAcO} = área média de pico ($\square\text{V}\cdot\text{seg}$) de GalNAc no padrão de monossacarídeo

V_{GalNAcO} = volume de GalNAc contido em solução de trabalho de

monossacarídeo usada para hidrólise (em \square L)

C_{GalNAcO} = concentração de GalNAc contido em solução de trabalho de monossacarídeo usada para hidrólise (em mg/ml)

5 V_p = volume de amostra de proteína usada para hidrólise (em μ L)

C_p = concentração de amostra de proteína usada para hidrólise (em mg/ml)

$MW_{\text{CTLA4-Ig}}$ = Peso molecular de dímero de CTLA4-Ig

MW_{GalNAc} = 221,2 dáltons.

10 **Tabela 18:** Proporção molar média de Monossacarídeo para moléculas ou dímeros de CTLA4-Ig

MONOSSACARÍDEO	FAIXA
GalNAc	2,0-3,2
GlcNAc	18-32

Exemplo 18: Determinação de proporção molar de monossacarídeos neutros (manose, fucose e galactose) através de eletroforese capilar (CE)

15 **Reagentes:** Solução de hidrólise (ácido trifluoroacético a 2M (TFA)); Solução de Derivatização I (ácido 8-amino-1,3,6-tri-sulfônico a 0,1M, sal de trissódio (APTS) solução aquosa); Solução de Derivatização II (Na-BH₃CN a 0,25M em ácido acético a 1M); Tampão de Operação (tetraborato de sódio a 60 \square 5 mM, pH9,25); Soluções de enxágüe de capilar (NaOH a 20 1N; HCl a 1N; metanol a 80%); Soluções de estoque de Padrão de Monossacarídeo de manose (Man), fucose (Fuc), galactose (Gal) e xilose (Xyl) em uma concentração de 5 mg/ml; Solução de trabalho de monossacarídeo I: Solução de trabalho de padrão interno é 100 vezes diluição de solução de 25 estoque de Xyl; Solução de trabalho de monossacarídeo II: Solução de trabalho padrão de mistura neutra, 100 vezes diluição de soluções de estoque de Man, Fuc e Gal.

Instrumentação: O sistema de CE é Beckman P/ACE MDQ CE System; Detector: Sistema de detecção induzida a laser Beckman (LIF) acoplado com P/ACE MDQ); Capilar não revestido (d.i. de 25 μ m, d.e. de 360

µm) comprimento total de 27-31 cm para acomodar P/ACE MDQ.

Condições de operação do capilar de eletroforese: Tampão de Operação (tetraborato de sódio a 60 mM, pH de 9,25); Temperatura de cartucho do capilar: 25°C; Tensão: 25-30 kV, modo positivo; Condição do detector: Detector LIF, excitação a 488 nm, emissão a 520 nm; Injeção de amostra: modo de injeção sob pressão, 20s a 0,5 PSI; Tempo de operação: 10 min; Armazenamento de amostra: 10°C.

Hidrólise: 10 µL de Solução de trabalho de xilose e 200 µL de TFA a 2M foram misturados para fazer o sistema de placebo. 10 µL de Solução de trabalho de xilose e 10 µL de Solução de padrão de mistura neutra foram misturados com 200 µL de TFA a 2M para fazer o Padrão de monossacarídeo. 10 µL de Solução de trabalho de xilose e 10 µL de dímero de C-TLA4-Ig (aproximadamente 1 mg/ml) foram misturados com 200 µL de TFA a 2M para fazer a amostra de teste. Todos os tubos foram submetidos a turbilhamento durante 10 seg e centrifugados durante 10 seg, seguido por incubação a 95°C durante 6 horas. Após a etapa de hidrólise, as amostras foram colocadas a -20°C durante 10 min para esfriar. As amostras foram centrifugadas durante 10 seg e evaporadas até secagem em um SpeedVac.

Derivatização: Amostras foram reconstituídas com 100 µL de água com grau para HPLC e foram equilibradas 55°C, seguido pela adição de 10 µL de Solução de Derivatização I, uma rápida mistura e adição de 5 µL de Solução de Derivatização II. As amostras foram carregadas em uma centrífuga pré-aquecida e incubadas durante 3 horas a 55°C enquanto centrifugava a 2000 rpm.

Injeção de CE: O volume final das amostras após derivatização foi levado para 100 µL através da adição de água com grau para HPLC e 10 µL de amostras foram transferidos para um micro frasco para CE com 190 µL água com grau para HPLC. Antes de injeções de amostra, o cartucho de CE foi enxaguado extensivamente com água com grau para HPLC (tempo de operação de 1-3 min), seguido por um enxágue de equilíbrio com tampão de Operação (tempo de operação de 5 min). Após o enxágue inicial, padrões de monossacarídeo e amostras para análise foram injetados no cartucho de

CE (15 min tempo de operação). Após a operação de injeção de cada padrão ou amostra de teste, o cartucho de CE foi enxaguado e equilibrado com água com grau para HPLC e tampão de Operação. O eletroferograma da Adequabilidade de sistema deverá ser similar à FIG. 31.

5 **Cálculos:**

Calcular a proporção de área de pico de Man, Gal e Fuc com relação ao padrão interno Xilose.

Proporção de área de pico = área de pico de monossacarídeo (Gal, Fuc ou Man)/Área de pico de xilose

10 em que o desvio padrão relativo (RSD) para a proporção de área de pico é igual a ou menor do que 10%.

Calcular a proporção de monossacarídeo (por exemplo, Man) para proteína de CTLA4-Ig:

15
$$\text{Proporção}_{\text{Man}} = \frac{(A_{\text{Man}} \times A_{\text{XylO}} \times V_{\text{ManO}} \times C_{\text{ManO}} \times \text{MW}_{\text{dímero de CTLA4-Ig}})}{(A_{\text{Xyl}} \times A_{\text{ManO}} \times V_{\text{p}} \times C_{\text{p}} \times \text{MW}_{\text{Man}})}$$

Proporção_{Man} = proporção molar de Man versus proteína

A_{Man} = área de pico (□V.sec) de Man na amostra

A_{Xyl} = área de pico (□V.sec) de Xyl na amostra

20 A_{XylO} = área de pico (□V.sec) média de Xyl no padrão de monossacarídeo

A_{ManO} = área de pico (□V.sec) média de Man no padrão de monossacarídeo

V_{ManO} = volume de Manose contido em solução de trabalho de monossacarídeo usada para hidrólise (em □L)

25 C_{ManO} = concentração de Manose contido em solução de trabalho de monossacarídeo usada para hidrólise (em mg/ml)

V_{p} = volume de amostra de proteína usada para hidrólise (em μL)

30 C_{p} = concentração de amostra de proteína usada para hidrólise (em mg/ml)

$\text{MW}_{\text{CTLA4-Ig}}$ = Peso molecular de dímero de CTLA4-Ig

MW_{Man} = 180,2 dáltons.

Tabela 19: Proporção molar média de Monossacarídeo para moléculas ou dímeros de CTLA4-Ig

MONOSSACARÍDEO	FAIXA
Manose	10 - 20
Fucose	4,2 - 7,0
Galactose	9,2 - 17

EXEMPLO 19: PRODUÇÃO DE CTLA4^{A29YL104E}-Ig

5 CTLA4^{A29YL104E}-Ig é uma proteína de fusão geneticamente modificada, a qual consiste do domínio de ligação funcional da CTLA-4 humana modificada e do domínio Fc da imunoglobulina humana da classe IgG1. Duas substituições de aminoácido foram feitas na região de ligação a B7 do domínio de CTLA-4 (L104E e A29Y) para gerar essa molécula. Ela é compreendida de duas cadeias polipeptídicas glicosiladas de 357 aminoácidos
10 cada. Ela existe como um dímero covalente ligado através de uma ligação de dissulfeto inter-cadeia. A CTLA4^{A29YL104E}-Ig tem uma massa média de aproximadamente 91.800 Da, conforme determinado por meio de espectrometria de massa através de ionização por deabsorção a laser matriz-assistida *time-of-flight* (MALDI-TOF).

15 CTLA4^{A29YL104E}-Ig é uma forma modificada de CTLA4-Ig. A modificação consiste de mutações de ponto que resultam em duas substituições de aminoácido (L104E e A29Y). Com relação à CTLA4-Ig, a CTLA4^{A29YL104E}-Ig se liga CD80 (B7-1) com avidéz ~2 vezes aumentada e se liga a CD86 (B7-2) com avidéz ~4 vezes aumentada. A CTLA4^{A29YL104E}-Ig é aproximada-
20 mente 10 vezes mais eficaz do que o abatacept na inibição de proliferação de células T, produção de citocina e morte CD28-dependente de células alvo por células assassinas naturais. A CTLA4^{A29YL104E}-Ig causa inibição modesta de proliferação de células T B7-1-mediada, mas é acentuadamente mais potente no bloqueio proliferação de células T B7-2-mediada. Esse Exemplo
25 descreve a produção de moléculas de CTLA4^{A29YL104E}-Ig compreendendo SEQ ID NO: 4. Os métodos descritos nesse Exemplo podem ser adaptados e estendidos para a produção de outras proteínas recombinantes incluindo, mas não limitado a, proteínas secretadas tais como citocinas e outros hor-

mônios, proteínas secretadas que são membros da superfamília Ig ou compreendem uma porção de uma proteína da superfamília Ig e geralmente qualquer proteína expressa em células CHO.

Um fluxograma de processo para as etapas de cultura de CTLA4^{A29YL104E}-Ig é mostrado na FIG. 24. CTLA4^{A29YL104E}-Ig é produzida em bio-reatores de produção de 5000 L com um volume de trabalho aproximado de 4000 L. Um lote de Substância de Fármaco é produzido a partir de um único bio-reator de produção derivado de um único frasco de um banco de célula. O processo de produção envolve três estágios consistindo de expansão de inóculo, cultura de células de produção e purificação a jusante. O estágio de expansão de inóculo é conduzido usando meio isento de componente animal. O estágio de cultura de células de produção é também realizado em meio isento de componente animal, com exceção do uso de D-galactose.

Meios de cultura de célula. Todos os meios são preparados em vasos de meio limpos do tamanho apropriado e esterilizados através de filtração. A composição do meio utilizado para expansão de inóculo é apresentada na tabela abaixo.

Meio basal de crescimento celular de inóculo

Componente	Concentração
CD-CHO, 25x Concentrado solúvel em ácido I	40 mL/L
CD-CHO, 25x Concentrado solúvel em ácido II	40 mL/L
CD-CHO, 25x Sais de concentrado I	40 mL/L
CD-CHO, 25x Sais de concentrado II	40 mL/L
L-glutamina	0,88 g/L
Bicarbonato de sódio	2,22 g/L
Insulina humana recombinante (10 mg/mL)	0,1 mL/L
Metotrexato (20 mM)	0,05 mL/L

Meio basal de crescimento de célula em bio-reator de produção e cultura

Componente	Concentração
CD-CHO, 25x Concentrado solúvel em ácido I	40 mL/L
CD-CHO, 25x Concentrado solúvel em ácido II	40 mL/L
CD-CHO, 25x Sais de concentrado I	40 mL/L
CD-CHO, 25x Sais de concentrado II	40 mL/L
L-glutamina	1,32 g/L
Bicarbonato de sódio	2,22 g/L
Insulina humana recombinante (10 mg/mL)	0,1 mL/L

Meio de alimentação no bio-reator de produção

Componente	Concentração
Pó de eRDF ^a	25,2 g/L
Dextrose	30,9 g/L
D-galactose	12,5 g/L
L-glutamina	4,1 g/L
Insulina humana recombinante (10 mg/mL)	1,0 mL/L
Sulfato de dextrana (adicionado como uma alimentação em bolo)	50 mg/L

Expansão de inóculo

Um frasco congelado do banco de células é descongelado em uma temperatura controlada e centrifugado para remover o meio crioprotetor. As células são resuspensas em meio de inóculo e recuperadas em um T-frasco. Uma viabilidade celular mínima após descongelamento de 80% é um valor exemplificativo. A temperatura e dióxido de carbono são controlados durante a incubação etapa no T-frasco. O T-frasco é incubado até que um número de células viáveis de $1,0 \times 10^7$ células seja obtido e os conteúdos são transferidos para um frasco de agitação. A cultura é expandida através de uma série de frascos de agitação para obter o volume de inóculo requerido. A faixa de densidade de cultura para as passagens no frasco de agitação é de $1,0$ a $3,0 \times 10^5$ células viáveis/mL. A temperatura, dióxido de carbono e velocidades do agitador são controlados durante a etapa de incubação em frasco de agitação. As culturas no frasco de agitação são empacadas em um vaso de transferência de inóculo estéril quando se atinge uma densidade de células viáveis faixa de $1,5$ a $3,0 \times 10^6$ células/mL. Aproximadamente 20 litros da etapa de expansão de inóculo em frasco de agitação final são transferidos para o bio-reator de cultura de 140 L para obter uma faixa inicial de densidade celular de $0,2$ a $1,0 \times 10^6$ células viáveis/mL.

Operação do bio-reator de cultura

um bio-reator de cultura de 140 L com um volume de trabalho de aproximadamente 90 litros é operado no modo em batelada. A temperatura, pH, pressão e concentração de oxigênio dissolvido no bio-reator de cultura de 140 L são monitorados e controlados usando um sistema de controle distribuído (DCS). As amostras são obtidas diariamente do bio-reator de cultura

de 140 L para monitorar o crescimento celular. A faixa de densidade de cultura do bio-reator de cultura de 140 L é de 0,2 a $1,0 \times 10^6$ células viáveis/mL. O bio-reator de cultura de 140 L é usado para inocular um bio-reator de cultura de 1100 L quando uma densidade de células viáveis de $\square 1,5 \times 10^6$ células/mL é obtida. A duração da etapa no bio-reator de cultura de 140 L é de aproximadamente 3 dias. A densidade alvo inicial de células viáveis no bio-reator de cultura de 1100 L é de 0,4 a $1,5 \times 10^6$ células viáveis/mL.

O bio-reator de produção de 1100 L contém um volume de cultura inicial de 260 litros. O bio-reator de produção de 1100 L é operado no modo em batelada. A temperatura, pH, pressão e concentração de oxigênio dissolvido no bio-reator de cultura de 1100 L são monitorados e controlados usando um DCS. O volume da cultura é aumentado para 900 litros com meio basal quando a densidade de células viáveis atingiu $\square 1,5 \times 10^6$ células/mL. As amostras são obtidas diariamente do bio-reator de cultura de 1100 L para monitorar o crescimento celular. O bio-reator de produção de 1100 L é usado para inocular um bio-reator de produção de 5000 L quando uma densidade de células viáveis de $\square 2,0 \times 10^6$ células/mL é obtida. A duração da etapa no bio-reator de cultura de 1100 L é de aproximadamente 4 dias. A densidade alvo inicial de células viáveis no bio-reator de produção de 5000 L é de 0,4 a $1,5 \times 10^6$ células viáveis/mL.

Operação do bio-reator de produção

O bio-reator de produção de 5000 L contém um volume de cultura inicial de 3000 litros. O bio-reator de produção de 5000 L é operado em um modo de alimentação em batelada com temperatura, pH, pressão e concentração de oxigênio dissolvido monitorados e controlados usando um DCS. Um bolo de sulfato de dextrana é adicionado à cultura a aproximadamente 72 horas. Durante a operação de um bio-reator de produção, o ponto de ajuste da temperatura de cultura é desviado de 37° para 34°C a 144 \pm 8 horas. O desvio de temperatura e a adição de sulfato de dextrana são realizados para prolongar a duração de alta viabilidade celular na etapa com o bio-reator de produção de 5000 L. As amostras são obtidas do bio-reator para monitorar o crescimento e biabilidade celular, concentração de glicose,

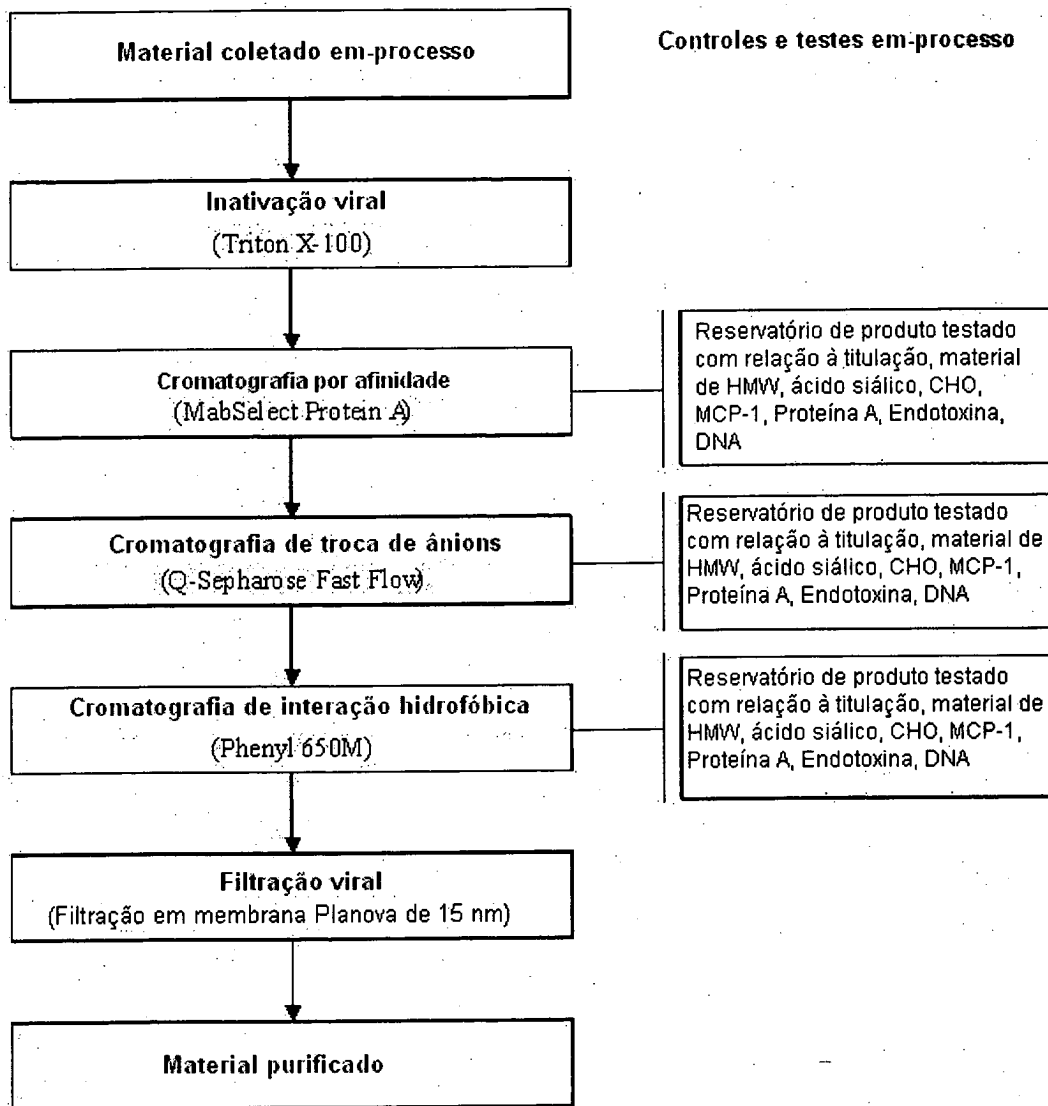
lactato e amônia. As amostras são também testadas com relação à concentração de CTLA4^{A29YL104E}-Ig e proporção molar de ácido siálico para proteína de CTLA4^{A29YL104E}-Ig. o meio de alimentação é adicionado ao bio-reator para manter uma concentração de glicose desejada. O critério de coleta primário para um bio-reator de produção é a proporção molar de ácido siálico para proteína de CTLA4^{A29YL104E}-Ig. um bio-reator de produção é coletado em uma proporção molar alvo de ácido siálico para proteína de CTLA4^{A29YL104E}-Ig de 1:6. a duração da etapa com o bio-reator de produção de 5000 L é de aproximadamente 14 dias. O volume de coleta do bio-reator de produção de 5000 L é de aproximadamente 4000 litros.

Remoção de célula e Concentração de produto

As células são removidas do caldo de cultura através de microfiltração em fluxo tangencial usando membranas de 0,65 μ m. o permeado da microfiltração é concentrado através de ultrafiltração em fluxo tangencial usando membranas com um corte de peso molecular nominal de 30 kDa (NMWCO). a pressão transmembrana e taxas de fluxo são controladas durante as etapas de microfiltração e ultrafiltração. o concentrado é, então, passado através de uma série de filtros de membrana, com uma filtração final através de um filtro de uso único de 0,2 μ m. O pH do concentrado é ajustado para 8,0 através da adição de uma solução de Tris a 0,5 M. os filtros de microfiltração e ultrafiltração são de uso múltiplo. Os filtros de microfiltração são limpos com hipoclorito de sódio e Triton X-100 e armazenados em ácido fosfórico. os filtros de ultrafiltração são limpos com hipoclorito de sódio e hidróxido de sódio e, então, armazenados em hidróxido de sódio.

EXEMPLO 20: PURIFICAÇÃO DE CTLA4^{A29YL104E}-Ig RECOMBINANTE

Exemplo 20-A: Um exemplo de um processo de purificação de CTLA4^{A29YL104E}-Ig é mostrado no fluxograma a seguir e a descrição de um processo de purificação é proporcionada através desse Exemplo.



Inativação viral

O pH do material coletado concentrado clarificado é ajustado para 8,0 através da adição de uma solução de Tris a 0,5 M. Agentes virais

- 5 adventícios potenciais são inativados através da adição de Triton X-100 a 20% para uma concentração final de 0,5% (v/v). A solução de proteína tratada com Triton X-100 é misturada durante □ 2 horas.

Cromatografia por afinidade

- 10 Cromatografia por afinidade usando uma resina para coluna MabSelect Protein A (GE Healthcare, formalmente conhecida como Amersham Biosciences) é usada para capturar a proteína de CTLA4^{A29YL104E}-Ig do material em-processo da etapa de inativação viral e separar a proteína de belatacept da maioria das impurezas.

A coluna MabSelect Protein A é equilibrada com um tampão de NaH_2PO_4 a 25 mM, NaCl a 150 mM, pH de 7,5. A capacidade de ligação dinâmica da resina de afinidade é 25 g de proteína de CTLA4^{A29YL104E}-Ig por litro de resina em uma velocidade linear de 350 cm/hora. O leito da coluna de 157 L é capaz de ligação de aproximadamente 3,9 kg de proteína de CTLA4^{A29YL104E}-Ig.

O material em-processo tratado com Triton X-100 é aplicado à coluna MabSelect Protein A e a coluna é lavada com um mínimo de 3 volumes de coluna (CV) de tampão de equilíbrio para remover impurezas fracamente retidas. Essas impurezas incluem a proteína 1 quimiotática de monócito de citocina (MCP-1) e Triton X-100. A proteína de CTLA4^{A29YL104E}-Ig é, então, eluída da coluna com um tampão de glicina a 250 mM, pH de 3,0. A proteína de CTLA4^{A29YL104E}-Ig elui como um pico estreito em aproximadamente 2 a 3 CV de tampão de eluição e é coletada em um tanque contendo tampão de HEPES a 2 M, pH de 7,5 de forma a aumentar o pH rapidamente e, desse modo, minimizar a formação de espécies de elevado peso molecular de belatacept (HMW).

Cromatografia de troca de ânions

Cromatografia de troca de ânions usando resina Q-Sepharose Fast Flow (QFF) (GE Healthcare) é usada primariamente para enriquecer a quantidade de espécies mais altamente sialiladas da proteína de CTLA4^{A29YL104E}-Ig. O reservatório do produto belatacept pH-ajustado da coluna MabSelect Protein A é diluída aproximadamente duas vezes com água para injeção (WFI) antes de aplicação à coluna QFF.

A coluna de QFF é equilibrada com um tampão de HEPES a 50 mM, NaCl a 50 mM, pH de 7,0. O reservatório de produto da etapa em MabSelect Protein A com condutividade ajustada é aplicado à coluna QFF e a coluna é lavada com um mínimo de 3 CV de tampão de equilíbrio para remover impurezas fracamente ligadas. A coluna é, então, lavada com tampão de HEPES a 50 mM, NaCl a 140 mM, pH de 7,0, para remover espécies de proteína de CTLA4^{A29YL104E}-Ig com baixo teor de ácido siálico. As espécies mais altamente sialiladas da proteína de CTLA4^{A29YL104E}-Ig são subsequen-

temente eluídas da coluna usando □ 5 CV de tampão de HEPES a 50 mM, NaCl a 200 mM, pH de 7,0.

Cromatografia de interação hidrofóbica

Cromatografia de interação hidrofóbica (HIC) usando resina Toyopearl Phenyl 650M (Tosoh Biosciences) é usada primariamente para re-
5 duzir a quantidade espécies de HMW de CTLA4^{A29YL104E}-Ig no reservatório de produto da etapa de cromatografia QFF. Antes de aplicação à coluna de HIC, o reservatório de produto da etapa de cromatografia QFF é diluído u-
sando tampão de HEPES a 50 mM, pH de 7,0 e tampão de HEPES a 50
10 mM, sulfato de amônio a 3,6 M, pH de 7,0 para obter uma condutividade de aproximadamente 135 mS/cm e a concentração de CTLA4^{A29YL104E}-Ig de □ 1 g/L no reservatório de produto de QFF.

A coluna de HIC é equilibrada com um tampão de HEPES a 50 mM, sulfato de amônio a 1,2 M, pH de 7,0. O reservatório de produto de C-
15 TLA4^{A29YL104E}-Ig com concentração e condutividade ajustadas da etapa de cromatografia QFF é aplicada à coluna. A coluna é, então, lavada com um tampão de HEPES a 50 mM, sulfato de amônio a 1,2 M, pH de 7,0 para re-
mover impurezas fracamente ligadas. A proteína de CTLA4^{A29YL104E}-Ig é elu-
ídas da coluna de HIC usando um tampão de HEPES a 50 mM, sulfato de
20 amônio a 0,55 M, pH de 7,0.

Filtração viral

Concentração e diafiltração do reservatório de produto de C-
TLA4^{A29YL104E}-Ig da etapa de HIC são obtidas através de ultrafiltração (UF). A
etapa de UF utiliza uma membrana com NMWCO de 30 kDa e um tampão
25 de NaH₂PO₄ a 25 mM, NaCl a 10 mM, pH de 7,5. A etapa de UF é seguida por uma etapa de filtração viral usando uma membrana Planova de 15 nm (Asahi Kasei). O reservatório de produto de proteína de CTLA4^{A29YL104E}-Ig é, então, ajustado para uma concentração de proteína de 25 g/L através de UF usando uma membrana com NMWCO de 30 kDa.

Sanitarização e armazenamento de coluna

A coluna de cromatografia MabSelect Protein A é sanitizada u-
sando solução tampão de NaOH a 0,1 N, lavada com NaH₂PO₄ a 25 mM,

NaCl a 150 mM, pH de 7,5 para diminuir o pH e, então, armazenada em etanol a 20% a 20 °C. A coluna de cromatografia QFF é sanitizada com Solução de NaOH a 1 N e armazenada em solução de NaOH a 0,1 N em temperatura ambiente. A coluna de HIC é sanitizada com solução de NaOH a 0,1 N, lavada com etanol a 20% e armazenada em etanol a 20% em temperatura ambiente.

Exemplo 20-B: Um outro exemplo de tal método de purificação segue:

Inativação viral: O pH do material coletado concentrado clarificado é ajustado para 8,0 através da adição de uma solução de Tris a 0,5 M. Agentes virais adventícios potenciais são inativados através da adição de Triton X-100 a 20% para uma concentração final de 0,5% (v/v). A solução de proteína tratada com Triton X-100 é misturada durante 2 horas.

Cromatografia por afinidade em proteína A para purificação de CTLA4^{A29YL104E}-Ig: Cromatografia por afinidade usando uma coluna com resina MabSelect Protein A (GE Healthcare, formalmente conhecida como Amersham Biosciences) é usada para capturar CTLA4^{A29YL104E}-Ig do material em-processo da etapa de inativação viral e separar CTLA4^{A29YL104E}-Ig da maioria das impurezas.

Uma coluna com diâmetro interno de 140 cm é empacotada com resina MabSelect PrA para uma altura de 18 a 25 cm, representando um volume de cerca de 339 a 372 L. A coluna é qualificada para uso determinando HETP e A_s da coluna empacotada. Uma HETP de 0,02 a 0,08 cm e uma A_s de 0,8 a 1,2 são empregadas para qualificação da coluna.

A operação na coluna MabSelect PrA é realizada em temperatura ambiente. O reservatório de produto da inativação viral é carregado sobre a coluna MabSelect PrA equilibrada. A etapa em MabSelect PrA é operada em uma taxa de fluxo máxima de 26,7 L/min e uma pressão de operação de 13 psig. A carga máxima de proteína de CTLA4^{A29YL104E}-Ig aplicada à coluna MabSelect PrA é de 25 g de proteína de CTLA4^{A29YL104E}-Ig por litro de resina em uma velocidade linear de 350 cm/hora. O leito da coluna é capaz de ligação de aproximadamente 3,9 kg de proteína de CTLA4^{A29YL104E}-Ig.

A coluna MabSelect PrA é equilibrada com um tampão de

NaH₂PO₄ a 25 mM, NaCl a 150 mM, pH de 7,5. Equilíbrio está completo quando um mínimo de 3 CV de tampão de equilíbrio passou através da coluna e os valores de pH e condutividade dos efluentes estão entre 7,3 a 7,7 e 14,5 a 17,5 mS/cm, respectivamente.

5 O material em-processo tratado com Triton X-100 é aplicado à coluna MabSelect PrA equilibrada. A coluna é lavada com um mínimo de 3 CV de um tampão de NaH₂PO₄ a 25 mM, NaCl a 150 mM, Triton X-100 a 0,5%, pH de 7,5 para remover impurezas fracamente retidas da coluna MabSelect PrA. Essas impurezas incluem a proteína 1 quimiotática de monócito de cito-

10 cina (MCP-1) e Triton X-100. Subseqüentes etapas de lavagem são realizadas usando um tampão de NaH₂PO₄ a 25 mM, NaCl a 150 mM, pH de 7,5 para remover o Triton X-100 residual da coluna MabSelect PrA.

A CTLA4^{A29YL104E}-Ig é eluída da coluna de cromatografia MabSelect PrA com um tampão de glicina a 250 mM, pH de 3,0. O eluato é desviado para um vaso de coleta quando a A₂₈₀ aumenta para \square 0,2 AU acima da

15 linha de base. O efluente da coluna é filtrado através de um filtro de acetato de celulose de 0,2 \square m em um vaso de coleta equipado com um agitador. O eluato é coletado até que a A₂₈₀ da borda guia do pico de eluição diminua para um valor de \square 0,2 AU. A CTLA4^{A29YL104E}-Ig elui como um pico estreito

20 em aproximadamente 2 a 3 CV de tampão de eluição. O pH do eluato empocado é ajustado para um pH de 7,5 \square 0,2 com um tampão de HEPES a 2 M, pH de 7,5 de forma a aumentar o pH rapidamente e, desse modo, minimizar a formação de espécies de elevado peso molecular de CTLA4^{A29YL104E}-Ig (HMW). O reservatório de produto da etapa de cromatografia MabSelect PrA

25 é mantido em temperatura ambiente durante um máximo de 5 dias. O reservatório de produto pode ser esfriado para armazenamento; o perfil de estabilidade da CTLA4^{A29YL104E}-Ig era o mesmo a 5°C e 22°C. O produto pode ser armazenado durante até 5 dias.

O produto de dímero de CTLA4^{A29YL104E}-Ig com uma proporção

30 molar de moles de ácido siálico para moles de proteína de CTLA4^{A29YL104E}-Ig que é cerca de 6 ou de cerca de 5,2 a cerca de 7,6, é coletado.

Cromatografia de troca de ânions QFF para purificação de

CTLA4^{A29YL104E}-Ig: Cromatografia de troca de ânions usando resina Q-Sepharose Fast Flow (QFF) (GE Healthcare) é usada primariamente para enriquecer a quantidade de espécies mais altamente sialiladas de CTLA4^{A29YL104E}-Ig, bem como reduzir os níveis residuais de proteína A. O reservatório de produto de CTLA4^{A29YL104E}-Ig com pH ajustado da coluna MabSelect Protein A é diluído aproximadamente duas vezes com água para injeção (WFI) antes de aplicação à coluna de QFF.

Uma coluna com diâmetro interno de 80 cm é empacotada com resina QFF para uma altura de 27 a 35 cm, representando um volume de cerca de 136 a 176 L. A coluna é qualificada para uso determinando a HETP e A_s da coluna empacotada. Uma HETP de 0,02 a 0,08 cm e uma assimetria (A_s) de 0,8 a 1,2 são empregadas para qualificação da coluna.

A operação na coluna de QFF é realizada em temperatura ambiente. A coluna de QFF é equilibrada com um tampão de HEPES a 50 mM, NaCl a 50 mM, pH de 7,0. O reservatório de produto da etapa em MabSelect Protein A com pH e condutividade ajustados é aplicado à coluna de QFF. A etapa QFF é operada em uma taxa de fluxo máxima de 16,4 L/min (196 cm/h) e uma pressão máxima de operação de 35 psi.

A coluna é sanitizada antes e após uso com uma solução de NaOH a 1 N. Um mínimo de 2 volumes de coluna da solução de hidróxido de sódio é passado sobre a coluna. A coluna é, então, mantida estática durante 60 a 120 minutos. A faixa de condutividade aceitável para a solução e o efluente da coluna é de 136 a 202 mS/cm.

A coluna é equilibrada com um mínimo de 5 volumes de coluna de um tampão de HEPES a 50 mM, cloreto de sódio a 50 mM, pH de 7,0. As faixas de pH e condutividade para esse tampão são 6,8 a 7,2 e 5,0 a 7,0 mS/cm, respectivamente. Essas faixas são também usadas para determinar se a coluna está equilibrada.

O reservatório de produto da etapa em MabSelect Protein A produto empoçar com pH e condutividade ajustados é aplicado à coluna de QFF e a coluna é lavada com um mínimo de 3 CV de tampão de equilíbrio para remover impurezas fracamente ligadas. A coluna é, então, lavada com tam-

pão de HEPES a 50 mM, NaCl a 135 mM, pH de 7,0, para remover espécies de CTLA4^{A29YL104E}-Ig com baixo teor de ácido siálico.

As espécies mais altamente sialiladas da CTLA4^{A29YL104E}-Ig são eluídas da coluna de cromatografia QFF usando um tampão de HEPES a 50 mM, NaCl a 200 mM, pH de 7,0. A coleta de eluato é iniciada quando o tampão de eluição é primeiro aplicado à coluna. Durante eluição, o efluente da coluna é filtrado através de um filtro de 0,2 μ m no vaso de coleta. O eluato é coletado até que a absorbância da borda guia do pico de eluição diminua para \approx 0,2 AU acima da linha de base. A CTLA4^{A29YL104E}-Ig elui da coluna usando \approx 5 CV de um tampão de HEPES a 50 mM, NaCl a 200 mM, pH de 7,0. O vaso de coleta é, então, esfriado para 2 \pm a 8°C. O tempo máximo de contenção para o reservatório de produto da etapa de cromatografia QFF a 2 \pm a 8°C é 3 dias.

Um produto de dímero de CTLA4^{A29YL104E}-Ig com uma proporção molar de moles de ácido siálico para moles de proteína de CTLA4^{A29YL104E}-Ig que é cerca de 6 ou de cerca de 5,2 a cerca de 7,6 é coletado.

HIC em Phenyl Sepharose FF para purificação de CTLA4^{A29YL104E}-Ig: Cromatografia de interação hidrofóbica (HIC) usando resina Toyopearl Phenyl 650M (Tosoh Biosciences) é usada primariamente para reduzir a quantidade espécies de HMW de CTLA4^{A29YL104E}-Ig no reservatório de produto da etapa de cromatografia QFF.

Uma coluna com diâmetro interno de 100 cm é empacotada com resina Phenyl Sepharose Phenyl 650M para uma altura de 18 a 22 cm, representando um volume de cerca de 141 a 173 L. A coluna é qualificada para uso determinando a HETP e A_s da coluna empacotada. Uma HETP de 0,02 a 0,08 cm e uma A_s de 0,8 a 1,2 são empregadas para qualificação da coluna de HIC.

A operação da coluna de HIC é realizada em temperatura ambiente. Antes de aplicação à coluna de HIC, o reservatório de produto da etapa de cromatografia QFF é diluído usando um tampão de HEPES a 50 mM, pH de 7,0 e HEPES a 50 mM, sulfato de amônio a 3,6 M, pH de 7,0 para obter uma condutividade de aproximadamente 135 mS/cm e uma concentra-

ção de CTLA4^{A29YL104E}-Ig de \square 1 g/L no reservatório de produto de QFF. A etapa de HIC é operada em uma taxa de fluxo máxima de 22,7 L/min (173 cm/h) e em uma pressão máxima de operação de 45 psi. Múltiplos ciclos da etapa de HIC podem ser empregados baseado na quantidade de C-
5 TLA4^{A29YL104E}-Ig presente no reservatório de eluato de QXL.

A coluna de HIC é primeiro sanitizada com uma solução de hidróxido de sódio a 1 N. A sanitização está completa quando 2 a 4 CV da solução de hidróxido de sódio a 1N passaram através da coluna. A coluna é, então, mantida durante 60 a 120 minutos para assegurar essa sanitização.

10 Após a etapa de sanitização, a coluna de HIC é equilibrada com um tampão de HEPES a 50 mM, sulfato de amônio a 1,2 M, pH de 7,0. O equilíbrio está completo quando um mínimo de 3 CV de tampão de equilíbrio passou através da coluna e o pH do efluente é 7,0 \square 0,3 e uma condutividade de aproximadamente 135 mS/cm.

15 O reservatório de produto de CTLA4^{A29YL104E}-Ig com concentração e condutividade ajustadas da etapa de cromatografia QFF é aplicado à coluna. A coluna é, então, lavada com um tampão de HEPES a 50 mM, sulfato de amônio a 1,2 M, pH de 7,0 para remover impurezas fracamente ligadas. A CTLA4^{A29YL104E}-Ig é eluída da coluna de HIC usando um tampão de
20 HEPES a 50 mM, sulfato de amônio a 0,55 M, pH de 7,0. Esse reservatório de produto de HIC é mantido no vaso de coleta a 2 \square a 8°C. O tempo máximo de contenção no vaso de coleta é 3 dias.

Um produto de dímero de CTLA4^{A29YL104E}-Ig com uma proporção molar de moles de ácido siálico para moles de proteína de CTLA4^{A29YL104E}-Ig
25 que é cerca de 6 ou de cerca de 5,2 a cerca de 7,6; um reservatório de material de espécies de elevado peso molecular de CTLA4^{A29YL104E}-Ig está presente a \leq 2,5%; um reservatório de material de espécies de baixo peso molecular de CTLA4^{A29YL104E}-Ig (por exemplo, monômero de CTLA4^{A29YL104E}-Ig) está presente a \leq 0,5%; e um reservatório de MCP-1 \leq 9,5 ng/mL está presente.
30

Filtração viral. Concentração e diafiltração do reservatório de produto de CTLA4^{A29YL104E}-Ig da etapa de HIC é obtida através de ultrafiltra-

ção (UF). A etapa de UF utiliza uma membrana com NMWCO de 30 kDa e um tampão de NaH₂PO₄ a 25 mM, NaCl a 10 mM, pH de 7,5. A etapa de UF é seguida por uma etapa de filtração viral usando uma membrana Planova de 15 nm (Asahi Kasei). O reservatório de produto de CTLA4^{A29YL104E}-Ig é, então, ajustado para uma concentração de proteína de 25 g/L através de UF usando uma membrana com NMWCO de 30 kDa.

O sistema Pall Filtron TFF é usado em uma etapa de concentração e diafiltração do processo de produção de CTLA4^{A29YL104E}-Ig a jusante. O objetivo dessa etapa é concentrar o reservatório de produto da etapa de cromatografia HIC para 45 a 55 g/L e trocar o tampão de eluição usado na etapa de cromatografia HIC com o tampão final usado para composições de CTLA4^{A29YL104E}-Ig. O reservatório de produto de CTLA4^{A29YL104E}-Ig concentrado é transferido através de um filtro de fluoreto de polivinilideno de 0,2 µm e para um saco de bioprocesso de 50 L.

EXEMPLO 21: ATIVIDADE BIOLÓGICA – DETERMINAÇÃO DE LIGAÇÃO BIO-ESPECÍFICA DE CTLA4^{A29YL104E}-Ig AO CO-RECEPTOR B-7IG ATRAVÉS DE RESSONÂNCIA DE PLASMÔNIO EM SUPERFÍCIE

Ressonância de plasmônio em superfície (ligação a B7)

Esse método mede a ligação de CTLA4^{A29YL104E}-Ig a um co-receptor de B7 representativo através de ressonância de plasmônio em superfície. B7Ig é imobilizado em alta densidade via grupos amino primário à superfície de um sensorchip CM5 ativado. Material de CTLA4^{A29YL104E}-Ig, Controles de qualidade e amostras são diluídos para concentrações entre 0,125 e 8 ng/mL e injetados sobre a superfície de B7Ig para gerar sensorgramas de ligação. A taxa inicial (declínio) de ligação de CTLA4^{A29YL104E}-Ig ao B7Ig imobilizado é medida sob condições de transferência de massa limitada (difusão) sobre essa superfície de B7Ig. A taxa de ligação inicial em unidades de ressonância por segundo (RU/s) se correlaciona diretamente com a concentração ativa. As taxas de ligação de amostras são convertidas em uma concentração ativa usando a curva de Padrão de Referência, onde a taxa de ligação de material de CTLA4^{A29YL104E}-Ig é plotada contra a concentração de teste. Os resultados finais são expressos como ligação percen-

tual de amostra com relação ao material de CTLA4^{A29YL104E}-Ig.

A presença da região Fc de IgG1 humana em CTLA4^{A29YL104E}-Ig foi detectada usando ressonância de plasmônio em superfície (SPR). SPR permite a medição de interações bio-específicas em tempo real. Um fragmento de anticorpo específico para a região Fc de IgG humana (anti-Fc de IgG humana de F_(ab)'₂ de cabra) foi covalentemente imobilizado sobre a superfície de um sensorchip. Ligação de amostras de CTLA4^{A29YL104E}-Ig foi detectada através de medição da resposta obtida sobre sua superfície, comparado com a superfície de um sensorchip não modificado. Os resultados, em unidades de ressonância ligadas para o processo B, Processo C e a co-mistura são comparáveis, conforme mostrado na FIG. 6 e Tabela 23.

Tabela 23. Detecção de Fc de IgG Humana em lotes de substância de fármaco de CTLA4^{A29YL104E}-Ig Usando SPR

Lote No	RU ligada a anticorpo anti-Fc	RU ligada à superfície não modificada
Lote A	1295	1
Lote B	1309	1
Co-mistura	1268	1

Ensaio de inibição de IL-2 em células humanas

O método é baseado na inibição de produção de IL-2 a partir de células T através de CTLA4^{A29YL104E}-Ig quando estimuladas com anti-CD3 e células B. Células T Jurkat, transfectadas com o gene de luciferase sob o controle do promotor de IL-2, são co-estimuladas com células Daudi B e anti-CD3 na presença de várias concentrações de CTLA4^{A29YL104E}-Ig. A co-estimulação ativa o promotor de IL-2 o qual, por sua vez, produz proteína de luciferase. O sinal luminescente resultante é medido usando um sistema de ensaio de luciferase. Nesse sistema, CTLA4^{A29YL104E}-Ig produz uma diminuição dose-dependente na atividade de luciferase.

Os resultados para o processo B Lote 000929-278, Processo C Lote 224818-2004-007 e a co-mistura Lote 55128-162 são comparáveis, conforme mostrado na Tabela 24. Os valores de EC₅₀, fatores de declínio e assíntotas máximo e mínimo são similares para todas as três amostras, den-

tro de um desvio padrão. Isso indica que CTLA4^{A29YL104E}-Ig do processo C e do processo B se comportam comparavelmente no ensaio de potência *in vitro*.

Tabela 24. Comparação de atividade de luciferase mediada pelo promotor de IL-2 Humana no bioensaio de potência *in vitro*. Parâmetros de curva de dose-resposta para Processos da invenção

Lote No.	EC ₅₀ (ng/mL)	Fator de de- clínio	Assíntota má- ximo (CPS)	Assíntota míni- mo (CPS)
Processo A	19,1 ± 1,9	-0,91 ± 0,06	85,000 ± 15,000	30,000 ± 6,000
Co-mistura	21,5 ± 2,7	-0,93 ± 0,08	88,000 ± 16,000	29,000 ± 5,000
Processo B	21,8 ± 1,4	-0,91 ± 0,09	81,000 ± 17,000	27,000 ± 7,000

Materiais:

- 5 - Sensor Chip CM5, grau certificado Biacore (Catálogo No. BR-1000-13)
- Tampão de HBS-EP BIA Certified, HEPES a 10 mM, pH de 7,4, NaCl a 150 mM, EDTA a 3,4 mM, 0,005% v/v
- Surfactant P20 Biacore (Catálogo No. BR-1001-88)
- 10 - Amine Coupling Kit BIA Certified, 115 mg de N-hidróxi-succinimida (NHS), 750 mg de hidrocloreto de 1-etil-3-(3 dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC), 10,5 mL de HCl de etanolamina Biacore (Catálogo No. BR-1000-50)
- Instrumento Biacore C com um computador PC compatível Bi-
- 15 core, (Catálogo No. BR-1100-51)
- Biacore C Control Software, conforme fornecido com o instru-
mento Biacore C, versão 1.0.1

Amine Coupling Kit BIA Certified: O kit contém um frasco de cada: 115 mg de NHS, 750 mg de EDC e 10,5 mL de etanolamina. Preparar cada frasco de acordo com as orientações dos fabricantes. Transformar em alíquotas volumes de 200 µL de soluções de NHS e EDC em frascos de plástico/vidro individuais de tamanho apropriado e tampar. Essas soluções

são estáveis durante 2 meses quando armazenadas a -20°C . Transformar em alíquotas 200 μL de Etanolamina em frascos de plástico/vidro individuais de tamanho apropriado e tampar. Essa solução é armazenada a $2-8^{\circ}\text{C}$ e é estável de acordo as orientações do fabricante.

- 5 Para assegurar boa ligação à célula de fluxo, uma célula de fluxo será usada durante uma semana ou 286 injeções, whichever comes primeiro. A new flow cell will be immobilized no início de cada semana.

Imobilização de B7.1 Ig em Preparado para Testagem de amostra

- 10 **NOTA:** transformar em alíquotas 200 μL de todas as soluções em tubos Biacore de 7 mm para análise.

- Descongelar um frasco contendo B7.1 Ig em temperatura ambiente. Diluir B7.1 Ig usando tampão de acetato a 10 mM, pH de 5,0 (1.7) para obter uma massa de superfície de entre 3000-9000 Unidades de ressonância (RU). Descongelar um frasco (200 μL) cada um de EDC e NHS para a temperatura ambiente. Remover HCl de etanolamina do refrigerador e deixar aquecer para a temperatura ambiente. Do software Biacore: Abrir o projeto publicado "B7 Ig Immobilization" selecionado do "Immobilization Wizard". Abrir o arquivo publicado "B7 Immob.blw". Navegar através do wizard e confirmar ou alterar a seleção clicando em "Next". Sob "User Information" selecionar célula de fluxo e fornecer informação experimental na aba "Notebook". Colocar reagente e frascos de ligante no rack de amostra conforme esboçado. Revisar instruções. Salvar o arquivo template como: B7 Immob BIOQC# Date Iniciais Chip # Flow cell #.blw. Começar a imobilização clicando em "Start". Salvar o arquivo resultante como: B7 Immob BIOQC# Date Inicial chip # flow cell #.blr. Quando o ensaio está terminado, imprimir os resultados do Wizard e sensorgrama.

EXEMPLO 22: ANÁLISE DO TEOR CARBOIDRATO DE UMA COMPOSIÇÃO DE CTLA4^{A29YL104E}-Ig, MAPEAMENTO PEPTÍDICO TRÍPTICO E IEF

Mapeamento peptídico por digestão trípica

- 30 Nesse método de digestão trípica, amostras de CTLA4^{A29YL104E}-Ig são desnaturadas usando guanidina-HCl e reduzidas e alquiladas usando DTT e IAA. As amostras são dessalinizadas usando uma NAP-5 coluna e

digerida com tripsina. A mistura de digestão é separada através de cromatografia de fase reversa (C18) e os picos são detectados através de absorvância de UV a 215 nm.

REAGENTES: solução de fase móvel A (ácido trifluoroacético (TFA) em Água (v/v)); solução de Fase móvel B (TFA a 0,02 % em ACN a 95 % (Acetonitrilo) e 5 % de água (v/v)); agente de alquilação (iodoacetamida a 200 mM (IAA)); Tampão de diluição (TRIS a 100 mM, NaCl a 25 mM, pH de 8,0); Tampão de desnaturação (guanidina a 8 M, TRIS a 50 mM, pH de 8,0); Tampão de Digestão (TRIS a 50 mM, CaCl₂ a 10 mM, pH de 8,0); Agente de Redução (DTT a 100 mM).

INSTRUMENTAÇÃO: (instrumentação equivalente pode ser usada) colunas NAP-5 (Amersham, cat. # 17-0853-02); aquecedor de coluna para HPLC; Sistema Waters Alliance HPLC com aquecedor de coluna e detector de UV.

15 **Visão de Procedimento**

CTLA4^{A29YL104E}-Ig

Desnaturada/Reduzida/Alquilação de Proteína

20

Proteína dessalinizada

25 **Proteína digerida**

Perfil de mapa e informação de MS

Redução e Alquilação: Amostras (por exemplo, CTLA4^{A29YL104E}-Ig, etc.) foram diluídas para 10 mg/ml através da adição de água para um volume final de 100 μ L (1 mg). 560 μ l de tampão de desnaturação e 35 μ L de Agente de Redução (DTT a 100 mM) foram adicionados a 100 μ l amos-

Gu

NA

Trij

RP

tras, foram misturados e centrifugados em uma microcentrífuga durante 3 segundos. As amostras foram, então, incubadas a 50°C durante 20 minutos \pm 2 minutos. 35 μ L de agente de alquilação (IAA a 200 mM) foram, então, adicionados a cada amostra e novamente foram misturados e centrifugados em uma microcentrífuga durante 3 segundos. As amostras foram, então, cobertas com folha de alumínio e incubadas a 50°C durante 20 min. \pm 2 minutos. Após as colunas NAP-5 terem sido equilibradas entornando 3 volumes de coluna (cerca de 7-8 mL) de Tampão de Digestão, 500 μ L das misturas reduzidas e alquiladas foram entornadas sobre as colunas NAP-5, permitindo que o líquido drene através da coluna. As amostras foram, então, coletadas das colunas NAP-5 via eluição de amostra da coluna com 1 mL de Tampão de Digestão.

Digestão: Amostras foram digeridas com 20 μ L de tripsina (0,5 μ g/ μ L) em um banho de água a 38°C durante 4 horas (\pm 0,5 horas). Quando de término de digestão, as amostras foram acidificadas com 2,5 μ L de TFA. As amostras foram, então, colocadas em frascos para amostrador automático para subsequente análise.

Método do Instrumento: O método de instrumento é mostrado abaixo:

Tempo (min)	Fluxo (mL/min)	Fase móvel A	Fase móvel B
0	0,7	100	0
17	0,7	83	17
27	0,7	78	22
42	0,7	73	27
58	0,7	65	35
74	0,7	52	48
79	0,7	0	100
84	0,7	100	0
88	0,7	100	0

A coluna foi equilibrada com 100% de tampão de fase móvel A durante 25 minutos antes das primeiras injeções. A absorbância de UV foi monitorada a 215 nm enquanto a temperatura da coluna era mantida a 37°C e a temperatura do amostrador automático a 4°C. Um placebo de tampão de fase móvel A foi operado antes do primeiro Padrão de Adequabilidade de Sistema, após o que, uma única injeção de 50 μ L de cada amostra. A inje-

ção de Material de Referência deverá abranger faixas a cada seis injeções de amostra.

Número de placas teóricas: Eficiência de coluna, avaliada como o número de placas teóricas, pode ser medida quantitativamente usando o tempo de retenção e a largura de pico de acordo com a equação:

$$N = 16 \left(\frac{t}{w} \right)^2$$

onde:

"w" é a largura de pico na linha de base medida através de extrapolação dos lados relativamente retos para a linha de base,

"t" é o tempo de retenção do pico medido a partir do momento de injeção até o momento de eluição do pico máximo.

Se $N < 50000$, re-equilibrar a coluna.

Resolução: Determinar a resolução (R) entre 2 picos, por exemplo, pico T2 e pico T12 conforme indicado na FIG. 32; pode ser determinada usando a seguinte equação:

$$R = \frac{2(t_2 - t_1)}{(w_1 + w_2)}$$

onde:

t_1, t_2 = tempos de retenção de picos de fragmentos T2 e T12, respectivamente

w_1, w_2 = largura de pico tangente-definida na linha de base dos picos com tempos de retenção t_1 e t_2 , respectivamente.

Se $R < 1,5$, a coluna deverá ser re-equilibrada e se o problema persiste, a coluna deverá ser substituída.

A FIG. 32 e Tabela 25 mostram os fragmentos peptídicos obtidos a partir de uma digestão com tripsina de CTLA4^{A29YL104E}-Ig. A região mostrando os peptídeos T7 e T9 a ~50 minutos algumas vezes refletem digestão incompleta de amostra e picos podem mostrar diferentes qualidades de dia para dia; contudo, dentro de uma operação, todas as amostras mostram comparabilidade.

Tabela 25: Fragmentos de peptídeo tríptico de CTLA4^{A29YL104E}-Ig

Fragmento No.	Resíduo No.	Massa teórica ¹	Massa observada	Seqüência peptídica
T1	1-14	1465,8	1464,8	MHVAQPAVVCLASSR
T2	15-28	1485,7	1484,8	GIASFVCEYASPGK
T3	29-33	666,3	666,4	YTEVR
T4	34-38	586,7	586,4	VTVLR
T5 ^a	39-83 ^c	4900,4	--- ^d	QADSQVTEVCAATYMMGNELTFLDDS ICTGTSSGNQVNLTIQGLR
T6	84-93	1171,4	1170,5	AMDTGLYICK
T7 ^b	94-128 ^c	3983,5	--- ^d	VELMYPPPYEGIGNGTQIYVID- PEPCPDSQEPK
T8 ^b	129-132	435,4	ND	SSDK
T9 ^b	133-158 ^c	3345,7	--- ^d	THTSPPSPAPPELLGGSSVFLFPPKPK
T10	159-165	834,9	834,5	DTLMISR
T11	166-184	2140,3	2138,5	TPEVTCVVVDVSHEDPEVK
T12	185-198	1677,8	1677,8	FNWYVDGVEVHNAK
T13	199-202	500,6	500,3	TKPR
T14 ^a	203-211 ^c	1189,2	--- ^d	EEQYNSTYR
T15	212-227	1808,1	1808	VVSVLTVLHQDWLNGK
T16	228-230	438,5	438,2	EYK
T17	231-232	307,4	ND	CK
T18	233-236	446,5	ND	VSNK
T19	237-244	838,0	837,4	ALPAPIEK
T20	245-248	447,5	447,2	TISK
T21	249-250	217,2	ND	AK
T22	251-254	456,5	456,3	GQPR
T23	255-265	1286,4	1285,6	EPQVYTLPPSR
T24	266-270	604,7	604,3	DELTK
T25	271-280	1161,4	1160,7	NQVSLTCLVK
T26	281-302	2544,7	2544	GFYPSDIAVEWESNGQPENNYK
T27	303-319	1874,1	1873,9	TTPPVLDSDGSFFLYSK
T28	320-324	574,7	574,3	LTVDK
T29	325-326	261,28	ND	SR
T30	327-349	2803,09	2802,1	WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK
T31	350-356	659,7	659,2	SLSLSPG
T6	84-93	1171,4	1170,5	AMDTGLYICK
T7 ^b	94-128 ^c	3983,5	--- ^d	VELMYPPPYEGIGNGTQIYVIDPEP CPDSQEPK
T8 ^b	129-132	435,4	ND	SSDK
T9 ^b	133-158 ^c	3345,7	--- ^d	THTSPPSPAPPELLGGSSVFLFPPKPK
T10	159-165	834,9	834,5	DTLMISR
T11	166-184	2140,3	2138,5	TPEVTCVVVDVSHEDPEVK
T12	185-198	1677,8	1677,8	FNWYVDGVEVHNAK
T13	199-202	500,6	500,3	TKPR
T14 ^a	203-211 ^c	1189,2	--- ^d	EEQYNSTYR
T15	212-227	1808,1	1808	VVSVLTVLHQDWLNGK
T16	228-230	438,5	438,2	EYK
T17	231-232	307,4	ND	CK
T18	233-236	446,5	ND	VSNK
T19	237-244	838,0	837,4	ALPAPIEK
T20	245-248	447,5	447,2	TISK
T21	249-250	217,2	ND	AK
T22	251-254	456,5	456,3	GQPR
T23	255-265	1286,4	1285,6	EPQVYTLPPSR
T24	266-270	604,7	604,3	DELTK

T25	271-280	1161,4	1160,7	NQVSLTCLVK
T26	281-302	2544,7	2544	GFYPSDIAVEWESNGQPENNYK
T27	303-319	1874,1	1873,9	TTPPVLDSDGSFFLYSK
T28	320-324	574,7	574,3	LTVDK
T29	325-326	261,28	ND	SR
T30	327-349	2803,09	2802,1	WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK
T31	350-356	659,7	659,2	SLSLSPG

^a Peptídeos com carboidrato N-Ligado

^b Peptídeos com carboidrato O-Ligado

^c Massas para T5, T7, T9 e T14 são massas sem as porções de carboidrato

5. ^d Um número de massa correspondendo aos peptídeos glicosilados foi observado

Focalização isoeétrica

Focalização isoeétrica (IEF) é usada para avaliar os pontos isoeletricos (pI) das várias isoformas de CTLA4^{A29YL104E}-Ig em Substância de Fármaco e produto de fármaco. Esse método usa Pharmacia Biotech Ampholine® PAG Plate em um pH com gradiente de 4,0-6,5 e um sistema de eletroforese com leito plano Multiphore II. As amostras (por exemplo, CTLA4^{A29YL104E}-Ig, etc.) são diluídas em água Milli-Q e carregadas diretamente sobre o gel usando tiras de aplicação de amostra. O gel é focalizado durante 2,5 horas sob tensão crescente usando tiras de catodo embebidas em alanina a 100 mM e uma tira de anodo embebida em ácido glutâmico a 100 mM / ácido fosfórico a 500 mM. Após focalização, o gel é fixado usando ácido sulfo-salicílico/ácido tricloroacético e, então, corado usando um sistema de coloração com azul Coomassie. Após coloração, o gel úmido é explorado em um arquivo de imagem digital usando um densitômetro baseado a laser em uma resolução espacial de 50 ou 100 µm com até 4096 níveis de resolução de densidade óptica. CTLA4^{A29YL104E}-Ig focaliza em 10 a 15 bandas, oscilando de um pI de 4,5 a 5,5.

Focalização isoeletrica de CTLA4^{A29YL104E}-Ig nativa sobre um gel (pH de 4,0-6,5) gera um padrão de formação de banda similar na faixa de pI de 4,6-5,5 para o processo C Lote 224818-2004-007, Processo B Lote 000929-287 e Co-mistura Lote 55128-162, conforme mostrado na FIG. 12. Esse procedimento mostra que os materiais dos Processos B e C são com-

paráveis quando analisados sobre o mesmo gel de IEF.

Padrões de focalização isoeétrica deverão ser facilmente distinguidos da base (veja FIG. 12)

	<u>Padrão de proteína</u>	<u>pl</u>
5	Lectina de lentilha	8,65
		8,45
	Mioglobina de cavalo	7,35
		6,85
	Conalbumina	5,90
10	Lactoglobulina	5,20
	Inibidor de tripsina de soja	4,55
	Amiloglicosidase	3,50

CTLA4^{A29YL104E}-Ig é identificada como múltiplas bandas (>10) que têm uma faixa de pl de cerca de 4,5 a cerca de 5,5 (FIG. 32).

15 CTLA4^{A29YL104E}-Ig é uma glicoproteína de fusão de CTLA4-Ig de segunda geração a qual consiste do domínio de ligação a ligante modificado do antígeno 4 de linfócito T citotóxico (CTLA4) e da região constante da cadeia pesada de IgG₁ humana. Essa nova molécula tem aplicação terapêutica como um imunossupressor. CTLA4^{A29YL104E}-Ig contém múltiplas isoformas

20 carregadas as quais podem ser decompostas através de focalização isoeétrica (IEF). Um método de IEF para a análise de substância de fármaco de CTLA4^{A29YL104E}-Ig e produto de fármaco foi desenvolvido. Esse método é usado para examinar CTLA4A29YL104E-Ig em um sistema de eletroforese com leito plano Ampholine® PAG Plate, pH de 4,0-6,5, Multiphore II. Substância de fármaco de CTLA4^{A29YL104E}-Ig, produto de fármaco e Material de

25 Referência são diluídos em água Milli-Q e carregados diretamente sobre o gel. O gel é focalizado durante 2,5 horas sob tensão crescente usando uma tira de catodo embebida em β-alanina a 100 mM e uma tira de anodo embebida em ácido glutâmico a 100 mM / ácido fosfórico a 500 mM. Após focalização,

30 o gel é fixado e corado com azul Coomassie. O gel corado é explorado através de densitometria a laser e análise semi-quantitativa de bandas de

gel é realizada sobre o arquivo de imagem digital.

Materiais:

Ampholine PAG Plate Gel, pH de 4,0-6,5	GE Healthcare (Cat No. 80-1124-81)
Tiras de eletrodo para IEF de 6 x 280 mm	GE Healthcare (Cat No. 80-1004-40)
Peças de aplicação de amostra	GE Healthcare (Cat No. 80-1129-46)

Equipamento:

Sistema de eletroforese Multiphor II	GE Healthcare (Cat No. 18-1018-06)
Placa de resfriamento de 125 x 260 mm	GE Healthcare (Cat No. 80-1106-54)
Suprimento de energia	NOVEX (Modelo Básico 3540)
	BioRad (Modelo PAC3000)
Circulador termostático	VWR (Modelo 13271-074/ 1160S 1160A)
Agitador orbital	IKA (Modelo KS250/260)
Densitômetro Personal SI	GE Healthcare (Model 375)
Software ImageQuantTL	GE Healthcare

Preparo de reagentes

5 **Solução tampão de anodo (100 mL):** Ácido glutâmico a 0,1 M em ácido fosfórico a 0,5 M; 3,4 mL de ácido fosfórico a 85%; 1,47 □ 0,02 g de Ácido glutâmico; água Milli-Q. Adicionar Ácido glutâmico a 50 mL de água Milli-Q. Adicionar ácido fosfórico a 85% e Q.S. para 100 mL, agitar para misturar. Atribuir uma data de expiração de 6 meses e armazenar a 4°C.

10 **Solução tampão de catodo (100 mL):** β-Alanina a 0,1 M, 0,9 □ 0,02 g de β-Alanina, água Milli-Q. Q.S. reagente para 100 mL com água Milli-Q, agitar para misturar. Atribuir uma data de expiração date de 6 meses e armazenar a 4°C.

15 **Solução de fixação (2000 mL):** ácido 5-sulfo-salicílico a 3,5% em ácido tricloroacético a 12%, 240 □ 5,0 g de Ácido tricloroacético, 70 □ 2,0 g de ácido 5-sulfo-salicílico, água Milli-Q. Combinar os reagentes e Q.S. para 2000 mL com água Milli-Q. Atribuir uma data de expiração de 3 meses e armazenar em temperatura ambiente.

20 **Aparelho e Preparo de gel.** Conectar a plataforma de resfriamento da unidade de eletroforese Multiphore II ao circulador termostático Multi-Temp e ajustar a temperatura para 10°C. Deixar que o circulador atinja 10 □ 2°C. Remover o gel do refrigerador. Usando tesouras, cortar cuidadosamente ao longo de todos os quatro lados do envelope, certificando-se de

- não cortar o gel/suporte de gel. Adicionar aproximadamente 1,0 mL de água Milli-Q a uma borda da plataforma de resfriamento. Colocar uma borda do gel/suporte de gel na água, de modo que a água se mova através de toda a borda do gel. Aplicar cuidadosamente o gel através da plataforma de resfriamento, evitando a formação de bolhas de ar. Remover o filme transparente da superfície do gel. Embeber cada tira de eletrodo com aproximadamente 3,0 mL da solução de eletrodo apropriada (Tabela diretamente abaixo). Aplicar as tiras de eletrodo aproximadamente 10 mm das bordas superior e inferior do gel. Colocar a tira de catodo mais próxima das marcas (-) e a tira de anodo mais próxima das marcas (+) sobre a plataforma de resfriamento. Após as tiras de eletrodo terem sido aplicadas, cortar as tiras para adaptar ao gel, evitando contato com o suporte de gel.

Soluções de eletrodo e ajustes de parâmetro de eletroforese

Faixa de pH	Solução de anodo	Solução de catodo	Tensão (V)	Corrente (mA)	Energia (W)	Tempo (h)
4,0 - 6,5	Ácido glutâmico a 0,1 M em H ₃ PO ₄ a 0,5 M	β-Alanina a 0,1 M	2000	25	25	2,5

- Aplicar as peças de aplicação de amostra aproximadamente 10 mm acima da tira de catodo. Usando os parâmetros de eletroforese definidos na tabela diretamente acima, pré-focalizar o gel até que a tensão atinja 300 V.

Preparo de marcador de pI para IEF e Controle de coloração.

- Reconstituir o marcador de pI para IEF com 100 µL de água Milli-Q. Reconstituir o controle de coloração de Anidrase carbônica II com 1000 µL de água Milli-Q para fazer uma solução de estoque a 1,0 mg/mL. Adicionar 10 µL de solução de estoque (1,0 mg/mL) a 90 µL de água Milli-Q para uma concentração final de carregamento de 0,10 mg/mL.

- Preparo de amostra.** Diluir o Material de Referência de CTLA4^{A29YL104E}-Ig e amostras para uma concentração de 2 mg/mL.

Exemplo: Se a amostra de CTLA4^{A29YL104E}-Ig tem uma concentração de 25 mg/mL, usar a seguinte diluição para preparar a concentração de carregamento final de 2 mg/mL:

10 μ L (de 25 mg/mL) + 115 μ L de água Milli-Q = 2 mg/mL

NOTA: se the concentração de amostra é \leq 2,0 mg/mL, então, load a amostra without diluição.

- 5 **Carregamento de gel.** Carregar os géis para facilitar identificação de amostra baseado no padrão de operação. Não carregar o gel simetricamente. Carregar o marcador de pl para IEF, controle de coloração, Material de Referência de CTLA4^{A29YL104E}-Ig e amostras de CTLA4^{A29YL104E}-Ig, conforme esboçado na tabela diretamente abaixo. Carregar todas as amostras sobre uma peça de aplicação de amostra.

10 **Padrão de carregamento de gel**

Fileira	Descrição	Concentração de carregamento (μ g/ μ L)	Volume de carregamento (μ L)	Carga de proteína (μ g)
1	Marcador de pl para IEF*	-	10,0	-
2	Marcador de pl para IEF	-	10,0	-
3	Material de Referência de C-TLA4 ^{A29YL104E} -Ig	2,0	10,0	20
4	Amostra 1	2,0	10,0	20
5	Controle de coloração	0,10	10,0	1,0
6	Amostra 2	2,0	10,0	20
7	Material de Referência de C-TLA4 ^{A29YL104E} -Ig	2,0	10,0	20
8	Marcador de pl para IEF	-	10,0	-

- * Carga de marcador de pl para IEF na Fileira 1 é necessária para definir a orientação do gel. Começar o padrão de carregamento dentro da fileira 2 e repetir o padrão de carregamento para amostras adicionais. O marcador de pl para IEF deve ser carregado pelo menos a cada dez fileiras (Exemplo: MRS₁S₂S₃S₄S₅S₆RM; M – marcador; R – Material de Referência, S_x – amostra).

- 20 **Processamento de gel.** Colocar o contentor de eletrodo sobre a unidade Multiphor II e alinhar os eletrodos com o centro das tiras de eletrodo sobre o gel. Conectar os dois eletrodos do contentor de eletrodo à unidade de base e colocar a tampa de segurança em posição. Usando uma fita adesiva, cobrir os orifícios na tampa de segurança para impedir que o gel seque. Conectar os eletrodos ao suprimento de energia. Operar a eletroforese na tensão, corrente e energia apropriadas. Quando eletroforese está completa, desligar o suprimento de energia e remover a tampa de segurança e contentor de eletrodo. Remover cuidadosamente as tiras de eletrodo e as

peças de aplicação de amostra do gel. Remover todos o gel e suporte de gel da placa de resfriamento e colocar em um disco Pyrex™ de 280 x 180 x 40 mm contendo 200 mL de solução de fixação. Cobrir o disco com um envoltório plástico e colocar sobre um agitador orbital em temperatura ambiente durante um mínimo de 20 minutos.

NOTA: O gel deverá ser fixado durante um máximo de 1 hora.

Quando fixação está completa, lavar o gel 3 vezes durante 5 minutos cada com aproximadamente 200 mL de água Milli-Q. Misturar a solução de reagente de coloração GelCode Blue através de inversão da garrafa várias vezes. É importante misturar o reagente de coloração antes de distribuição para assegurar que uma amostra homogênea do reagente é usada. Adicionar aproximadamente 200 mL do reagente de coloração ao disco. Cobrir o disco com um envoltório plástico e colocar sobre o agitador orbital em temperatura ambiente durante 18 a 20 horas para obter desenvolvimento ótimo de banda. Quando coloração está completa, lavar o gel substituindo o reagente de coloração por aproximadamente 200 mL de água Milli-Q. Realizar um mínimo de 3 trocas de água durante um período de 1-2 horas para resultados ótimos.

Exploração e análise de gel. Explorar o gel usando os parâmetros de exploração definidos na tabela diretamente acima. Análise do gel é realizada sobre o arquivo da imagem explorada.

Exploração de gel e Parâmetros de análise

Parâmetros de exploração	Ajuste
Tamanho de exploração de Pixel	100
Resolução de exploração digital	12 bits
Parâmetro de detecção de bandas	
Declínio mínimo	Inicial 100
Redução de ruído	Inicial 10
Pico máximo %	Inicial 0
Largura % de fileira	Ajustar a 90%

NOTA: A Tabela 3 esboça diretrizes gerais para a análise das imagens de gel. Refira-se ao manual do ImageQuant TL (v2003.03) e instruções na tela para informação detalhada sobre o ajuste apropriado de cada parâmetro de detecção de banda.

Abrir um arquivo de imagem de gel (dados brutos explorados) da <1D Gel Analysis> no ImageQuantTL. Ir para <Contrast> na barra de ferramentas e diminuir o parâmetro <Image Histogram> até que todas as bandas sejam claramente visíveis. Selecionar <Lane Creation> e escolher <Manual> para ajustar <Number of Lanes> a ser analisado. Ajustar <Lane % Width> para 100% para cobrir as fileiras de gel. Alinhar apropriadamente fileiras únicas se necessário. Usar o método <Rolling Ball> para subtrair a base. Isso não é crítico para análise de imagem do gel de IEF. Detectar bandas usando os ajustes iniciais de <Minimum Slope>, <Noise Reduction> e <%Maximum Peak> listados na Tabela 3. O ajuste desses valores é necessário para identificar precisamente as bandas. Corrigir manualmente quaisquer bandas que faltam e bandas mal identificadas. Computar valor de pI através de uso do marcador de pI padrão dos marcadores rotulados listados na seção Adequabilidade de sistema para o gel com pH/pI de 4,0-6,5. Não realizar as etapas de calibração e normalização. Exportar os dados contidos dentro da janela de medição em uma planilha do Excel para cálculo adicional e reportar. Importar os dados do Excel para uma planilha validada para realizar análise quantitativa para reportagem de resultados.

ADEQUABILIDADE DE SISTEMA. Padrões de focalização isoeletrica (marcadores de pI) devem ser prontamente distinguidos da base e mostrar distorção limitada através de inspeção visual da imagem de gel explorada (veja Tabela diretamente abaixo para os marcadores de pI listados).

Padrões de focalização isoeletrica

Proteína	Valor de pI
Tripsinogênio	9,30
Lectina de lentilha, básica	8,65
Lectina de lentilha, mediana	8,45
Lectina de lentilha, ácida	8,15
Mioglobina, básica	7,35
Mioglobina, ácida	6,85
Anidrase carbônica B (humana)	6,55
Anidrase carbônica B (bovina)	5,85
B Lactoglobulina A	5,20
Inibidor de tripsina de soja	4,55
Vermelho de metila (corante)	3,75
Amiloglucosidase	3,50

NOTA: Nem todos os padrões de focalização isoeletrica aparecerão sobre o

gel porque o pH/faixa de pl do gel é de 4,0-6,5. Os marcadores de pl a 3,50, 4,55, 5,20 e 5,85 têm de ser identificados e rotulados sobre o gel.

O padrão de formação de banda de Material de Referência de CTLA4^{A29YL104E}-Ig e artigos de teste deverá mostrar distorção limitada através de inspeção visual da imagem de gel explorada. Um controle de coloração de anidrase carbônica II (pl de 5,4) em um baixo nível de carga de proteína (1,0 µg) é usado para demonstrar coloração de gel consistente. A banda deve ser facilmente distinguida da base através de inspeção visual da imagem de gel explorada. Material de Referência de CTLA4^{A29YL104E}-Ig deve conter 8 a 15 bandas com intensidade de banda ≥ 1,0% dentro da faixa de pl de 4,5 a 5,6. Material de Referência de CTLA4^{A29YL104E}-Ig com bandas dentro da faixa de pl de 4,5 a 5,6 deve ter uma intensidade cumulativa percentual de ≥ 95%.

CÁLCULO DE DADOS. A seguinte equação é utilizada para o cálculo da intensidade cumulativa percentual de amostras de CTLA4^{A29YL104E}-Ig com relação ao Material de Referência:

$$\text{Intensidade cumulativa percentual} = \frac{\text{Intensidade de banda \% da amostra (pl 4,5-5,6)}}{\text{Intensidade de banda \% da referência (pl 4,5-5,6)}} \times 100$$

Exemplo: Se a amostra tem uma intensidade de banda % (pl 4,5-5,6) de 95% e o Material de Referência tem uma intensidade de banda % (pl 4,5-5,6) de 100%, a intensidade % cumulativa será 95%.

O material de CTLA4^{A29YL104E}-Ig em uma modalidade terá bandas com uma intensidade de banda relativa ≥ 1,0% dentro da faixa de pl de 4,5 - 5,6. O material de CTLA4^{A29YL104E}-Ig tem uma intensidade cumulativa percentual com relação àquela do material de referência de CTLA4^{A29YL104E}-Ig dentro da faixa de pl de 4,5 - 5,6.

EXEMPLO 23: TRANSFECCÃO E GERAÇÃO DE LINHAGENS DE CÉLULAS

Antes de eletroporação, o vetor de expressão pD16LEA29Y foi linearizado com enzima *BstBI* para produzir saliências de 4 bp compatíveis. O vetor linearizado e DNA veículo de esperma de salmão cisalhado (como veículo) foram co-precipitados com etanol e assepticamente resuspenso

5 em meio PF CHO (JRH Biosciences) para eletroporação em células DG44.

Após eletroporação, as células foram deixadas se recuperar em meio não seletivo. As células foram, então, cultivadas em lâminas com 96 cavidades em meio seletivo de PF CHO contendo 500 ng/mL de recombulina (Gibco), L-glutamina a 4 mM (Gibco) e metotrexato (ICN).

10 Linhagens de células de produção de CTLA4^{A29YL104E}-Ig dessa lâmina foram escolhidas para amplificação de expressão usando a seguinte progressão de concentrações de metotrexato (MTX) adicionadas ao meio:

MTX a 20 nM \Rightarrow 50 nM \Rightarrow 100 nM \Rightarrow 250nM \Rightarrow 500nM \Rightarrow 1 μ M MTX

15 Plasmídeo de expressão de CTLA4^{A29YL104E}-Ig inteiro é integrado no genoma de uma célula.

Seleção de linhagem de célula de produção

A linhagem de células de produção final GF1.1.9 foi isolada após dois ciclos de clonagem por diluição limitativa das melhores linhagens de células na cavidade mestre amplificada. Seleção de linhagem de células

20 GF1.1.9 foi baseada no padrão de crescimento, titulação e produto contendo uma quantidade reduzida de componentes de espécies de elevado peso molecular e um maior teor de ácido siálico com relação ao material produzido de outros clones.

EXEMPLO 24: CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DA CTLA4^{A29YL104E}-Ig

25 Estudos de estabilidade genômica

DNA e RNA isolado de células derivadas de um banco de célula foram usados para análise de hibridização de Southern e Northern e seqüenciamento do cDNA para uma seqüência de codificação de CTLA4^{A29YL104E}-Ig. Os resultados foram comparados com os resultados obti-

30 dos de CTLA4^{A29YL104E}-Ig.

Os resultados para a análise de hibridização de Northern e estimativa de seqüenciamento de cDNA são apresentados abaixo.

Análise de hibridização de Northern

A cultura inoculada com células do banco de células foi expandida e usada para isolar RNA para a análise de hibridização de Northern. A cultura preparada representa células de aproximadamente 27 gerações além da idade de célula *in vitro* usada no processo de produção de CTLA4^{A29YL104E}-Ig. RNA total foi extraído de células derivadas do banco de células de CTLA4^{A29YL104E}-Ig e de células de CTLA4^{A29YL104E}-Ig expandida. Um controle utilizando RNA total da linhagem de células CHO precursora foi também usada nesses experimentos. Aproximadamente 5 µg de RNA total foram submetidos à eletroforese em gel de agarose sob condições de desnaturação. O RNA no gel foi blotted sobre uma membrana de náilon e hibridizado com um fragmento de DNA *HindIII/XbaI* de 1,2 kb ³²P-rotulado contendo o gene de CTLA4^{A29YL104E}-Ig. O fragmento de DNA *HindIII/XbaI* de 1,2 kb usado para a sonda foi isolado do plasmídeo pD16LEA29Y.

Uma espécie de mRNA de aproximadamente 1,7 quilobases que se hibridizava à sonda de gene CTLA4^{A29YL104E}-Ig foi detectada na amostra de RNA total do banco de células conforme mostrado na FIG. 33. O painel A e O painel B mostrados na FIG. 33 representam o gel de agarose corado com brometo de etídio e o auto-radiograma correspondente, respectivamente.

Esses resultados indicam que apenas um transcrito que codifica CTLA4^{A29YL104E}-Ig é expresso em culturas derivadas do banco de células de CTLA4^{A29YL104E}-Ig expandidas. Além disso, nenhuma alteração detectável no transcrito de mRNA de CTLA4^{A29YL104E}-Ig foi observada nessas amostras quando comparado com os resultados obtidos usando um banco de células.

EXEMPLO 25: CROMATOGRAFIA POR EXCLUSÃO DE TAMANHO

Um método de exclusão tamanho foi desenvolvido para analisar composições de CTLA4^{A29YL104E}-Ig usando uma coluna TosoHaas TSK-3000 SWXL de 7,8 mm x 300 mm equipada com uma coluna de proteção com detecção a 280 nm. CTLA4^{A29YL104E}-Ig é avaliada com relação à homogeneidade de produto, incluindo monômero (cadeia simples), dímero ou espécies de elevado peso molecular (por exemplo, tetrâmero). O método mostra boa

precisão (<2%) em uma concentração nominal de ~10 mg/mL e é linear de ~0,5-15 mg/mL ($r^2 = 0,999$). O DL (Limite de detecção) é ~2,26 µg/mL e o QL (Limite de Quantificação) é ~7,53 µg/mL. Essas moléculas solúveis de CTLA4-Ig são proteínas de fusão consistindo do domínio de ligação a ligante do antígeno 4 de linfócito T citotóxico (CTLA4) e da região constante de cadeia pesada de IgG1 humana com aplicação terapêutica potencial como imunossuppressores. Esses compostos exercem seus efeitos fisiológicos através de ligação a antígenos B7 (CD80 e CD86) sobre a superfície de várias células apresentando antígeno (APC), assim, bloqueando a interação funcional de B7.1 e B7.2 com CD28 sobre a superfície de células T. Esse bloqueio resulta na supressão de ativação de células T, conseqüentemente, da resposta imune. Embora LEA29Y venha a diferir da CTLA4Ig apenas em dois resíduos de aminoácido, Leu₁₀₄ – glu e Ala₂₉ – Try, as moléculas têm avides significativamente diferente pelos antígenos B7.1 e B7.2. LEA29Y mostra uma avides 5 a 10 vezes maior pela forma humana de B7.2 (CD86) e avides similar pela B7.1 humana (CD80), comparado com a CTLA4Ig precursora.

Cromatografia de exclusão de tamanho com uma coluna TSK-3000 SWXL (7,8 mm x 300 mm) equipada com uma coluna de proteção e detecção a 280 nm é usada para analisar substância de fármaco de CTLA4^{A29YL104E}-Ig com relação à homogeneidade. Dímero, espécies de elevado peso molecular (HMW) e espécies de baixo peso molecular (LMW) de CTLA4^{A29YL104E}-Ig são diferenciados.

Cromatografia de exclusão de tamanho (SEG) é usada para avaliar CTLA4^{A29YL104E}-Ig com relação à homogeneidade de produto. As FIGS. 34A-C mostram o cromatograma de SEC de CTLA4^{A29YL104E}-Ig para o Processo B, Processo C e um lote de co-mistura. SEC de CTLA4^{A29YL104E}-Ig indica que o material de processo C tem uma área de dímero de 99,8 por cento, uma área de espécies de HMW de 0,2 por cento e nenhuma espécie de LMW detectável. Esses resultados são comparáveis com o material de processo B (área de dímero de 97,4 por cento, área de HMW de 2,6 por cento e LMW <DL).

- Reagentes:** KOH a 4N (100 mL); Padrão de Adequabilidade de Sistema (marcadores de peso molecular dissolvidos em água com grau para HPLC); tampão de operação de Fase móvel (KH_2PO_4 a 0,2 M, NaCl a 0,9%, pH de 6,8); NaOH a 4N; Tampão de diluição (NaH_2PO_4 a 25 mM - H_2O , NaCl a 10 mM, pH de 7,5)

5 INSTRUMENTAÇÃO E CONDIÇÕES – instrumentação equivalente pode ser substituída:

Tipo de bomba	Waters Modelo 600
Coluna	Toso Haas 5 μm TSK 3000 SWXL, D.I. de 300 mm x 7,8 m, da Hewlett Packard, (Catálogo No. 79912S3-597) equipada com coluna de proteção 5 μm TSK 3000 SWXL, D.I. de 40 mm x 6,0 mm, Hewlett Packard, (Catálogo No. 79912S3-527)
Detector	Waters Modelo 486, permitir 15 minutos para aquecimento
Comprimento de onda	280 nm
Taxa de fluxo	1 mL/min
Integração do sistema	VG Multichrom
Sistema de injeção	Waters Modelo 717 Mais Amostrador automático equipado com refrigeração para 4°C
Volume de injeção	20 mL
Concentração alvo do ensaio	10 mg/mL
Fase móvel	KH_2PO_4 a 0,2 M, NaCl a 0,9%, pH de 6,8 com KOH
Tempo de operação do ensaio	20 min
Temperatura da coluna	Ambiente
Tempo de retenção	CTLA4 ^{A29YL104E} -Ig ~8,5min \pm 0,5 min, espécies de elevado peso molecular a ~ 7,5 min \pm 0,5 min

Padrões e amostras (10 mg/ml) foram preparados como volumes

de 50 ml em frascos para amostrador automático rotulados. As amostras foram preparadas em duplicata.

CÁLCULOS

Determinação de Resolução (R) e avaliação de tempo de re-

- 5 **tenção:** 20 mL de Padrões de Adequabilidade de sistema são injetados para calcular a resolução entre 2 picos de um cromatograma gerado usando tais padrões (por exemplo, um pico, Pico 1, tendo um tempo de retenção ~ 8,5 minutos e um segundo pico, Pico 2, tendo um tempo de retenção ~ 10 minutos) usando a seguinte equação:

$$\text{Resolução (R)} = \frac{2(t_2 - t_1)}{W_2 + W_1}$$

- 10 onde:

$$\begin{aligned} t_1 &= \text{Tempo de retenção do Pico 1} \\ t_2 &= \text{Tempo de retenção do Pico 2} \\ W_1 &= \text{Largura de pico do Pico 1} \\ W_2 &= \text{Largura de pico do Pico 2} \end{aligned}$$

$$\text{Resolução (R)} = \frac{2(t_2 - t_1)}{W_2 + W_1} = \frac{2(10.07 - 8.52)}{0.57 + 0.86}$$

- 15 = 2,12 1,3

A largura de pico é igual a largura (em minutos) na base do pico após extrapolação dos lados relativamente retos do pico para a linha de base. Tempo de retenção e larguras de pico são medidos nas mesmas unidades.

- 20 R deve ser 1,3 e o tempo de retenção para o pico deverá ser ~ 8,5 0,5 minutos.

- 25 **Determinação do Número de placas teóricas:** A partir do cromatograma do Padrão de Adequabilidade de Sistema, a eficiência da coluna pode ser determinada calculando o número de placas teóricas de acordo com a seguinte equação:

$$N = 16 \left(\frac{t}{w} \right)^2$$

onde:

(t) = é o Tempo de retenção do Pico 2 (em minutos)

(w) = é uma largura (em minutos) na linha de base de Pico 2 obtida através de extrapolação dos lados do pico para a linha de base, conforme observado na Figura 1.

N deverá ser 2500.

Integração de Picos: As áreas de pico no cromatograma foram integradas (por exemplo, FIGS. 34A-C). O pico de dímero de CTLA4^{A29YL104E}-Ig está a ~ 8,5 minutos e o pico de espécies de elevado peso molecular está a ~ 7,4 minutos.

As áreas percentuais podem ser calculadas de acordo com as fórmulas abaixo:

Área % de monômero = $100 - (\text{área \% de espécies de elevado peso molecular} + \text{área \% de espécies de baixo peso molecular})$

15 (B)

área % de espécies de elevado peso molecular = $x \cdot 100$

(A) + (B) + (C)

(C)

área % de espécies de baixo peso molecular = $x \cdot 100$

20 (A) + (B) (C)

onde:

A = área de pico de dímero de CTLA4^{A29YL104E}-Ig

B = área total de todos os picos com tempos de retenção menores do que o dímero de CTLA4^{A29YL104E}-Ig

25

C = área total de todos os picos com tempos de retenção maiores do que o pico de dímero de CTLA4^{A29YL104E}-Ig (excluindo volume de inclusão).

O RSD % das contagens de área total (excluindo o volume de inclusão) é determinado. O RSD % das contagens de área total deve ser 2% ou menos. Se a área é < 2707 contagens de área, reportar os resultados como DL, (Limite de detecção) (~ 2,26 µg/mL). Se as contagens de área

estão entre 2707-9014, reportar os resultados como QL (Limite de Quantificação) (~ 7,53 µg/mL). Se as contagens de área são 9014, reportar os resultados para mais próximo de um décimo de um por cento.

EXEMPLO 26: SDS-PAGE E LIGAÇÕES DE DISSULFETO

5 Eletroforese em gel de poliacrilamida/dodecil sulfato de sódio

Um procedimento de eletroforese em gel de poliacrilamida/dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) para a análise de CTLA4^{A29YL104E}-Ig é usada como um teste de pureza. As amostras são preparadas em um tampão de amostra de Tris-HCl (pH de 6,8), SDS, sacarose e azul de bromofenol na presença (reduzida) ou ausência (não-reduzida) de ditioneitol (DTT). As amostras são colocadas em um banho de água a 80°C durante dois minutos e submetidas à eletroforese em géis de SDS-poliacrilamida com gradiente (4-20%) pré-fundidos usando um tampão de operação de SDS de Tris-glicina. Após eletroforese, os géis são fixados e corados usando um sistema de coloração com azul Coomassie ou prata. CTLA4^{A29YL104E}-Ig não-reduzida é observada como uma grande banda, com um peso molecular evidente aproximado de ~104 kD. CTLA4^{A29YL104E}-Ig é observada como uma banda principal com um peso molecular evidente aproximado de ~53 kD.

Amostras de Processo B Lote 000929-278, Processo C Lote 224818-2004-007 e uma co-mistura Lote 551218-162 foram eletroforeticamente decompostos usando géis de SDS-PAGE com gradiente de 4-20% sob condições de redução e não-redução. Géis foram separadamente corados com corante Coomassie ou prata, conforme mostrado na FIG. 35 e FIG. 36. SDS-PAGE de CTLA4^{A29YL104E}-Ig não-reduzida mostrou uma banda principal a aproximadamente 104 kDa, representando o monômero intacto. Três bandas menores, não facilmente observadas sobre reproduções eletrônicas, foram também observadas a ~200, 65 e 53 kDa. Amostras de CTLA4^{A29YL104E}-Ig reduzida mostram uma banda principal a aproximadamente 53 kDa, representando a forma com cadeia simples e uma banda menor a ~150 kDa. Essa comparação mostra que os três materiais testados são comparáveis quando analisados sobre o mesmo gel.

Ligações de dissulfeto

Ligações de dissulfeto foram caracterizadas para a Substância de Fármaco do Processo C usando Lote 224818-2004-007. Cada cadeia de CTLA4^{A29YL104E}-Ig contém nove cisteínas. Essas são Cys21, Cys48, Cys66, Cys92, Cys120, Cys171, Cys231, Cys277 e Cys335. Mapeamento peptídico com LC/MS/MS *on line* de CTLA4^{A29YL104E}-Ig reduzida e não-reduzida foi usado para identificar os sítios de ligações intra- e intermolecular em CTLA4^{A29YL104E}-Ig. Uma lista dos peptídeos obtidos a partir de mapeamento peptídico de CTLA4^{A29YL104E}-Ig não reduzida junto com o MW esperado e observado são mostrados na Tabela 27.

O desaparecimento de determinados picos no mapeamento peptídico não-reduzido e o aparecimento de novos picos no mapeamento peptídico reduzido proporcionada evidência de três peptídeos dissulfeto-ligados: T2-T6, T11-T17 e T25-T30, os quais correspondem às ligações de dissulfeto de Cys21-Cys92, Cys171-Cys231 e Cys277-Cys335. Os peptídeos T5 e T7 têm espécies de elevado peso molecular e contêm carboidratos N-ligados, o que torna difícil localizar ligações de dissulfeto. Para gerar peptídeos mais curtos e isentos de carboidrato, CTLA4^{A29YL104E}-Ig foi digerida com uma mistura de tripsina e quimiotripsina. Como um resultado de clivagem adicional com quimiotripsina T7 foi encurtado de um peptídeo com 35 aminoácidos para um peptídeo com 15 aminoácidos, designado T7'-T7', no qual o carboidrato N-ligado é removido. O peptídeo T7'-T7' dissulfeto-ligado aparece no mapa não-reduzido (veja FIG. 37). MS/MS sobre T7'-T7' confirmou sua sequência e ligação de dissulfeto inter-cadeia em Cys120-Cys120.

Tabela 27. Seqüência de peptídeo e MW de peptídeos dissulfeto-ligados a partir de Digestão com tripsina de CTLA4^{A29YL104E}-Ig sob condições de não-redução

Ligação de dissulfeto	Seqüência	MW teórico	MW observado
T2-T6 (C21-C92)	GIASFVCEYASPGK AMDTGLYICK TPEVTCVVVDVSHEDPEVK	2539,2	2539,6
T11-T17 (C171-C231)	CK	2328,1	2328,4
T25-T30 (C277-C335)	NQVSLTCLVK WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK	3844,8	3846,3
T5 (C48-C66)	QADSQVTEVCAATYMMG NRLGQITLNVQNGSSTGTCISDDLFTLE		Glicopeptídeo ^a
T7-T7 (C120-C120)	VELMYPPPYEGIGNGTQIYVIDPEPCPDSQEPK VELMYPPPYEGIGNGTQIYVIDPEPCPDSQEPK		Glicopeptídeo

^a Peptídeos T5 e T7-T7 dão origem à várias massas em virtude de heterogeneidade de glicosilação N-ligada, tornando difícil localizar ligações de dissulfeto.

5 Tratamento com uma mistura de tripsina e quimiotripsina também resultou na formação de fragmentos, os quais correspondem à versões mais curtas de outros peptídeos dissulfeto-ligados que foram observado quando de hidrólise de CTLA4^{A29YL104E}-Ig através de tripsina apenas. Esses são mostrados na Tabela 28.

Tabela 28. Seqüência de peptídeo e MW de Peptídeos dissulfeto-ligados de CTLA4^{A29YL104E}-Ig com digestão (Tripsina e Quimiotripsina)

Ligação de dissulfeto	Seqüência	MW teórico	MW observado
T2'-T6' (C21-C92)	VCEYICK	872,4	872,4
T11-T17 (C171-C231)	TPEVTCVVVDVSHEDPEVKCK	2328,1	2328,6
T25'-T30' (C277-C335)	CLVK SCSVM	984,5	984,5
T7'-T7' (C120-C120)	VIDPEPCPDSQEPKVIDPEPCPDSQEPK	3333,5	3333,2
T5 (C48-C66)	QADSQVTEVCAATYMMGNRLGQITLV QNGSSTGTCISDDLFTLE		glicopeptídeo

10 A digestão de CTLA4^{A29YL104E}-Ig com uma mistura de tripsina e quimiotripsina estabeleceu o emparelhamento de dissulfeto em T7-T7 e confirmou as ligações de dissulfeto observadas com digestão através de tripsina apenas. Contudo, essa mistura de enzima não tem qualquer efeito sobre o peptídeo T5, o qual é também um glicopeptídeo. De forma a remover os car-
15 boidratos N-ligados de T5, CTLA4^{A29YL104E}-Ig foi digerida com uma mistura

de tripsina e elastase conforme mostrado na FIG. 38. Essa mistura de enzimas hidrolisou T5 em quatro diferente sítios, gerando um peptídeo mais curto designado (T5'-T5'') conforme mostrado na Tabela 29. Esse peptídeo gerado tinha a massa esperada de 1259 Da e continha a ligação de dissulfeto correspondendo a Cys46-Cys66. O perfil por mapeamento peptídico obtido a partir de hidrólise de CTLA4^{A29YL104E}-Ig não-reduzida através de uma mistura de tripsina e elastase, é mostrado na FIG. 38 e a seqüência de peptídeo T5'-T5'' está na Tabela 29.

Tabela 29: Seqüência de peptídeo e MW de Peptídeos T5'-T5'' Obtidos através de Digestão de CTLA4^{A29YL104E}-Ig com uma Mistura de Tripsina e Elastase

Ligação de dissulfeto	Seqüência	MW teórico	MW observado
T5 (C48-C66)	EVCTCISDDL	glicopeptídeo	

Os resultados indicam que CTLA4^{A29YL104E}-Ig tem quatro ligações de dissulfeto intra-moleculares nas posições Cys21-Cys92 (T2-T6), Cys48-Cys66 (correspondendo a um único peptídeo T5), Cys171-Cys231 (T11-T17) e Cys277-Cys335 (T25-T30) e uma ligação de dissulfeto inter-cadeia nas posições Cys120-Cys120 (T7-T7). Os dados somaram todos os dezoito resíduos de cisteína. Nenhum emparelhamento errôneo foi observado.

EXEMPLO 27: FORMULAÇÃO DE CTLA4^{A29YL104E}-Ig

CTLA4^{A29YL104E}-Ig para injeção, 100 mg/frasco, é um liofilizado estéril não-pirogênico. A composição de produto de fármaco é fornecida na Tabela 30. Ela é um bolo branco a acinzentado, íntegro ou fragmentado fornecido em frascos de vidro do Tipo I tampados com rolhas de butila cinza e vedados com vedações de alumínio. Esse produto inclui um excesso de 10% para levar em conta perdas pelo frasco, agulha e seringa.

Antes de administração, CTLA4^{A29YL104E}-Ig para injeção, 100 mg/frasco, é constituída com 4,2 mL de Água estéril para injeção, USP, para proporcionar uma concentração de 25 mg/mL. Ela pode ser ainda diluída para uma concentração tão baixa quanto 1 mg/mL com dextrose para injeção a 5%, USP ou Cloreto de sódio para injeção a 0,9%, USP. Soluções

constituídas e diluídas são claras, incolores e essencialmente isentas de matéria em partículas quando de inspeção visual.

Tabela 30. Composição de CTLA4^{A29YL104E}-Ig para injeção, 100 mg/frasco

Componente	Função	Quantidade por Frasco (mg)
CTLA4 ^{A29YL104E} -Ig	Ingrediente ativo	110 ^a
Sacarose	lioprotetor	220
Monohidrato monobásico de fosfato de sódio	Agente de tempo- namento	15,18
Cloreto de sódio	Ajuste de resistên- cia iônica	2,55
Hidróxido de sódio a 1 N	Ajuste de pH	Para 7,5±2
Ácido clorídrico a 1 N	Ajuste de pH	Para 7,5±2
Água para injeção ^b	Solvente	q.s. para 5,5 mL

^a Cada frasco contém um excesso de 10% para considerar perdas pelo frasco, agu-
5 lha e seringa da solução reconstituída.

^b Removido durante liofilização

A temperatura de transição do vidro da solução congelada a ser liofilizada foi determinada como sendo -28,9 °C. Estudos de liofilização foram conduzidos em várias auto-temperaturas de forma para determinar a maior
10 auto-temperatura possível permissível durante secagem primária, sem comprometer a qualidade do produto. Baseado nesses estudos, uma auto-temperatura de -20 °C foi selecionada para a etapa de secagem primária durante a liofilização de CTLA4^{A29YL104E}-Ig. Ao final do ciclo de liofilização, os frascos são tampados sob reduzida pressão.

15 O processo de produção envolve congelamento de frascos contendo solução bruta para liofilização (com excipientes apropriados) em uma câmara de liofilização, seguido por sublimação de água congelada sob temperatura e pressão controladas. As condições de temperatura e pressão na câmara são otimizadas de forma ter sublimação eficiente sem comprometer
20 a qualidade do produto.

A compatibilidade da solução com várias superfícies de contato com o produto e componentes de embalagem foi estudada. Descobriu-se que a solução é compatível com uma tubulação de silicone, aço inoxidável 316L, Acrodisc™, HT Tuffryn (poli-sulfona), membranas de filtração de
25 PVDF Millipore (fluoreto de polivinilideno) e o sistema de vedação de recipi-

ente selecionado.

CTLA4^{A29YL104E}-Ig para injeção, 100 mg/frasco, é embalada em frascos de vidro com tubulação de sílex do Tipo I de 5 cc e tampada com uma rolha revestida com fluoro-resina Daikyo de 20 mm de butila cinza D-21-7-S/B2-TR 2 e vedada com uma vedação flip-off de alumínio de 20 mm.

Seleção de frasco para CTLA4^{A29YL104E}-Ig para injeção foi baseada no volume de enchimento de 5,5 mL para assegurar liofilização eficiente e seleção de rolha revestida com fluoro-resina Daikyo de 20 mm de butila cinza D-21-7-S/B2-TR foi baseada nos dados de compatibilidade.

Estudos de compatibilidade com tempo de uso extensivo foram conduzidos. 100 mg/mL de CTLA4^{A29YL104E}-Ig para injeção, quando constituída para 25 mg/mL com água estéril para injeção, pode ser armazenada em temperaturas ambientes de 15°-25°C (59°-77°F) e luz ambiente durante 24 horas. Solução constituída, quando ainda diluída para 1 mg/ml ou 10 mg/mL com Cloreto de sódio a 0,9% para Injeção (solução salina normal/NS) ou com dextrose para injeção a 5% (D5W) e armazenada em um saco de PVC ou Intra Via de não-PVC em temperaturas ambientes de 15°-25°C (59°-77°F) e luz ambiente, não mostrou perda de potência ou aumento nas espécies de elevado peso molecular durante um período de 24 horas. A solução diluída deve ser filtrada através de um filtro de acetato/celulose misto de 0,2 µm ou 1,2 µm antes de administração. A solução diluída é compatível com filtros de celulose/acetato mistos de 0,2 µm e 1,2 µm.

O produto é incompatível com silicone. Ele interage com silicone para formar partículas visíveis. Portanto, contato com superfícies tratadas com silicone, tais como seringas siliconizadas, deverá ser evitado.

EXEMPLO 28: PROCESSO DE PRODUÇÃO DE CTLA4-IG

CTLA4-Ig é produzida como uma proteína secretada em cultura de célula em larga escala usando uma linhagem de célula de Ovário de Hámster Chinês (CHO). O processo de produção de CTLA4-Ig é iniciado usando uma série de etapas de expansão de inóculo em frasco e bio-reator de cultura. Os conteúdos de um bio-reator de cultura final são usados para inocular um bio-reator de produção de 5000 L. A cultura de célula coletada

do bio-reator de produção de 5000 L é clarificada e concentrada através de microfiltração e ultrafiltração. O material coletado isento de célula é ajustado com relação ao pH e condutividade no preparado para processamento a jusante. CTLA4-Ig é purificada usando uma série de etapas cromatográficas e de filtração. O processo de produção de CTLA4-Ig a jusante inclui duas etapas de cromatografia de troca de ânions, uma etapa de cromatografia de interação hidrofóbica e uma etapa de cromatografia por afinidade. A finalidade dessas etapas é purificar a proteína de CTLA4-Ig, remover espécies de elevado peso molecular material de CTLA4-Ig e controlar o teor de ácido siálico da Substância de Fármaco de CTLA4-Ig. As etapas de processamento a jusante também incluem a etapa de inativação viral e uma etapa de filtração viral para eliminar agentes virais adventícios potenciais. Substância de Fármaco de CTLA4-Ig purificada é enchida em garrafas de polycarbonato de 2 L e congelada em uma temperatura alvo de $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ antes de armazenamento em uma temperatura alvo de $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$. A Substância de Fármaco congelada é descongelada.

Ácido N-acetil neuramínico (NANA) é a espécie de ácido siálico primária presente em Substância de Fármaco de CTLA4-Ig. Referências a ácido siálico por toda essa seção se refere especificamente a essa espécie. Níveis mínimos de ácido N-glicolil neuramínico (NGNA) também estão presentes em Substância de Fármaco de CTLA4-Ig. Os níveis de NANA e NGNA são determinados para a Substância de Fármaco de CTLA4-Ig final. Um fluxograma de processo para o processo de produção de CTLA4-Ig é mostrado abaixo.

Liberação de frasco MWCB
<input type="checkbox"/>
Descongelamento de frasco MWCB
<input type="checkbox"/>
Expansão de inóculo
<input type="checkbox"/>
Bio-reator de produção de 5000 L
<input type="checkbox"/>
Operação de coleta
<input type="checkbox"/>
Cromatografia de troca de ânions

<input type="checkbox"/>
Cromatografia de interação hidrofóbica
<input type="checkbox"/>
Inativação viral
<input type="checkbox"/>
Cromatografia por afinidade
<input type="checkbox"/>
Concentração/diafiltração
<input type="checkbox"/>
Filtração viral
<input type="checkbox"/>
Cromatografia de troca de ânions
<input type="checkbox"/>
Concentração/diafiltração
<input type="checkbox"/>
Enchimento final de substância de fármaco
<input type="checkbox"/>
Congelamento de substância de fármaco
<input type="checkbox"/>
Descongelamento de substância de fármaco

CTLA4-Ig é produzida em bio-reatores de produção de 5000 L com um volume de trabalho aproximado de 4300 L. Um lote de Substância de Fármaco de CTLA4-Ig é feita em um único bio-reator de produção derivado de um único frasco do banco de células. O processo de produção de cultura de célula a montante é iniciado usando um único frasco de células de um banco de célula. O frasco é descongelado e os conteúdos todos usados para cultivar um T-frasco contendo meio de crescimento de cultura de célula. As células são, então, expandidas em uma série de frascos para centrífuga. Frascos da etapa final de expansão de inóculo em frasco para centrífuga são usados para inocular o bio-reator de cultura de 140 L. O bio-reator de cultura de 140 L tem um volume de trabalho de aproximadamente 100 L. Os conteúdos do bio-reator de cultura de 140 L são usados para inocular o bio-reator de cultura de 1100 L. O bio-reator de produção de 1100 L tem um volume de trabalho de aproximadamente 600 L. Os conteúdos do bio-reator de cultura de 1100 L são usados para cultivar o bio-reator de produção de 5000 L. As células são cultivadas no bio-reator de produção de 5000 L durante aproxi-

madamente 14 dias. Após a etapa no bio-reator de produção, o caldo de cultura de célula de um único bio-reator é transferido para um vaso de coleta para processamento adicional. A unidade de microfiltração em fluxo tangencial (MF) é usada para separar a proteína de CTLA4-Ig secretada de células hospedeiras e resíduos de célula. O permeado de MF contendo proteína de CTLA4-Ig é, então, concentrado através de ultrafiltração (UF) e ajustado com relação ao pH e condutividade no preparado para a primeira etapa de cromatografia.

As etapas de purificação e processamento a jusante para Substância de Fármaco de CTLA4-Ig consistem de cromatografia de troca de ânions, cromatografia de interação hidrofóbica (HIC), inativação viral, cromatografia por afinidade, concentração por UF com fluxo tangencial e diafiltração, filtração viral, uma segunda cromatografia de troca de ânions e concentração por UF e diafiltração. A etapa de HIC utiliza múltiplos ciclos por lote de CTLA4-Ig, dependendo da quantidade de CTLA4-Ig a ser processada. Material em-processo de múltiplos ciclos de etapa de HIC é empoçados para a subsequente etapa de inativação viral. Material em-processo de diferente lotes não é empoçado. Múltiplos filtros virais podem ser usados em paralelo ao processo de um único lote de CTLA4-Ig. Após filtração viral, os filtrados são empoçadas para processamento adicional.

Cada Lote de CTLA4-Ig é filtrado através de um filtro de 0,2 μ m em garrafas de policarbonato (PC) de 2 L e temporariamente armazenado a 2 °C a 8 °C. As garrafas de PC de 2 L de CTLA4-Ig são congeladas em uma temperatura alvo de -70 °C e, então, armazenadas em uma temperatura alvo de -40 °C. Garrafas de Substância de Fármaco são descongeladas em uma incubadora a 22 °C a 24 °C e esfriadas para 2 °C a 8 °C antes de embarque.

Produção

CTLA4-Ig é produzida em cultura de célula em larga escala usando uma linhagem de célula de Ovário de Hâmster Chinês (CHO). O processo de produção de CTLA4-Ig a montante é iniciado com o descongelamento de um frasco congelado de um banco de célula. A cultura é propaga-

da em um T-frasco, seguido por uma série de culturas em frasco para centrífuga. Essas culturas são transferidas para um bio-reator de cultura de 140 L. A cultura do bio-reator de cultura de 140 L é transferida para um bio-reator de cultura de 1100 L. A cultura do bio-reator de cultura de 1100 L é usada para inocular um bio-reator de produção de 5000 L. Um bio-reator de produção é coletado primariamente baseado em uma proporção molar alvo de ácido siálico para proteína de CTLA4-Ig. A cultura de célula coletada é clarificada e concentrada usando uma combinação de microfiltração (MF) e ultrafiltração (UF). Finalmente, o material coletado isento de célula concentrado é ajustado para obter uma condutividade e pH específicos no preparo para processamento a jusante.

Cultura de células e Preparo de meio de alimentação

Componentes sólidos e líquidos do meio são pesados e medidos. Dois meios para cultura de células são usados no processo. Meio 127-G é usado nas etapas no T-frasco, frasco para centrifuga, bio-reator de cultura e bio-reator de produção. Meio 117-E é usado como um meio de alimentação na etapa no bio-reator de produção. A composição de meio 127-G é mostrada na tabela diretamente abaixo.

Componente	Concentração
CD-CHO 25x solúveis em ácido I	40,0 mL/L
CD-CHO 25x solúveis em ácido II	40,0 mL/L
CD-CHO 25x sais I	40,0 mL/L
CD-CHO 25x sais II	40,0 mL/L
L-Glutamina	0,585 g/L
Insulina r-humana (solução a 10 mg/mL)	0,1 mL/L
Metotrexato (solução a 20 mM)	5 µL/L
Bicarbonato de sodio	2,22 g/L
Água para injeção	Conforme requerido
Solução de HCl a 1 N	0 – 5 mL/L para ajustar o pH
Solução de NaOH a 10 N	0 – 10 mL/L para ajustar o pH

A composição de meio 117-E é mostrada abaixo.

Componente	Concentração
Meio eRDF-1	16,47 g/kg
Dextrose	30,29 g/kg
D- Galactose	12,38 g/kg
L- Glutamina	4,02 g/kg
Insulina r-humana (solução a 10 mg/mL)	0,98 mL/kg
Isolado de levedo TC	4,90 g/kg
Água para injeção	Conforme requerido
Solução de HCl a 1 N	0 – 5 mL/kg para ajustar o pH
Solução de NaOH a 10 N	0 – 2 mL/kg para ajustar o pH

A composição de meio e-RDF-1 está abaixo:

Componente	Concentração (mg/L)
Sulfato cúbrico 5 H ₂ O	0,0008
Sulfato ferroso 7 H ₂ O	0,220
Sulfato de magnésio (MgSO ₄)	66,20
Sulfato de zinco 7 H ₂ O	0,230
Piruvato de sódio	110,0
Ácido DL-lipóico tioctico	0,050
Ácido linoleico	0,021
L-alanina	6,68
L-arginina	581,44
L-asparagina	94,59
Ácido L-aspártico	39,93
L-cistina 2HCl	105,38
Ácido L-glutâmico	39,7
Glicina	42,8
L-histidina HCl-H ₂ O	75,47
L-isoleucina	157,40
L-leucina	165,30
L-lisina HCl	197,26
L-metionina	49,24
L-fenilalanina	74,30
L-prolina	55,3
L-hidróxiprolina	31,5
L-serina	85,10
L-treonina	110,8
L-triptofano	18,40
L-tirosina 2 Na H ₂ O	108,10
L-valina	108,9
Ácido para amino benzóico	0,51
Vitamina B12	0,339
Biotina	1,00
D-pantotenato de Ca	1,29

A tabela é continuada abaixo:

Componente	Concentração (mg/L)
Cloreto de colina	12,29
Acido Fólico	1,96
i-Inositol	46,84
Niaciamida	1,47
HCl piridoxal	1,00
HCl Piridoxina	0,420
Riboflavina	0,21
Tiamina HCl	1,59
Putrescina 2HCl	0,020

O meio de cultura 127-G usado no T-frasco e frascos de centrifugação no processo é preparado em vasos para meio equipados com um agitador para mistura e um cilindro de vidro graduado para determinação de volume. O tamanho de lote de meio 127-G usado para as etapas de expansão de inóculo no T-frasco e frasco para centrífuga é de 75 L. Meio 127-G é preparado usando Água Para injeção (WFI). Componentes sólidos e líquidos do meio são adicionados à WFI. O meio é misturado durante o período de tempo requerido após a adição de cada componente. WFI é adicionada para levar o meio ao volume final de lote de 75 L. A amostra é removida do preparado de meio final e a concentração de glicose, pH e osmolaridade da amostra são medidos para assegurar que o meio vai de encontro aos critérios de aceitação definidos. O meio é filtrado através de um filtro de 0,2 μ m e distribuído em garrafas estéreis de tereftalato de polietileno glicol (PETG). O meio 127-G preparado para a etapa de expansão de inóculo em T-frasco e frasco para centrífuga é armazenado a 2 °C a 8 °C durante um máximo de 42 dias. Meio 127-G para as etapas no bio-reator de cultura de 140 L e 1100 L é preparado em vasos equipados com um agitador para mistura. O tamanho de lote de meio 127-G usado na etapa no bio-reator de cultura de 140 L é de 120 L. O vaso usado para preparar o meio para o bio-reator de cultura de 140 L é equipado com um vidro com visor graduado para determinação de volume. O tamanho de lote de meio 127-G usado na etapa no bio-reator de cultura de 1100 L é de 600 kg. O vaso usado para preparar o meio para o bio-reator de cultura de 1100 L é equipado com um transmissor de pressão diferencial para determinação de peso.

Os volumes requeridos de meio 127-G são transferidos para os

bio-reatores de cultura de 140 L e 1100 L através de filtros de 0,2 μ m e 0,1 μ m consecutivos. O meio 127-G preparado para as etapas nos bio-reatores de 140 L e 1100 L pode ser mantido a 37 °C durante um máximo de 48 horas. O meio pode ser mantido a 4 °C durante mais 84 horas.

5 **Preparo de meios de cultura de célula 127-G e 117-E C usados em uma etapa no bio-reator de produção de 5000 L**

Meio 127-G para a etapa com o bio-reator de produção de 5000 L é preparado em um vaso de preparo de meio equipado com um agitador e transmissor de pressão diferencial para determinação de peso. O tamanho de lote de meio 127-G usado na etapa com o bio-reator de produção de 5000 L é de 2900 kg. O volume requerido de meio 127-G é transferido para o bio-reator de produção de 5000 L através de filtros consecutivos de 0,2 μ m e 0,1 μ m. O meio 127-G preparado para a etapa com o bio-reator de produção de 5000 L pode ser mantido a 37 °C durante um máximo de 48 horas. O meio pode ser mantido a 4 °C durante mais 84 horas.

Meio de alimentação 117-E é preparado em um vaso de preparo de meio equipado com um agitador para mistura e um transmissor de pressão diferencial para determinação de peso. O tamanho de lote de meio 117-E usado na etapa com o bio-reator de produção de 5000 L é de 1800 kg. Os componentes do meio 117-E são adicionados a um peso especificado de WFI no vaso de preparo de meio. O meio é misturado durante o período de tempo requerido após a adição de cada componente. WFI é adicionada para levar o meio ao peso final especificado. A amostra é removida do preparado de meio final e a concentração de glicose, pH e osmolaridade da amostra medidos de forma para assegurar que o meio vai de encontro aos critérios de aceitação definidos. O volume requerido de meio 117-E é transferido para um tanque de contenção de meio de alimentação através de filtros consecutivos de 0,2 μ m e 0,1 μ m. O meio 117-E preparado para a etapa com o bio-reator de produção de 5000 L pode ser mantido a 37 °C durante um máximo de 2 dias. O meio pode ser mantido a 4 °C durante mais 4 dias.

Etapas de expansão de inóculo em T-frasco e Frasco para centrifuga

O objetivo das etapas de expansão de inóculo em T-frasco e

frasco para centrifuga do processo de produção de CTLA4-Ig é propagar serialmente células do frasco com banco de células para proporcionar um número suficiente de células viáveis para inocular o bio-reator de cultura de 140 L. Um único frasco do banco de células é removido da fase vapor de um congelador de armazenamento de nitrogênio líquido e descongelado em um 5 banho de água a 37 °C. Os conteúdos todos do frasco são assepticamente transferidos para um tubo para centrifuga cônico de 15 mL estéril. Meio 127-G é adicionado para levar o volume final para 10 mL. A suspensão de célula é centrifugada, o sobrenadante descartado e a pelota de célula resuspensa em 10 mL de meio de cultura de célula 127-G. As células resuspensas são 10 transferidas para um frasco T-175 contendo 10 mL de meio 127-G. A densidade de células viáveis e a viabilidade percentual da cultura no frasco T-175 são determinadas. Uma viabilidade percentual nessa etapa de $\geq 84\%$ foi estabelecida. Meio 127-G é adicionado ao frasco T-175 para obter uma densidade alvo de células viáveis de $2,1 \times 10^5$ células/mL. 15

O frasco T-175 é incubado a 37 °C em uma atmosfera de dióxido de carbono a 6% durante um máximo de quatro dias para obter um número de células final alvo de $1,80 \times 10^7$ células viáveis. Após a etapa com frasco T-175, a cultura é expandida usando uma série de etapas frascos para cen- 20 trifuga de 0,25 L, 1 L e 3 L. Em cada passagem, as células são cultivadas em uma densidade alvo de $2,0 \times 10^5$ células viáveis/mL. As culturas em frasco para centrifuga são incubadas a 37 °C em uma atmosfera de dióxido de carbono a 6%.

Material de cultura de célula da etapa final de expansão de inóculo em frasco para centrifuga de 3 L é empoçado em um vaso de transfere- 25 ncia de inóculo esterilizado de 20 L. Uma densidade final de células viáveis na etapa de expansão de inóculo no frasco para centrifuga de 3 L de $1,0$ a $2,0 \times 10^6$ células/mL e uma viabilidade celular percentual mínima de $\geq 80\%$ foram estabelecidas. Esses valores exemplificativos asseguram que um 30 número suficiente de células viáveis é usado para inocular o bio-reator de cultura de 140 L. Um volume total de 12 L a 18 L da cultura de célula empoçada da etapa de expansão de inóculo final no frasco para centrifuga de 3 L

é usado para inocular o bio-reator de cultura de 140 L.

Etapas de expansão de inóculo em bio-reator de cultura de 140 L e 1100

L

O objetivo das etapas de expansão de inóculo em bio-reator de cultura de 140 L e 1100 L do processo de produção de CTLA4-Ig é proporcionar um número suficiente de células viáveis para inocular o bio-reator de produção de 5000 L. Os bio-reatores de cultura são operados no modo em batelada usando meio de cultura de célula 127-G. A temperatura, pH, oxigênio dissolvido, pressão, agitação e taxas de fluxo de gás para ar, oxigênio e dióxido de carbono são controlados através de um sistema de controle distribuído (DCS) e proporcionam condições para crescimento ótimo da cultura nos bio-reatores de cultura. Os bio-reatores de cultura são operados a 37 °C. As amostras de cultura são removidas dos bio-reatores de cultura para a determinação de densidade de células viáveis, viabilidade percentual e concentrações de metabólito.

O bio-reator de cultura de 140 L é inoculado com inóculo empacado da etapa de expansão de inóculo em frasco para centrífuga de 3 L para uma densidade alvo inicial de células viáveis de $2,0 \times 10^5$ células/mL. Uma densidade final de células viáveis na etapa de expansão de inóculo no bio-reator de cultura de 1100 L de $1,0$ a $2,5 \times 10^6$ células/mL e uma viabilidade celular percentual mínima de $\geq 80\%$ foram estabelecidas. Esses critérios de aceitação asseguram que um número suficiente de células viáveis é usado para inocular o bio-reator de produção de 5000 L. A cultura de célula do bio-reator de cultura de 1100 L é transferida para o bio-reator de produção de 5000 L para obter uma densidade inicial de células viáveis alvo de $1,5 \times 10^5$ células/mL.

Etapas no bio-reator de produção

O objetivo da etapa com o bio-reator de produção de 5000 L é expandir o número de células viáveis e produzir a proteína de CTLA4-Ig. A duração em um bio-reator de produção etapa é de aproximadamente 14 dias. Inóculo do bio-reator de cultura de 1100 L é cultivado em um bio-reator de produção de 5000 L contendo meio de cultura de célula 127-G. Um bio-

reator de produção é operado em um modo de alimentação em batelada. A temperatura, pH, oxigênio dissolvido, pressão, agitação e taxas de fluxo de gás para ar, oxigênio e dióxido de carbono são controlados através de DCS e proporcionam condições para crescimento ótimo da cultura e produção da proteína de CTLA4-Ig no bio-reator de produção.

Uma estratégia de controle de temperatura em três estágios é usada durante a etapa com o bio-reator de produção de 5000 L para otimizar o crescimento celular e produção de CTLA4-Ig. A temperatura de incubação inicial de um bio-reator de produção é controlada a 37°C para obter crescimento celular ótimo. A temperatura é diminuída para 34°C quando uma densidade de células viáveis de $4,0 \times 10^6$ células/mL é obtida no bio-reator de produção ou a 144 horas a partir do momento de inoculação, o que ocorrer primeiro. A temperatura é diminuída para 32°C a 240 horas e mantida a 32°C até coleta. Amostras diárias são obtidas do bio-reator de produção de 5000 L para monitorar o crescimento celular, viabilidade celular, concentrações de metabólito, titulação de CTLA4-Ig e a proporção molar de ácido siálico para proteína de CTLA4-Ig.

Alimentação de meio 117-E ao bio-reator de produção é iniciada entre 12 a 24 horas a partir do momento de inoculação. Meio 117-E é adicionado diariamente para obter um alvo de 1% (v/v) de meio de alimentação ao volume de cultura ou um volume suficiente do meio de alimentação 117-E para levar a concentração de glicose para 3 g/L. Essa estratégia de alimentação proporciona níveis suficientes de glicose e outros nutrientes à cultura para sustentar a produção de proteína de CTLA4-Ig durante a etapa em um bio-reator de produção.

Meio 117-E é suplementado com D-galactose para promover glicosilação aumentada de proteína de CTLA4-Ig. Suplementação com galactose resulta em um aumento no teor final de ácido siálico da proteína de CTLA4-Ig. A proporção molar de ácido siálico para proteína de CTLA4-Ig é um critério de coleta importante no processo de produção de CTLA4-Ig.

Uma estratégia com três estágios é também usada para controlar o oxigênio dissolvido e taxa de agitação no bio-reator de produção. A taxa

de agitação inicial de 30 rpm assegurar uniformidade de condições físicas e impede assentamento das células dentro do bio-reator de produção de 5000 L. O ponto de ajuste de oxigênio dissolvido inicial de 40% assegurar disponibilidade de níveis suficientes de oxigênio dissolvido para sustentar o crescimento da cultura no bio-reator de produção. Os pontos de ajuste para oxigênio dissolvido e taxa de agitação são aumentados a 96 horas a partir do momento de inoculação para 50% e 40 rpm, respectivamente. A 120 horas a partir do momento de inoculação, os pontos de ajuste para oxigênio dissolvido e taxa de agitação são ainda aumentados para 60% e 50 rpm, respectivamente. Essa estratégia assegurar níveis suficientes de oxigênio dissolvido para manter a cultura de célula durante a etapa no bio-reator de produção. A titulação de proteína de CTLA4-Ig aumenta durante o curso da etapa em um bio-reator de produção. A viabilidade da cultura é monitorada durante o curso dessa etapa. A proporção molar de ácido siálico para proteína de CTLA4-Ig é monitorada duas vezes diariamente a partir de 6 dias do momento de inoculação até o momento de coleta. A proporção molar de ácido siálico para proteína de CTLA4-Ig tem um pico a aproximadamente 10 em torno do dia 8 a partir do momento de inoculação e, então, diminui gradualmente durante o restante da etapa no bio-reator de produção. O critério de coleta primário para um bio-reator de produção é a proporção molar de ácido siálico para proteína de CTLA4-Ig. Um bio-reator de produção é coletado em um proporção molar alvo de ácido siálico para proteína de CTLA4-Ig de 8,0.

Um valor de viabilidade celular mínima de 38% foi também estabelecido para coleta da cultura. Esses critérios de coleta asseguram a consistência do material coletado em-processo para processamento a jusante à Substância de Fármaco de CTLA4-Ig. O número total de gerações de célula do início da expansão de inóculo até a coleta de um bio-reator de produção no processo de produção de CTLA4-Ig a montante é de aproximadamente 38 gerações. Foi demonstrado que a linhagem de célula usada no processo é estável durante 105 gerações em um estudo de estabilidade de linhagem de célula.

Etapas de operação de coleta

O objetivo das etapas de operação de coleta é remover células e resíduos de célula do material coletado e concentrar a corrente em-processo contendo proteína de CTLA4-Ig para processamento adicional a jusante. Os sistemas de MF e UF são sanitizados antes de processamento do material coletado. Os sistemas de MF e UF são submetidos a fluxo com uma solução de ácido peracético. Os sistemas de MF e UF são, então, tratados com uma solução de alvejamento e uma solução de hidróxido de sódio, respectivamente. Finalmente, os sistemas de MF e UF são submetidos a fluxo com WFI até uma condutividade de $\leq 3 \mu\text{S/cm}$ no retentado e permeado é obtida. O caldo de cultura de célula do bio-reator de produção de 5000 L é transferido para um vaso de coleta. MF em fluxo tangencial com membranas de fluoreto de polivinilideno de $0,65 \mu\text{m}$ é usada para a remoção de células e resíduos de célula do material coletado em-processo contendo proteína de CTLA4-Ig. O permeado de MF isento de células é coletado em vaso de permeado. O permeado de MF isento de células é simultaneamente concentrado através de UF em fluxo tangencial usando membranas de poliéter-sulfona com um corte de peso molecular nominal de 30 quilodáltons (kDa). O permeado de UF é usado como o meio de diafiltração para a etapa de processo de MF. Uma solução de ácido fosfórico a 0,1 N é usada para armazenamento do sistema de MF. Uma solução de hidróxido de sódio a 0,1 N é usada para armazenamento do sistema de UF. A temperatura, taxas de fluxo de permeado e retentado e pressões transmembrana são monitoradas e controladas durante a operação de MF e UF. As taxas de fluxo são medidas através de fluxômetros *in line* presentes sobre as rampas de filtração. Sensores são usados para medir a pressão e temperatura. Uma taxa de fluxo de retentado de MF de 163 a 235 L/min e uma pressão transmembrana de MF de $\leq 3,8$ psig foram estabelecidas. Esses valores assegurar consistência no desempenho das etapas de operação de coleta.

A etapa final na operação de coleta é um ajuste do pH e condutividade do material coletado em-processo clarificado e concentrado. O pH e condutividade do material coletado em-processo concentrado são ajustados para captura da proteína de CTLA4-Ig durante a primeira etapa de proces-

samento cromatográfico a jusante. O pH é ajustado para 8,0 através da adição de uma solução de Tris a 2 M e a condutividade do permeado concentrado é reduzida para 10 mS/cm através da adição de WFI. O material coletado em-processo concentrado e ajustado é, então, filtrado através de três alojamentos de filtro paralelos e um consecutivo contendo filtros descartáveis de 0,2 µm e transferido para um tanque na área de purificação a jusante.

Tabela 31: Composição de Meio CD-CHO

Componente	Concentração
CD-CHO 25x Solúveis em ácido I	40,0 mL/L
CD-CHO 25x Solúveis em ácido II	40,0 mL/L
CD-CHO 25x Sal concentrado I	40,0 mL/L
CD-CHO 25x Sal concentrado II	40,0 mL/L
L-Glutamina	0,585 g/L
insulina r-humana (solução a 10 mg/mL)	0,1 mL/L
Metotrexato (25 mg/mL de solução)	0,0018 mL/L
Bicarbonato de sódio	2,22 g/L
Água Para injeção	Conforme requerido
solução de HCl a 1 M	Conforme requerido para ajustar o pH
solução de NaOH a 10 N	Conforme requerido para ajustar o pH

Tabela 32: Composição de meio de alimentação eRDF

Componente	Concentração
meio eRDF-1	16,80 g/L
Dextrose	30,9 g/L
D-Galactose	12,6 g/L
L-Glutamina	4,10 g/L
insulina r-humana (solução a 10 mg/mL)	1,00 mL/L
Isolado de levedo TC	5 g/L
Água Para injeção	Conforme requerido
solução de HCl a 1 M	Conforme requerido para ajustar o pH
solução de NaOH a 10 N	Conforme requerido para ajustar o pH

EXEMPLO 35: Determinação de proporção molar de manose, fucose e galactose através de CE

10

Um método de eletroforese em capilar foi desenvolvido para a análise quantitativa do teor de monossacarídeo neutro em LEA2 C-TLA4^{A29YL104E}-Ig. Monossacarídeos neutros, incluindo manose, fucose e galactose, são liberados de amostras de CTLA4^{A29YL104E}-Ig através de hidrólise

ácida em uma condição de temperatura elevada (ácido trifluoroacético a 2M, 6 horas a 95°C). Os monossacarídeos neutros liberados são, então, fluorescentemente rotulados com ácido aminopireno tri-sulfônico (APTS), na presença de ácido acético como um catalisador e NaBH₃CN como um reagente de redução (APTS a 67mM, HAc a 330mM, NaBH₃CN a 83mM, 3 horas a 55°C). Xilose é adicionada a cada amostra e serve como um padrão interno. A proporção de a área de pico de cada monossacarídeo neutro contra aquela do padrão interno é utilizada para quantificação.

Reagentes: Solução de hidrólise (ácido trifluoroacético a 2M (TFA)); Solução de Derivatização I (ácido 8-aminó-1,3,6-tri-sulfônico a 0,1M, sal de trissódio (APTS) solução aquosa); Solução de Derivatização II (NaBH₃CN a 0,25M em ácido acético a 1M); Tampão de Operação (tetraborato de sódio a 60 □ 5 mM, pH9,25); Soluções de enxágüe de capilar (NaOH a 1N; HCl a 1N; metanol a 80%); Soluções de estoque de Padrão de Monossacarídeo de manose (Man), fucose (Fuc), galactose (Gal) e xilose (Xyl) em uma concentração de 10 mg/ml; Solução de trabalho de monossacarídeo I: Solução de trabalho de padrão interno é 100 vezes diluição de solução de estoque de Xyl; Solução de trabalho de monossacarídeo II: Solução de trabalho padrão de mistura neutras, 100 vezes diluição de soluções de estoque de Man, Fuc e Gal.

Instrumentação: O sistema de CE é Beckman P/ACE MDQ CE System; Detector: Sistema de detecção induzida a laser Beckman (LIF) acoplado com P/ACE MDQ); Capilar não revestido (d.i. de 25 □m, d.e. de 360 □m) comprimento total de 27-31 cm para acomodar P/ACE MDQ.

Condições de operação do capilar de eletroforese: Tampão de Operação (tetraborato de sódio a 60 mM, pH de 9,25); Temperatura de cartucho do capilar: 25°C; Tensão: 25-30 kV, modo positivo; Condição do detector: Detector LIF, excitação a 488 nm, emissão a 520 nm; Injeção de amostra: modo de injeção sob pressão, 20s a 0,5PSI; Tempo de operação: 10 min; Armazenamento de amostra: 10°C.

Hidrólise: 10 µL de Solução de trabalho de xilose e 200 µL de TFA a 2M foram misturados para fazer o sistema de placebo. 10 µL de Solu-

ção de trabalho de xilose e 10 µL de Solução de padrão de mistura neutra foram misturados com 200 µL de TFA a 2M para fazer o Padrão de monossacarídeo. 10 µL de Solução de trabalho de xilose e 10 µL de amostra (por exemplo, CTLA4^{A29YL104E}-Ig, aproximadamente 1 mg/ml) foram misturados com 200 µL de TFA a 2M para fazer a amostra de teste. Todos os tubos foram submetidos a turbilhonamento durante 10 seg e centrifugados durante 10 seg, seguido por incubação a 95°C durante 6 horas. Após a etapa de hidrólise, as amostras foram colocadas a -20°C durante 10 min para esfriar. As amostras foram centrifugadas durante 10 seg e evaporadas até secagem em um SpeedVac.

Derivatização: Amostras foram reconstituídas com 10 µL de Solução de Derivatização I. A amostra foi rapidamente misturada e 5 µL de Solução de Derivatização II foram adicionados. As amostras foram carregadas em uma centrífuga pré-aquecida e incubadas durante 3 horas a 55°C enquanto centrifugava a 2000 rpm.

Injeção de CE: O volume final das amostras após derivatização foi levado para 100 µL através da adição de água com grau para HPLC e 10 µL de amostras foram transferidos para um micro frasco para CE com 190 µL água com grau para HPLC. Antes de injeções de amostra, o cartucho de CE foi enxaguado extensivamente com água com grau para HPLC (tempo de operação de 1-3 min), seguido por um enxágue de equilíbrio com tampão de Operação (tempo de operação de 5 min). Após o enxágue inicial, padrões de monossacarídeo e amostras para análise foram injetados no cartucho de CE (tempo de operação de 15 min). Após a operação de injeção de cada padrão ou amostra de teste, o cartucho de CE foi enxaguado e equilibrado com água com grau para HPLC e tampão de Operação (Tabela 51). O eletroferograma da Adequabilidade de sistema deverá ser similar à FIG. 45, em que o pico 1 é manose; o pico 2 é xilose; o pico 3 é fucose; e o pico 4 é galactose.

Tabela 51. Método do instrumento

Tempo	Evento	Valor	Duração	Sumário	Descrição
	Enxaguar Pressão	40,0 psi	3,00 min	Dianteiro	Enxágüe com Água
	Enxaguar Pressão	40,0 psi	5,00 min	Dianteiro	Enxágüe com Tampão de Operação
	Injetar - Pressão	0,5 psi	20,00 sec	Override, dianteiro	Injeção
0,00 min	Separar Tensão	30 kV	15,00 min	Elevação de 0,17 min, polaridade normal	Separação
0,05 min	Auto Zero				
15,00 min	Dados terminais				
15,00 min	terminar				

ADEQUABILIDADE DE SISTEMA:

O eletroferograma da Adequabilidade de sistema deverá ser similar àquele mostrado na FIG. 45, onde o pico 1 é manose; o pico 2 é xilose; o pico 3 é fucose; e o pico 4 é galactose.

Quando outros instrumentos de CE que não o sistema Beckman MDQ são usados, o comprimento do capilar pode ser diferente daquele especificado nesse método. Isso causará variações no tempo de migração de analito, bem como na intensidade de pico. Mas o padrão de pico de analitos de monossacarídeo deverá permanecer o mesmo.

A resolução entre dois picos vizinhos para os primeiros Padrões de Adequabilidade de sistema pode ser calculada de acordo com a seguinte equação:

$$R = \frac{2(t_2 - t_1)}{W_1 + W_2}$$

onde:

R: resolução

t_2, t_1 : tempos de migração dos dois picos vizinhos respectivamente

W_1, W_2 : larguras de pico na linha de base dos dois picos vizinhos respectivamente

O valor R deve ser $\geq 1,0$. Se $R < 1,0$, enxaguar o capilar usando as seqüências de lavagem/enxágüe. Se o problema persiste, substituir o

tampão antigo por tampão de operação recentemente preparado ou substituir o capilar.

Para a última injeção de Adequabilidade de sistema, o último pico (galactose) deve ter um fator de configuração $<1,4$ usando a seguinte

5 fórmula:

$$T = W_{0,05}/2f$$

onde:

T: fator de configuração

$W_{0,05}$: largura de pico a 5% de altura

10 f: largura da frente de pico em pico máximo

Se $T \geq 1,4$, enxaguar o capilar com as seqüências de lavagem/enxágüe; se o problema persiste, substituir o tampão antigo por Tampão de Operação recentemente preparado ou substituir o capilar. Proporção de área de pico de galactose e xilose deve ter um RSD de $\leq 10\%$. O tempo de migração de galactose precisa ser $\leq 15,0$ minutos. O perfil de eletroferograma deverá ser equivalente à FIG. 45.

O RSD percentual para o padrão monossacarídico pode ser determinado através de comparação da proporção de áreas de pico do padrão interno e componentes de padrão de monossacarídeo dividindo a área de pico para cada componente monossacarídico pela área de pico do padrão interno para cada injeção de padrão de monossacarídeo. O RSD percentual pode ser calculado para manose, fucose e galactose. O RSD deverá ser $\leq 10\%$.

25 Determinação das proporções molares de Monossacarídeos neutros para Proteína

A proporção de áreas de pico de monossacarídeos neutros (por exemplo, Man, Gal e Fuc) com relação ao padrão interno Xilose pode ser calculada de acordo com as fórmulas proporcionadas abaixo de forma a determinar as proporções molares de cada monossacarídeo neutro para proteína. Por exemplo, a proporção de área de pico é igual à área de pico de monossacarídeo (Gal, Fuc ou Man) dividido pela Área de pico de xilose, em que o desvio padrão relativo (RSD) para a proporção de área de pico é igual a ou

menor do que 10%. As seguintes equações podem ser usadas para calcular o seguinte:

Para proporção molar de Manose/Proteína:

$$R_{man} = \frac{A_{man} \times A_{xyl0} \times V_{man0} \times C_{man0} \times MW_{LEA29Y}}{A_{xyl} \times A_{man0} \times V_p \times C_p \times 180.2}$$

onde:

- 5 R_{man} : proporção molar de manose vs. proteína
 A_{man} : área de pico (\square V.sec) de manose na amostra
 A_{xyl} : área de pico (\square V.sec) de xilose na amostra
 A_{xyl0} : área de pico (\square V.sec) média de xilose no padrão de monossacarídeo
- 10 A_{man0} : área de pico (\square V.sec) média de manose no padrão de monossacarídeo
 V_{man0} : volume de manose contida na solução de trabalho de monossacarídeo usada para hidrólise (em \square L)
 C_{man0} : concentração de manose contida na solução de trabalho de monossacarídeo usada para hidrólise (em mg/mL)
- 15 V_p : volume de amostra de proteína usada para hidrólise (em \square L)
 C_p : concentração de amostra de proteína usada para hidrólise (em mg/mL)
- 20 MW_{LEA29Y} : Peso molecular de LEA29Y (ou CTLA4^{A29YL104E}-Ig) (91,232 Da)
 MW de manose: 180,2 dáltons.

Para proporção molar de Fucose/Proteína:

$$R_{fuc} = \frac{A_{fuc} \times A_{xyl0} \times V_{fuc0} \times C_{fuc0} \times MW_{LEA29Y}}{A_{xyl} \times A_{fuc0} \times V_p \times C_p \times 164.2}$$

onde:

- 25 R_{fuc} : proporção molar de fucose vs. proteína
 A_{fuc} : área de pico (\square V.sec) de fucose na amostra
 A_{xyl} : área de pico (\square V.sec) de xilose na amostra

A_{xyl0} : área de pico (\square V.sec) média de xilose no padrão de monossacarídeo

A_{fuc0} : área de pico média (\square V.sec) de fucose no padrão de monossacarídeo

5 V_{fuc0} : volume de fucose contida na solução de trabalho de monossacarídeo usada para hidrólise (em \square L)

C_{fuc0} : concentração de fucose contida na solução de trabalho de monossacarídeo usada para hidrólise (em mg/mL)

V_p : volume de amostra de proteína usada para hidrólise (em μ L)

10 C_p : concentração de amostra de proteína usada para hidrólise (em mg/mL)

MWLEA29Y: Peso molecular de LEA29Y (ou CTLA4^{A29YL104E}-Ig) (91,232 Da)

MW de fucose: 164,2 dáltons.

15 **Para proporção molar de Galactose/Proteína:**

$$R_{gal} = \frac{A_{gal} \times A_{xyl0} \times V_{gal0} \times C_{gal0} \times MW_{LEA29Y}}{A_{xyl} \times A_{gal0} \times V_p \times C_p \times 180.2}$$

onde:

R_{gal} : proporção molar de galactose vs. proteína

A_{gal} : área de pico (\square V.sec) de galactose na amostra

20 A_{xyl} : área de pico (\square V.sec) de xilose na amostra

A_{xyl0} : área de pico (\square V.sec) média de xilose no padrão de monossacarídeo

A_{gal0} : área de pico (\square V.sec) média de galactose no padrão de monossacarídeo

25 V_{gal0} : volume de galactose contido na solução de trabalho de monossacarídeo usada para hidrólise (em \square L)

C_{gal0} : concentração de galactose contido na solução de trabalho de monossacarídeo usada para hidrólise (em mg/mL)

V_p : volume de amostra de proteína usada para hidrólise (em μ L)

30 C_p : concentração de amostra de proteína usada para hidrólise (em mg/mL)

MWLEA29Y: Peso molecular de LEA29Y (ou CTLA4^{A29YL104E}-Ig)

(91,232 Da)

MW galactose: 180,2 daltos.

Tabela 52: Proporo molar media de Monossacardeo para protena de CTLA4^{A29YL104E}-Ig

MONOSSACARDEO	FAIXA
Manose	11-23
Fucose	4,2-7,5
Galactose	9,2-18

5 **EXEMPLO 36: Determinao da proporo molar de GalNAc e GlcNAc atravs de CE**

Um mtodo de eletroforese em capilar foi desenvolvido para a anlise quantitativa do teor de amino monossacardeo em CTLA4^{A29YL104E}-Ig, uma glicoprotena com 6 stios de glicosilao N-ligada e pelo menos 1 stio de glicosilao O-ligada. Amino monossacardeos, incluindo N-acetil galactosamina (GalNAc) e N-acetil glicosamina (GlcNAc), so liberados da amostra de CTLA4^{A29YL104E}-Ig atravs de hidrlise cida em uma condio de temperatura elevada (HCl a 4N, 6 horas a 95 C). Os amino monossacardeos liberados vo para a etapa de re-acetilao atravs de incubo com anidrido actico sobre gelo durante meia hora. Eles so, ento, fluorescentemente rotulados com cido aminopireno tri-sulfnico (APTS), na presena de cido actico como um catalisador e NaBH₃CN como um reagente de reduo (APTS a 67 mM, HAc a 330 mM, NaBH₃CN a 83 mM, 3 horas a 55 C). N-acetil manosamina  adicionada a cada amostra e serve como um padro interno. A proporo da rea de pico de cada amino monossacardeo contra aquela do padro interno  utilizada para quantificao.

Reagentes: Soluo de hidrlise (HCl a 4N); Soluo de Derivatizao I (cido 8-amino-1,3,6-tri-sulfnico a 0,1M, sal de trissdio (APTS) soluo aquosa); Soluo de Derivatizao II (NaBH₃CN a 0,25M em cido actico a 1M); Tampo de re-acetilao (bicarbonato de sdio a 25 mM, pH9,5); Tampo de Operao (tetraborato de sdio a 60 ± 5 mM, pH de

9,25); Soluções de enxágüe de capilar (NaOH a 1N; HCl a 1N; metanol a 80%); Soluções de estoque de Padrão de Monossacarídeo de GalNAc, GlcNAc e ManNAc em uma concentração de 10 mg/ml; Solução de trabalho de monossacarídeo I: Solução de trabalho de padrão interno é 100 vezes diluição de solução de estoque de ManNAc; Solução de trabalho de monossacarídeo II: Solução de Trabalho Padrão de Mistura Amino, 100 vezes diluição de soluções de estoque de GalNAc e GlcNAc.

Instrumentação: O sistema de CE é Beckman P/ACE MDQ CE System; Detector: Sistema de detecção induzida a laser Beckman (LIF) acoplado com P/ACE MDQ).

Condições de operação do capilar de eletroforese: Tampão de Operação (tetraborato de sódio a 60 mM, pH de 9,25); Temperatura de cartucho do capilar: 25°C; Tensão: 25-30 kV, modo positivo; Condição do detector: Detector LIF, excitação a 488 nm, emissão a 520 nm; Injeção de amostra: modo de injeção sob pressão, 20s a 0,5PSI; Tempo de operação: 10 min; Armazenamento de amostra: 10°C.

Hidrólise: 10 μ L de solução de trabalho de ManNAc e 200 μ L de HCl a 4N foram misturados para fazer o sistema de placebo. 10 μ L de solução de trabalho de ManNAc e 10 μ L de Solução Padrão de Mistura Amino foram misturados com 200 μ L de HCl a 4N para fazer o Padrão de monossacarídeo. 10 μ L de solução de trabalho de ManNAc e 10 μ L de amostra (por exemplo, amostra de CTLA4^{A29YL104E}-Ig, etc.; aproximadamente 1 mg/ml) foram misturados com 200 μ L de HCl a 4N para fazer a amostra de teste. Todos os tubos foram submetidos a turbilhonamento durante 10 seg e centrifugados durante 10 seg, seguido por incubação a 95°C durante 6 horas. Após a etapa de hidrólise, as amostras foram colocadas a -20°C durante 10 min para esfriar. As amostras foram centrifugadas durante 10 seg e evaporadas até secagem em um SpeedVac.

Re-acetilação: Amostras hidrolisadas e secas foram reconstituídas com 20 μ L de tampão de re-acetilação e 4 μ L de anidrido acético, seguido por mistura e com incubação sobre gelo (30 min). As amostras foram centrifugadas durante 10 seg e evaporadas até secagem em um SpeedVac.

As amostras foram, cada uma, reconstituídas com 100 µl de água com grau para HPLC e foram evaporadas até secagem com um SpeedVac.

Derivatização: Amostras reconstituídas (10 µL de Solução de Derivatização I HPLC) foram fornecidos 5 µL de Solução de Derivatização II.

- 5 Após mistura, as amostras foram carregadas em uma centrífuga pré-aquecida e incubadas durante 3 horas a 55°C enquanto centrifugava a 2000 rpm.

- Injeção de CE:** O volume final das amostras após derivatização foi levado para 100 µL através da adição de água com grau para HPLC e 10 µL de amostras foram transferidos para um micro frasco para CE com 190 µL água com grau para HPLC. Antes de injeções de amostra, o cartucho de CE foi enxaguado extensivamente com água com grau para HPLC (tempo de operação de 1-3 min), seguido por um enxágue de equilíbrio com tampão de Operação (tempo de operação de 5 min). Após o enxágue inicial, padrões de monossacarídeo e amostras para análise foram injetados no cartucho de CE (tempo de operação de 10 min). Após a operação de injeção de cada padrão ou amostra de teste, o cartucho de CE foi enxaguado e equilibrado com água com grau para HPLC e tampão de Operação. O eletroferograma da Adequabilidade de sistema deverá ser similar à FIG. 46, em que o pico 1 é GalNAc; o pico 2 é ManNAc; e o pico 3 é GlcNAc.

Tabela 53. Método no Instrumento

Tempo	Evento	Valor	Duração	Sumário	Descrição
	Enxaguar - Pressão	40,0 psi	3,00 min	Dianteiro	Enxágüe com água.
	Enxaguar - Pressão	40,0 psi	5,00 min	Dianteiro	Enxágüe com tampão de Operação
	Injetar - Pressão	0,5 psi	20,00 seg	override, dianteiro	Injeção
0,00 min	Separar - Tensão	30 kV	10,00 min	Elevação de 0,17, polaridade normal	Separação
0,05 min	Auto Zero				
10,00 min	Dados terminais				
10,00 min	Terminar				

ADEQUABILIDADE DE SISTEMA:

- O eletroferograma da Adequabilidade de sistema deverá ser similar àquele mostrado na FIG. 46, onde o pico 1 é GalNAc; o pico 2 é ManNAc; e o pico 3 é GlcNAc

Quando outros instrumentos de CE que não o sistema Beckman MDQ são usados, o comprimento do capilar pode ser diferente daquele especificado nesse método. Isso causará variações no tempo de migração de analito, bem como na intensidade de pico. Mas o padrão de pico de analitos de monossacarídeo permanecerá o mesmo.

A resolução entre dois picos vizinhos para os primeiros Padrões de Adequabilidade de sistema pode ser calculada de acordo com a seguinte equação:

$$R = \frac{2(t_2 - t_1)}{W_1 + W_2}$$

onde:

R: resolução

t_2, t_1 : tempos de migração dos dois picos vizinhos respectivamente

W_1, W_2 : larguras de pico na linha de base dos dois picos vizinhos respectivamente

O valor R deve ser $\geq 1,0$. Se $R < 1,0$, enxaguar o capilar usando as seqüências de lavagem/enxágüe. Se o problema persiste, substituir o tampão antigo por tampão de operação recentemente preparado ou substituir o capilar.

Para a última injeção de Adequabilidade de sistema, o último pico (GlcNAc) deve ter um fator de configuração $< 1,4$ usando a seguinte fórmula:

$$T = W_{0,05} / 2f$$

onde:

T: fator de configuração

$W_{0,05}$: largura de pico a 5% de altura

f: largura da frente de pico em pico máximo

Se $T \geq 1,4$, enxaguar o capilar com as seqüências de lavagem/enxágüe; se o problema persiste, substituir o tampão antigo por Tampão de Operação recentemente preparado ou substituir o capilar. A proporção das áreas de pico de GlcNAc e ManNAc deve ter um RSD de $\leq 10\%$. O

tempo de migração de GlcNAc deve ser $\leq 10,0$ minutos. O perfil de eletroferograma deverá ser equivalente à FIG. 46,

O RSD percentual para o padrão monossacarídico pode ser determinado através de comparação da proporção de áreas de pico do padrão interno e componentes do padrão de monossacarídeo dividindo a área de pico para cada componente monossacarídico pela área de pico do padrão interno para cada injeção de padrão de monossacarídeo. O RSD percentual pode ser calculado para GalNAc e GlcNAc. O RSD deverá ser $\leq 10\%$.

10 Determinação das proporções molares de Amino monossacarídeos para Proteína

A proporção de áreas de pico de Amino monossacarídeos (por exemplo, GalNAc e GlcNAc) com relação ao padrão interno ManNAc pode ser calculada de acordo com as fórmulas proporcionadas abaixo de forma a determinar as proporções molares de cada amino monossacarídeo para proteína. Por exemplo, a proporção de área de pico é igual à área de pico de monossacarídeo (GalNAc ou GlcNAc) dividido pela área de pico de ManNAc, em que o desvio padrão relativo (RSD) para a proporção de área de pico é igual a ou menor do que 10%. As seguintes equações podem ser usadas para calcular:

20

Para proporção molar de GalNAc/Proteína:

$$R_{GalNAc} = \frac{A_{GalNAc} \times A_{ManNAc0} \times V_{GalNAc0} \times C_{GalNAc0} \times MW_{LEA29Y}}{A_{ManNAc} \times A_{GalNAc0} \times V_p \times C_p \times 221.2}$$

onde:

- 25 R_{GalNAc} : proporção molar de GalNAc vs. proteína
 A_{GalNAc} : área de pico (\square V.sec) de GalNAc na amostra
 A_{ManNAc} : área de pico (\square V.sec) de ManNAc na amostra
 $A_{ManNAc0}$: área de pico (\square V.sec) média de ManNAc no padrão de monossacarídeo
 $A_{GalNAc0}$: área de pico (\square V.sec) média de GalNAc no padrão de monossacarídeo
 30 $V_{GalNAc0}$: volume de GalNAc contido em solução de trabalho de monossacarídeo usada para hidrólise (em \square L)

C_{GalNAc0} : concentração de GalNAc contido na solução de trabalho de monossacarídeo usada para hidrólise (em mg/mL)

V_p : volume de amostra de proteína usada para hidrólise (em μL)

5 C_p : concentração de amostra de proteína usada para hidrólise (em mg/mL)

MWLEA29Y: Peso molecular de LEA29Y (ou CTLA4^{A29YL104E}-Ig) (91,232 Da)

MW GalNAc: 221,2 Dáltons.

Para proporção molar de GlcNAc/Proteína:

10
$$R_{\text{GlcNAc}} = \frac{A_{\text{GlcNAc}} \times A_{\text{ManNAc0}} \times V_{\text{GlcNAc0}} \times C_{\text{GlcNAc0}} \times MW_{\text{LEA29Y}}}{A_{\text{ManNAc}} \times A_{\text{GlcNAc0}} \times V_p \times C_p \times 221.2}$$

onde;

R_{GlcNAc} : proporção molar de GlcNAc vs. proteína

A_{GlcNAc} : área de pico ($\mu\text{V}\cdot\text{seg}$) de GlcNAc na amostra

A_{ManNAc} : área de pico ($\mu\text{V}\cdot\text{seg}$) de ManNAc na amostra

15 A_{ManNAc0} : área de pico ($\mu\text{V}\cdot\text{seg}$) média de ManNAc no padrão de monossacarídeo

A_{GlcNAc0} : área de pico ($\mu\text{V}\cdot\text{seg}$) média de GlcNAc no padrão de monossacarídeo

20 V_{GlcNAc0} : volume de GlcNAc contido em solução de trabalho de monossacarídeo usada para hidrólise (em μL)

C_{GlcNAc0} : concentração de GlcNAc contido em solução de trabalho de monossacarídeo usada para hidrólise (em mg/mL)

V_p : volume de amostra de proteína usada para hidrólise (em μL)

25 C_p : concentração de amostra de proteína usada para hidrólise (em mg/mL)

MWLEA29Y: Peso molecular de LEA29Y (ou CTLA4^{A29YL104E}-Ig) (91,232 Da)

MW GlcNAc: 221,2 Dáltons

Tabela 54: Proporção molar média de moles Monossacarídeo para moles de proteína de CTLA4^{A29YL104E}-Ig

MONOSSACARÍDEO	FAIXA
GalNAc	2,0-3,2
GlcNAc	18-32

EXEMPLO 37: OBTENÇÃO DE PERFIL DE CARBOIDRATO N-LIGADO DE OLIGOSSACARÍDEO DE CTLA4^{A29YL104E}-Ig ATRAVÉS DE CROMA-

5 TOGRAFIA DE TROCA DE ÂNIONS DE ELEVADO DESEMPENHO

As estruturas de carboidrato presentes sobre glicoproteínas podem afetar sua função e *clearance in vivo*. Portanto, é importante monitorar a consistência estrutural dos carboidratos de lotes recombinantemente produzidos de glicoproteínas. Aqui, carboidratos N-ligados (asparagina-ligados) presentes sobre CTLA4^{A29YL104E}-Ig são monitorados. Nesse método, oligossacarídeos são clivados através de digestão enzimática com PNGase F (Peptídeo: N-Glicosidase F), separados através de cromatografia de troca de ânions de elevado desempenho (HPAEC) e monitorados através de detecção eletroquímica (amperometria integrada). O cromatograma gerado é o perfil de carboidrato N-ligados, em que perfis de amostras de CTLA4^{A29YL104E}-Ig deverão ser similares ao mesmo.

Reagentes para Fases móveis para Isolamento dos oligossacarídeos através de HPLC em fase reversa e carbono grafitado:

Eluente 1 (ácido trifluoroacético a 0,05% (TFA) em água com grau para HPLC); Eluente 2: (TFA a 0,05% em acetonitrilo a 60% (ACN), 40% de água para HPLC (60: 40, ACN: H₂O)); Eluente 3: TFA a 0,05% em acetonitrilo a 40%, isopropanol a 40% (IPA), 20% de água para HPLC (40: 40: 20, ACN: IPA: H₂O)).

25 Reagentes para o preparo de Fases móveis para obtenção de perfil de carboidrato de oligossacarídeo por HPAEC:

Eluente 1: acetato de sódio a 500 mM (NaOAc); Eluente 2: hidróxido de sódio a 400 mM (NaOH); água Milli-Q; Hidróxido de sódio a 4M (aproximadamente NaOH a4M); tampão de fosfato de sódio a 50 mM, azida

de sódio a 0,02%, pH = 7,5; Solução de trabalho de enzima PNGase F em tampão de fosfato de sódio a 50 mM, azida de sódio a 0,02%, pH = 7,5; Solução de estoque de estaquiase (1,25 mg/mL); Padrão de Adequabilidade de Sistema de Estaquiase (12,5 µg/mL).

5 INSTRUMENTAÇÃO E CONDIÇÕES - (instrumentação equivalente pode ser usada)

Instrumentação:

Sistema Alliance HPLC equipado com amostrador automático com temperatura controlada calibrado (37°C), um aparelho de troca de válvula Rheodyne e detector de UV	Waters Corporation
Synergi 6-coluna selector	Phenomenex, (Catálogo No. AV0-6080)
Coluna 1: Luna 5µ, C18(2) 4,6 x 150 mm	Phenomenex, (Catálogo No. 00F-4252-E0)
Coluna 2: HyperCarb 5µ 4,6 mm x 100 mm	Phenomenex, (Catálogo No. CH0-3301)
O sistema Dionex DX-500 HPLC inclui: Módulo de bomba de gradiente GP50 Amostrador automático AS50 (refrigerado) Módulo de Eluente Degas Cromatografia de líquido Módulo detector ED40 DX LAN Software PeakNet (versão 5.1 ou atual) sobre um sistema de computador adequado	Dionex Corporation
Coluna: CarboPac PA-1 4 x 250 mm	Dionex Corporation, (Catálogo No. 35391)
Coluna de proteção: CarboPac PA-1 4 x 50 mm	Dionex Corporation, (Catálogo No. 43096)
Sistema de coleta de dados Millennium	Versão 3.2

- Preparo de amostra:** A um tubo de Eppendorf de 1,7 mL, 80 µL de tampão de fosfato de Na a 50 mM contendo azida de Na a 0,02%, pH de 7 e 80 µL de amostra (25 µg/µL para um total de 2 mg de CTLA4^{A29YL104E}, Ig, etc.) foram adicionados, seguido por 16 µL de 10X Tampão de desnaturação (SDS a 5%, β-Mercaptoetanol a 10%). As amostras foram misturadas

totalmente e subseqüentemente levadas à ebulição durante 2 minutos para desnaturar as proteínas. Os frascos foram esfriados para a temperatura ambiente, então, 16 μ L de NP40 (10%) e 40 μ L da solução de trabalho de PN-Gase F foram adicionados e subseqüentemente misturados. Após as amostras terem sido incubadas a 37°C durante 24 \pm 2 horas, elas foram transferidas para um frasco para amostrador automático de HPLC, pronto para injeção sobre o instrumento de HPLC.

Condições de cromatografia para Isolamento de oligossacarídeo:

Temperatura da coluna	Ambiente (22-25°C)		
Programa de taxa de fluxo	Inicial a 30,0 min 1,0 mL/min 30,0 a 35,0 min, 1,0-2,0 " 35,0 a 40,0 min, 2,0-1,0 " 40,0 a 50,0 min, 1,0 " 50,0 a 60,0 min, 1,0-0,1 "		
Fases móveis e condições de gradiente	Programa de gradiente		
1: TFA a 0,05%	Tempo		
2: TFA a 0,05%	<u>(min)</u>	<u>%1</u>	<u>%2</u> <u>%3</u>
em ACN/H ₂ O (60: 40)			
3: TFA a 0,05% em ACN/IPA/H ₂ O (40/40/20)	Inicial	100	0 0
	15,00	80	20 0
	15,01	0	100 0
	25,00	0	100 0
	30,00	0	0 100
	35,00	0	0 100
	40,00	100	0 0
	50,00	100	0 0
	60,01	100	0 0
Temperatura do amostrador automático	37°C		
Volume de injeção	100 μ L		
Tempo de operação	50 minutos		
Tempo de coleta de dados	50 minutos		
Eventos de troca de coluna para 6 válvulas de troca de coluna e aparelho Waters Alliance Rheodyne	Tempo <u>(min)</u>	Evento	Função
	Inicial	Chave 1	Desligada
	Inicial	Chave 2	Ligada
	Inicial	Chave 3	Ligada
	Inicial	Chave 4	Desligada
	11,0	Chave 4	Ligada
	30,0	Chave 4	Desligada

30,0	Chave 1	Ligada
30,0	Chave 2	Desligada
40,0	Chave 2	Ligada
40,0	Chave 1	Desligada

Condições de cromatografia para perfil de Oligo através de cromatografia

de troca de íons:

Temperatura da coluna	Ambiente (22-25°C)		
Taxa de fluxo	1 mL/min		
Fases móveis e condições de gradiente	Programa de gradiente *o segundo valor para algumas etapas de gradiente indica a extensão até a qual o gradiente pode ser modificado de forma a ajustar o tempo de retenção do Padrão de Adequabilidade de Sistema		
1: NaOAc a 500 mM	Tempo		
2: NaOH a 400 mM	<u>(min)</u>	<u>%1</u>	<u>%2</u>
3: água Milli-Q			<u>%3</u>
	Inicial	0	50-35
	0,0	0	50-35
	1,0	0	50-35
	2,0	4	50-40
	60,0	45	50
	61,0	0	50
	80,0	0	50
Ajustes do detector ED40			
Modo	Amperometria integrada		
Potenciais aplicados	<u>Tempo</u>	<u>Integ. Pot.</u>	
	0,00	+0,05	
	0,20	+0,05	começo
	0,40	+0,05	fim
	0,41	+0,75	
	0,60	+0,75	
	0,61	-0,15	
	1,00	-0,15	
Faixa	200 nC		
Setup de resultado analógico	Resultado = offset Posição Zero = 5% da escala total Volts de escala total = 1,0 v Tempo de elevação = 1 seg Polaridade = +		

Temperatura do amostrador automático	4°C
Volume de injeção	30 µL
Tempo de operação	80 minutos
Tempo de retenção aproximado (RT; minutos) de acordo com RT do Padrão de Adequabilidade de Sistema (SS)	Tempo de retenção aproximado (min)

<u>SS:</u>	<u>9,6</u>
Pico 1A:	10,5
Pico 1B:	11,5
Pico 1C:	12,5
Pico 1D:	13,5
Pico 1E:	15,0
Pico 2:	24,5
Pico 3:	37,5

As amostras de CTLA4^{A29YL104E}-Ig podem ter um perfil de carboidrato representado no cromatograma da FIG. 47. Os tempos de retenção de cada domínio, conforme identificado na FIG. 47, deverão ser aproximadamente:

5	Domínio I (Pico 1A, 1B, 1C, 1D e 1E)	10-17 min
	Domínio II:	21-29 min
	Domínio III:	33-43 min
	Domínio IV:	48-56 min

10 Tempos de retenção são dependentes do sistema e deverão se desviar similarmente à estaquiose.

Cálculos

15 **Placas teóricas (N):** O número de placas teóricas (N) pode ser determinado baseado no pico de estaquiose usando a fórmula abaixo. Isso é feito através do sistema de análise de dados Millennium ou pode também ser feito manualmente.

$$N = 16 (t / W)^2$$

onde:

20 t: tempo de retenção medido a partir do momento de injeção até o momento de eluição de pico na altura máxima.

W: largura de pico através de extrapolação dos lados para a li-

nha de base.

N deve ser ≥ 6000 . Se a contagem de placa é menor do que 6000, a coluna deverá ser substituída.

Fator de configuração (T): O fator de configuração da coluna (T) pode ser calculado baseado no pico de estaquiouse usando a fórmula abaixo. Isso é feito através do sistema de análise de dados Millennium ou pode também ser feito manualmente.

$$T = (W_{0,05} / 2f)$$

onde:

10 $W_{0,05}$: largura de pico a 5% de altura (0,05h).

f: a medida (largura) da borda frontal de pico a $W_{0,05}$ para o meio do pico na altura máxima.

T deve ser $\geq 1,2$. Se o fator de configuração é maior do que 1,2, a composição de tampão deverá ser avaliada, a coluna deverá ser substituída ou limpa.

área de Domínio %:

Domínio I: Soma das áreas de pico em tempos de retenção aproximados de 10 -15 minutos (Picos 1A-1E; por exemplo, FIG. 47)

20 Domínio II: Soma dos picos de 21 - 27 minutos

Domínio III: Soma dos picos de 34 -40 minutos

Domínio IV: Área de pico para os Picos a 45 -56 minutos

$$\text{Área percentual de domínio} = \frac{\text{Área de domínio individual}}{\text{Soma de todas as áreas de domínio}} \times 100$$

Área de pico principal percentual: A Área de pico % para cada um dos principais cinco picos pode ser calculada para o seguinte usando a equação abaixo: Picos 1A, 1B, 1C, 2 (duas espécies não decompostas), 3 (duas espécies não decompostas) e 4.

$$\text{Área percentual de pico} = \frac{\text{Área de pico para pico individual}}{\text{Soma de todas as áreas de domínio}} \times 100$$

EXEMPLO 38: IDENTIFICAÇÃO ELETROFORÉTICA EM CAPILAR DE CTLA4^{A29YL104E}-Ig EM SUBSTÂNCIA DE FÁRMACO E PRODUTO DE FÁRMACO

5 CTLA4^{A29YL104E}-Ig é uma glicoproteína solúvel em água com atividade imunossupressora. Um método de eletroforese em capilar usando um capilar de sílica não revestido foi usado para a identificação de CTLA4^{A29YL104E}-Ig. As amostras (por exemplo, CTLA4^{A29YL104E}-Ig, etc.) são aquecidas durante 5 minutos a 70°C e, então, analisadas imediatamente através de detecção de UV ajustada a 214 nm para confirmar a identificação.

10 Adicionalmente, uma mistura a 1:1 de CTLA4^{A29YL104E}-Ig e material de CTLA4-Ig foi misturada e injetada para confirmar que as duas proteínas poderiam ser separadas e diferenciadas. Esse método pode distinguir entre CTLA4^{A29YL104E}-Ig de CTLA4-Ig através de comparação do tempo de migração do material de CTLA4^{A29YL104E}-Ig com a amostra.

15 **EQUIPAMENTO (equipamento equivalente pode ser substituído):**

Instrumento de eletroforese em capilar	Beckman P/ACE MDQ
Módulo detector	UV a 214 nm
Capilar	Polymicro Technologies Inc., 360 µm o.d./75µm d.i., não revestido, (Parte No. 2000019, TSP075375)
Marcador de janela de capilar	MicroSolve Technology, (Catálogo No. 07200-S)

REAGENTES E SOLUÇÕES: Tampão de Operação (borato de sódio a 14,4 mM; dodecil sulfato de sódio a 17,3 mM; acetonitrilo a 2,0%); tampão de diluição de fosfato (fosfato de sódio a 22,3 mM, dibásico; fosfato de sódio a 4,2 mM, monobásico; cloreto de sódio a 53,4 mM); Tampão de diluição de borato (NaBO₂ a 8,5 mM, pH de 9,6); soluções de trabalho de referência ou amostra (10 ±1 mg/mL de amostra em tampão de diluição de fosfato); soluções de injeção de referência ou amostra (10,0 µL de amostra + 50 µL de tampão de diluição de borato); Amostra 1: 1 solução de mistura de CTLA4-Ig- CTLA4^{A29YL104E}-Ig (10,0 µL de amostra de CTLA4-Ig + 10,0 µL de amostra de CTLA4^{A29YL104E}-Ig + 50 µL de tampão de diluição de borato); so-
25 lução de injeção.

CONDIÇÕES DE OPERAÇÃO:

Comprimento de onda do detector de UV	214 nm
Taxa de dados	4 Hz
Largura de pico (pontos)	16-25
Injeção	10 segundos (0,5 psi)
Comprimento total *	~ 60 cm
Comprimento efetivo do capilar**	~ 50 cm
Temperatura de cartucho do capilar	15°C
Tensão	19kV-23kV
Tempo de operação	15 minutos

* **Comprimento total:** da entrada para a saída do capilar

** **Comprimento efetivo:** da entrada do capilar para a janela de detecção

5 O tempo de migração de amostra de CTLA4-Ig do pico principal é cerca de $11,0 \pm 0,4$ minutos. O tempo de migração de amostra de CTLA4^{A29YL104E}-Ig do pico principal é cerca de $12,0 \pm 0,4$ minutos. Os tempos de migração do pico principal entre cada amostra deverão estar a pelo menos 0,6 minutos de distância (FIG. 48).

10 **EXEMPLO 39: Hidrólise e análise por HPLC para determinação do teor de ácido N-acetil neuramínico e ácido N-glicolil neuramínico em CTLA4^{A29YL104E}-Ig**

15 O grau de sialilação em proteínas recombinantes pode afetar a farmacocinética e taxa de clearance. CTLA4^{A29YL104E}-Ig é uma proteína recombinante que possui sítios de carboidrato N- e O-ligado. As glicanas que ocupam esses sítios possuem graus variáveis de sialilação. Além de heterogeneidade estrutural de sua sialilação, o teor de ácido siálico individual poderia variar de lote para lote. Uma medição global da proporção de ácido siálico para proteína é, portanto, obtida.

20 O teor de ácido N-Acetil Neuramínico (NANA) e ácido N-glicolil neuramínico (NGNA) presentes em CTLA4^{A29YL104E}-Ig foi examinado. Os ácidos siálicos são liberados da proteína através de hidrólise ácida e, então, fluorescentemente rotulados com DMB. Os ácidos siálicos rotulados são separados sobre uma coluna RP-HPLC C-18 e quantificados a partir de um
25 fator de resposta de um padrão de ácido siálico concorrentemente operado.

Análise de dados e valores reportados (como proporção molar de NANA ou NGNA para proteína) são especificados nesse método exemplificativo. Esse Exemplo descreve o método usado para determinar a quantidade de ácido N-Acetil Neuramínico (NANA) e ácido N-glicolil neuramínico (NGNA) presentes em CTLA4^{A29YL104E}-Ig. Os ácidos siálicos são liberados da proteína através de hidrólise ácida. Os NANA e NGNA liberados são, então, fluorescentemente rotulados com 1, 2,-diamino-4, 5-metilenóxibenzeno (DMB). Os ácidos siálicos rotulados são separados sobre uma coluna RP-HPLC C-18 e detectados através de detecção fluorescente (Ex = 373 nm, em = 448 nm). NANA e NGNA são quantificados baseado nos fatores de resposta dos padrões de NANA e NGNA concorrentemente operados. Os resultados do teste são reportados como proporção molar (MR) de NANA e NGNA para proteína, respectivamente.

Reagentes e Soluções: H₂SO₄ a 1,0 M; H₂SO₄ a 50 mM; reagente de rotulação por fluorescência (hidro-sulfito de sódio a 18 mM (Na₂S₂O₄), 2-mercaptoetanol a 7%, dihidrocloreto de 1,2-diamino-4,5-metileno-dióxibenzeno a 7 mM (DMB)); Tampão de Operação de Fase móvel A (Metanol a 20%); Tampão de Operação de Fase móvel B (Metanol a 70%); solução padrão de ácido N-acetil neuramínico (1 mg/mL); solução padrão de ácido N-glicolil neuramínico (1 mg/mL); Padrões de Adequabilidade de sistema (50 µL das soluções de NANA ou NGNA em 900 µL de água); Solução de amostras (por exemplo, 2 mg/ml de CTLA4^{A29YL104E}-Ig, etc.); Solução de padrão de estoque de trabalho de NANA (diluir estoque para 50 µg/mL); solução de padrão de Estoque de trabalho de NGNA (diluir estoque para 50 µg/mL).

Hidrólise: 20 µL de cada um de padrão de NANA, padrão de NGNA, CTLA4^{A29YL104E}-Ig e Solução padrão de adequabilidade de sistema foram transformados em alíquotas em tubos para centrífuga de 1,5 mL distintos e 200 µL de solução de ácido sulfúrico a 50 mM foram adicionados a cada frasco. Os conteúdos foram misturados ligeiramente e incubados a 80 °C durante 1 hora □ 5 minutos. Quando hidrólise está completa, a amostra é centrifugada rapidamente.

Rotulação por fluorescência: reagente de rotulação por fluorescência (200 µL) foi adicionada a cada amostra e misturado totalmente. As amostras foram, então, incubadas no escuro a 80 °C durante 45 ± 5 minutos e subsequentemente esfriadas.

5 INSTRUMENTAÇÃO E CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS (instrumentação equivalente pode ser usada):

Sistema de bomba ternária	Hewlett Packard Modelo 1090
RP C-18 HPLC Coluna, 4,6 x 50 mm, 3 µ	Jones Chromatography, (Catálogo No. 4M5313)
Detector de fluorescência	Hewlett Packard Modelo 1046A
Amostrador automático	Hewlett Packard Modelo 1090 equipado com refrigeração a 4°C
Sistema de integração	VG/Multichrom
HPLC Chemstation (DOS Series)	Hewlett Packard

Parâmetro cromatográficos

Fluxo:	1,0 mL/min		
Fase móvel A:	MeOH a 20%/água		
Fase móvel B:	MeOH a 70%/água		
Gradiente linear:	<u>Tempo</u>	<u>%A</u>	<u>%B</u>
	0,01	98	2,0
	1,0	98	2,0
	4,0	90	1,0
Volume de injeção:	4,01	98	2,0
Tempo de operação:	6,00	98	2,0
Temperatura da coluna:	10 µL		
Tempo de retenção (NANA):	6 min		
Tempo de retenção (NGNA):	Temperatura ambiente		
Max. Pressão:	3,1 0,5 min		
Comprimento de onda de excitação:	2,3 0,5 min		
Comprimento de onda de emissão:	300 bar		
Ganho PMT:	373 nm		
	448 nm		
	8		

10 Sistema de HPLC: módulo de separação Waters 2690/2695 ou equivalente

Detector de fluorescência: detector de fluorescência com comprimento de onda múltiplo Waters 2475 ou equivalente

Aquisição de dados: Waters Millennium 32 ou Empower.

Coluna: Luna 5 μ m, C18, 100 μ m, 150 x 4,6 mm, Phenomenex,
(Catálogo No. 00F-4252-E0)

Bloco de aquecimento digital: WVR, (Catálogo No. 13259-056)

5 ou equivalente

Mini Centrífuga: WVR, (Modelo No. C-1200) ou equivalente

Fase móvel A: MeOH a 10% (v/v)/90% de água

Fase móvel B: MeOH a 70% (v/v) /30% de água

Taxa de fluxo: 1 mL/min

10 Volume de injeção: 10 μ L

Tempo de operação: 30 min

Temperatura da coluna: temperatura ambiente

Comprimento de onda de excitação: 373 nm

Comprimento de onda de emissão: 448 nm

15 Ganho: 1

Gradiente de eluição:

<u>Tempo</u>	<u>Fluxo</u>	<u>%A</u>	<u>%B</u>	<u>Curva</u>
Inicial	1,0	85,0	15,0	*
20,00	1,0	85,0	15,0	6
20,50	1,0	0,0	100,0	6
25,00	1,0	0,0	100,0	6
25,50	1,0	85,0	15,0	6
30,00	1,0	85,0	15,0	6
35,00	0,05	0,0	100,0	11

Preparo de padrões de ácido siálico (~ 5 mM)

20 Padrão de ácido N-acetil neuramínico (NANA, MW = 309,3) (~ 5 mM). Pesar precisamente 154,5 μ g 1,0 mg de ácido N-acetil neuramínico em um frasco volumétrico de 100 mL. Dissolver e Q.S. até o volume com água DI, misturar bem. Transformar em alíquotas a solução em frascos criogênicos de 2 mL.

25

$$\text{Conc. (mM)} = \frac{\text{Wt(mg)} \times P}{309.3 \times 100(\text{mL})}$$

P = Pureza de NANA – do COA do Vendedor (isto é, 99% = 0,99).

Padrão de ácido N-glicolil neuramínico (NGNA, MW = 325,7)
 (~ 0,25 mM). Pesar precisamente 8,0 ± 1,0 mg de ácido N-glicolil neuramínico em um frasco volumétrico de 100 mL. Dissolver e Q.S. até o volume com
 5 água DI, misturar bem. Transformar em alíquotas a solução em um frasco criogênico de 2 mL.

$$\text{Conc. (mM)} = \frac{\text{Wt(mg)} \times P}{325.7 \times 100(\text{mL})}$$

P = Pureza de NGNA – do COA do Vendedor COA (isto é, 99% = 0,99).

Os padrões de ácido siálico transformados em alíquota podem ser armazenados a -20 °C durante até seis meses.

10 **Preparo de mistura padrão de ácido siálico.** Mistura padrão de ácido siálico para Adequabilidade de sistema e quantificação (NANA a 50 ± M, NGNA a 1 ± M). Adicionar 1 mL de NANA a 5 mM, 400 ± l de NGNA a 0,25 mM em um frasco volumétrico de 100 mL. Q.S. até o volume com água DI e misturar bem. Transformar em alíquotas a mistura padrão de ácido siálico em frascos criogênicos de 2 mL. A mistura padrão de ácido siálico transformada em alíquota pode ser armazenada a -20°C durante até seis meses.

Preparo de amostra e Material de Referência. Descongelar as amostras de proteína a 2-8°C, misturar bem. Diluir as amostras e Material de Referência para aproximadamente 0,5 mg/mL CTLA4^{A29YL104E}-Ig (por exemplo, conc. de proteína = 25,0 mg/ml, adicionar 50,0 ± l de proteína em 2450 ± l de água). Centrifugar as amostras de teste diluídas e Material de Referência durante 5 minutos a 10.000 rpm de forma a remover as partículas.

Hidrólise

25 **Placebo:** A um tubo para centrífuga de 2,0 mL, adicionar 50 ± L de água DI e 200 ± L de ácido sulfúrico a 50 mM. Isso serve como placebo.

Padrão de ácido siálico para Adequabilidade de sistema e quantificação. A um tubo para centrífuga de 2,0 mL, adicionar 50 ± L de mistura de padrão de ácido siálico e 200 ± L de ácido sulfúrico a 50 mM. Preparar em duplicata. Denotar como Std1 e Std2.

Material de Referência: A um tubo para centrifuga de 2,0 mL, adicionar 50 μ L de material de referência de CTLA4^{A29YL104E}-Ig diluído (\approx 0,5 mg/mL) e 200 μ L de ácido sulfúrico a 50 mM. Preparar em duplicata, denotar como RM1 e RM2.

- 5 **Amostras de teste:** A um tubo para centrifuga de 2,0 mL, adicionar 50 μ L de substância de fármaco de CTLA4^{A29YL104E}-Ig diluída (\approx 0,5 mg/mL) e 200 μ L de ácido sulfúrico a 50 mM. Preparar em duplicata. Denotar como S1-1, S1-2; S2-1, S2-2; S3-1, S3-2; etc. Submeter a turbilhonamento as amostras durante aproximadamente 5 segundos e centrifugar durante
- 10 aproximadamente 5-10 segundos. Colocar as amostras em um bloco de aquecimento e incubar a 80°C \pm 5°C durante 1 hora \pm 5 minutos. Deixar as amostras hidrolisadas esfriar para a temperatura ambiente. Centrifugar as amostras hidrolisadas rapidamente para forçar condensado no tubo (\sim 10 segundos em alta velocidade).

- 15 **Derivatização.** Pré-aquecer o bloco de aquecimento para 80°C \pm 5°C. Adicionar 200 μ L de reagente de rotulação por fluorescência a cada amostra hidrolisada. Submeter a turbilhonamento aproximadamente 5 segundos e centrifugar durante \sim 10 segundos. Colocar as amostras em um
- 20 bloco de aquecimento a 80°C \pm 5°C durante 40 \pm 5 minutos. Cobrir o bloco de aquecimento com folha de alumínio, uma vez que a solução de rotulação é sensível à luz. Deixar amostras derivatizadas esfriar para a temperatura ambiente. Submeter a turbilhonamento e centrifugar as amostras durante aproximadamente 10 segundos para forçar o condensado no tubo.

- 25 **Preparo de injeção.** Assegurar que a coluna é equilibrada com fase móvel antes de análise. Transferir amostra suficiente (100 – 200 μ L) de cada tubo para centrifuga para um frasco para amostrador automático com inserção limitada. Um carregamento típico para amostrador automático para 10 injeções de amostra é como segue :

Amostra#	Descrição	# de injeções
1	Placebo	1
2	Std1	2
3	Std1	2
4	Std2	2
5	RM1	1
6	RM2	1
7	S1-1	1
8	S1-2	1
9	S2-1	1
10	S2-2	1
11	S3-1	1
12	S3-2	1
13	S4-1	1
14	S4-2	1
15	Std1	1
16	Std2	1

onde Std1 e Std 2 são os preparados de solução de mistura padrão de ácido siálico; RM1 e RM2 são os preparados para amostra de controles; e S é a injeção de amostra. As primeiras quatro injeções de padrão de ácido siálico (Amostra#2 & 3) (Std1) serão usadas para fins de Adequabilidade de sistema. As quatro injeções de Amostra#3 (Std1) e Amostra#4 (Std2) serão usadas para cálculo. Para injeções de amostra adicionais, repetir carregamentos 5 a 16 do amostrador automático.

ADEQUABILIDADE DE SISTEMA. O perfil de cromatograma de amostras de Adequabilidade de sistema deverá ser similar ao cromatograma mostrado na Figura 49. Para as primeiras injeções de Padrão de Adequabilidade de Sistema (Std1), as resoluções USP (R) para NGNA e NANA devem ser $\geq 1,5$. Quatro injeções do Padrão de Adequabilidade de Sistema (Std1) deverão ir de encontro aos seguintes valores exemplificativos: O RSD da área de pico para NANA deve ser $\leq 5\%$. O RSD da área de pico para NGNA deve ser $\leq 10\%$. O tempo de migração do pico de NGNA deve ser eluído a $11,3 \pm 2,0$ minutos. O tempo de migração do pico de NANA deve ser eluído a $16,0 \pm 2,5$ minutos. O RSD da área de pico de quatro injeções de padrão, (Std1, Amostra#3) e (Std2, Amostra#4) deve ser $\leq 10\%$. O RSD da área de

pico de todas as injeções de padrão entre faixas da seqüência deve ser $\geq 15\%$.

Preparo do sistema de HPLC: Colunas foram equilibradas com 98% de Tampão A e 2% de Tampão B a 1 mL/min durante 15 minutos. 10 mL de Solução de adequabilidade de sistema fluorescentemente rotulada foram injetados no sistema. A resolução de pico e o número de placas teóricas podem, então, ser calculados usando as seguintes equações:

$$R = \frac{2(T2 - T1)}{W2 + W1}$$

onde: R = Resolução
 10 T1 = Tempo de retenção (min) de ácido N-glicolil neuramínico
 T2 = Tempo de retenção (min) de ácido N-acetil neuramínico
 W1 = Largura de pico na linha de base de ácido N-glicolil neuramínico (min)
 W2 = Largura de pico na linha de base de NANA (min)

15 O valor de resolução deve ser $\geq 1,5$.

O número de placas teóricas pode ser calculada usando a seguinte equação:

$$N = 16 (T2/W2)^2$$

onde:
 20 N = Número de placas teóricas
 T2 = Tempo de retenção (min) de ácido N-acetil neuramínico
 W2 = Largura de pico na linha de base de ácido N-acetil neuramínico (min)

25 O número de placas teóricas deve ser 2000. O cromatograma de perfil de hidrólise de CTLA4^{A29YL104E}-Ig deverá ser similar à FIG. 49.

30 Amostras foram analisadas através de HPLC de fase reversa (RP-HPLC) na seguinte ordem: Padrões de NANA e NGNA foram primeiro injetados, seguido por injeção de amostras, em duplicata se necessário (por exemplo, CTLA4^{A29YL104E}-Ig, etc). Após análise de amostra, a coluna foi lavada com Fase móvel B durante 20 minutos a 0,5 mL/minuto. Se necessário, a coluna pode ser invertida.

Determinação da proporção molar (MR) de ácido siálico (NANA ou NG-

NA) para proteína

A proporção molar de ácidos siálicos para proteína pode ser calculada através do software Millennium ou Empower.

Fator de diluição:

5

$$D = \frac{V_{\text{proteína}} + V_{\text{água}}}{V_{\text{proteína}}}$$

Concentração de solução de trabalho de proteína (proteína usada para hidrólise) concentração (\square M):

$$C_{\text{proteína}} = \frac{C_{A280}}{MW_{\text{beletaccept}}} \times \frac{1}{D} \times 10^6$$

10 onde:

$C_{\text{proteína}}$ = Concentração da solução de trabalho de proteína (\square M),

C_{A280} = A_{280} concentração da solução de estoque de proteína (mg/ml),

15

$MW_{\text{CTLA4A29YL104E-Ig}}$ = peso molecular de CTLA4A29YL104E-Ig, 91232 Da.

20

Concentração de Ácidos siálicos na solução de trabalho de proteína (\square M):

$$C_{\text{desconhecida}} = C_{\text{std}} \times \frac{A_u}{A_{\text{std}}}$$

onde:

25

$C_{\text{desconhecida}}$ = Concentração de ácido siálico (NANA ou NGNA) na amostra desconhecidaa

C_{std} = Concentração de ácido siálico (NANA ou NGNA) no padrão ($\square M$)

A_u = área de pico de ácido siálico (NANA ou NGNA) na amostra desconhecida

5 A_{std} = área de pico de ácido siálico (NANA ou NGNA) no padrão

Proporção molar (M.R.) de ácido siálico (NANA ou NGNA) to proteína:

$C_{desconhecida}$

M.R. =

$C_{proteína}$

10 **Cálculo da Proporção molar total de ácido siálico para proteína (TSA):**

TSA = proporção de NANA molar + proporção molar de NGNA

15 O desvio padrão relativo para as contagens de área de dois padrões de NANA entre faixas deverá ser < 10%. O desvio padrão relativo para as contagens de área de dois padrões de NGNA entre faixas deverá ser < 10%. O desvio padrão relativo para as contagens de área de dois hidrolisatos independentes deverá ser < 10%.

20 Em uma modalidade, a proporção molar média para ácidos siálicos na CTLA4^{A29YL104E}-Ig deve estar dentro das faixas especificadas na tabela diretamente abaixo.

Faixa de proporção molar de Material de CTLA4^{A29YL104E}-Ig

Monossacarídeo	Faixa
NANA	5,0 – 10,0
NGNA	< 1,5

25 O desvio % da proporção molar para ácidos siálicos no Material de Referência e amostras para os dois preparados de amostras deve ser ≤ 15%, ≤ 20%, ≤ 25%, ≤ 30% ou ≤ 35%.

EXEMPLO 40: UM BIOENSAIO BASEADO EM CÉLULA *IN-VITRO* PARA CTLA4^{A29YL104E}-Ig

Células T requerem dois sinais para ativação e subsequente proliferação. O primeiro sinal é proporcionado através da interação de um peptídeo antigênico com o complexo TCR-CD3. O segundo sinal co-estimulatório ocorre com a interação entre CD29 sobre a célula T e a proteína B7 sobre a célula que apresenta antígeno. Quando de recebimento desses dois sinais, células T secretam a citocina Interleucina-2 (IL-2). Liberação de IL-2 leva à ativação e proliferação celular. CTLA4^{A29YL104E}-Ig, um composto imunossupressivo solúvel, também se liga à proteína B7 sobre as células apresentando antígeno, assim, bloqueando a interação funcional com CD28 e impedindo o sinal co-estimulatório que é necessário para a produção de IL-2.

Nesse método, células T Jurkat transfectadas com o gene de luciferase, sob o controle de do promotor de IL-2, são co-estimuladas com células B de Daudi na presença de anti-CD3. A co-estimulação ativa o promotor de IL-2 o qual, por sua vez, produz proteína de luciferase. O sinal luminescente resultante é medido usando um Sistema de Ensaio de Luciferase. Nesse sistema, CTLA4^{A29YL104E}-Ig produz uma diminuição dose-dependente na atividade de luciferase.

Esse método examina o efeito de CTLA4^{A29YL104E}-Ig sobre o sinal co-estimulatório necessário para produção de IL-2. A presença de CTLA4^{A29YL104E}-Ig solúvel impede a sinalização entre a célula T e células apresentando antígeno. Sem esse sinal, IL-2 não é produzida, assim, impedindo a expansão clonal de células T. Um vetor com o gene de luciferase foi criado usando o promotor de IL-2. As células T Jurkat foram, então, transfectadas com esse vetor repórter. Um clone positivo, Jurkat.CA, foi selecionado e usado no método.

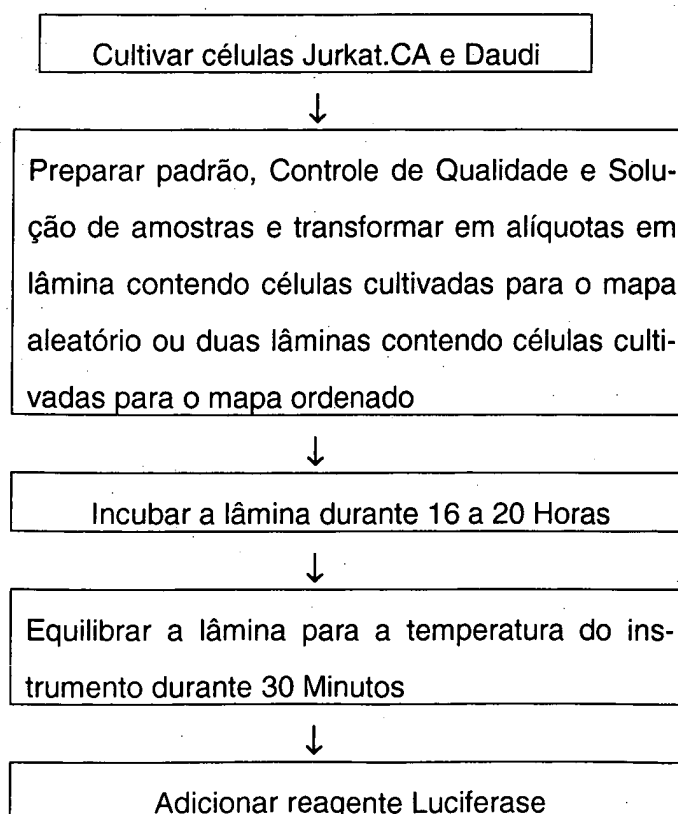
Esse bioensaio envolve estimulação de células T transfectadas (Jurkat.CA) com anti-CD3 e células B (Daudi). Co-estimulação proporcionada pelas células B é inibida através da adição de CTLA4^{A29YL104E}-Ig. As células Jurkat.CA e Daudi são cultivadas nas cavidades de uma lâmina com fun-

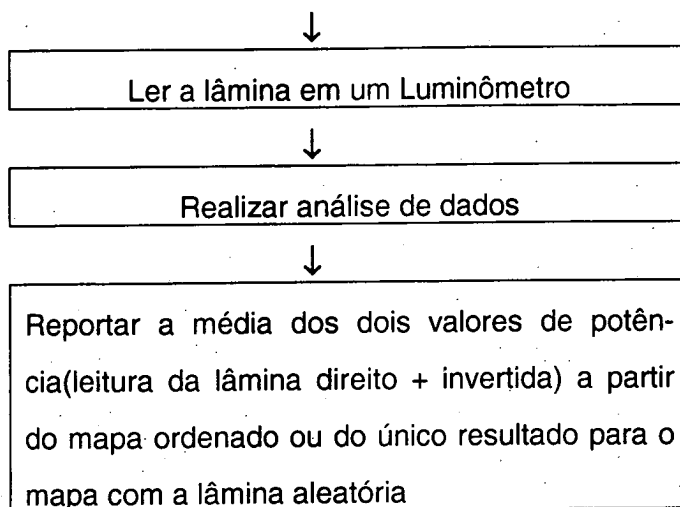
do plano, branca, opaca com 96 cavidades e estimuladas com anti-CD3 na presença de diferentes concentrações de CTLA4^{A29YL104E}-Ig. Após uma incubação de 16 a 20 horas a 37°C, as cavidades são ensaiadas com relação à atividade de luciferase. Inibição de co-estimulação através de CTLA4^{A29YL104E}-Ig é observada como uma diminuição dose-dependente na atividade de luciferase.

REAGENTES: Meio de cultura de células Daudi (soro fetal bovino a 10%, MEM piruvato de sódio a 1% em RPMI 1640); Meio de cultura de célula Jurkat.CA (soro de cabra a 10%, MEM piruvato de sódio a 1%, 400 µg/mL de geneticina em RPMI 1640); Meio de bioensaio (0,2 µg/mL de anticorpo anti-CD3 e solução de penicilina-estreptomicina a 1% em Meio de cultura de células Daudi); solução Bright-Glo Luciferase do sistema de ensaio (Promega, Catálogo # E2620).

INSTRUMENTAÇÃO: Nikon, microscópio invertido Diaphot 200; Luminômetro Packard TopCount NXT; Manipulador de líquido Tecan Genesis; Contador de células Coulter Vi-Cell; Zymark RapidPlate-96.

Procedimento





Preparo de Soluções de trabalho: 3 mL de soluções de C-TLA4^{A29YL104E}-Ig (5000 ng/mL) em meio de bioensaio.

Meio de cultura de células Daudi. Adicionar 300 mL de RPMI 1640 a uma unidade de filtro Corning de 1 L. Então, adicionar 100 mL de soro bovino fetal e 10 mL de MEM piruvato de sódio. Adicionar RPMI 1640 o bastante para fazer 1 litro. Filtrar e armazenar a 4°C durante até um mês.

Meio de cultura de célula Jurkat.CA. Adicionar 300 mL de RPMI 1640 a uma unidade de filtro Corning de 1 L. Então, adicionar 100 mL de soro de cabra, 10 mL de MEM piruvato de sódio e 8 mL de geneticina a 50 mg/mL (a concentração final é de 400 µg/mL). Adicionar RPMI 1640 o bastante para fazer 1 litro. Filtrar e armazenar a 4°C durante até um mês.

Meio de bioensaio. Adicionar 100 mL de Meio de cultura de células Daudi (2,1) to a 100 mL media bottle. então, adicionar anticorpo anti-CD3 to uma concentração de 0,2 µg/mL e 1 mL de solução de penicilina-estreptomicina (1.11). Misturar gentilmente através de inversão e armazenar em temperatura ambiente durante não mais do que 8 horas.

Solução de luciferase Bright-Glo. Preparar a solução, conforme descrito no sistema (1.21), através da adição de tampão de ensaio ao substrato luciferase e misturar através de inversão. O reagente deverá ser usado dentro de 2 horas ou armazenado a -20°C e protegido da luz durante até 4 semanas.

Manutenção de Linhagem de células. Determinar o número de

células por mL as linhagens de célula Jurkat.CA e Daudi através de contagem com um contador de células. As células deverão estar entre 1×10^5 e $1,5 \times 10^6$ células/mL. Combinar 12×10^6 Células Jurkat.CA e 12×10^6 células Daudi em um tubo para centrifuga estéril. Centrifugar as células a $\sim 125 \times g$ durante 10 minutos em temperatura ambiente. Re-suspender totalmente as células em 9 mL de Meio de cultura de células Daudi (2.1) repetidamente pipeteando gentilmente com uma pipeta sorológica até que nenhum grumo de célula esteja visível, a fim de proporcionar uma concentração de $2,7 \times 10^6$ células/mL. Verificar a concentração de células através de contagem das células sobre um contador de células. Cultivar as células re-suspensas nas cavidades de uma lâmina com 96 cavidades (1.3) a 75 mL por cavidade (200.000 células por cavidade). Incubar a lâmina nos pontos de ajuste da incubadora de 37°C , 5% de CO_2 e umidade de 85% enquanto os padrões, controles de qualidade e amostras são preparados. Preparar concentrações nominais de CTLA4^{A29YL104E}-Ig para os padrões, controles de qualidade e amostras 1 e 2. Preparar 3 mL de solução de trabalho de material de CTLA4^{A29YL104E}-Ig a 5000 ng/mL em meio de bioensaio (2.3) para uso na Curva Padrão. Preparar 3 mL de solução de trabalho de material de CTLA4^{A29YL104E}-Ig a 5000 ng/mL em meio de bioensaio (2.3) para uso na curva de controle de qualidade. Preparar 3 mL de cada uma das duas amostras de solução de trabalho de CTLA4^{A29YL104E}-Ig a 5000 ng/mL em meio de bioensaio (2.3) para uso nas curvas de amostra. (Concentrações aproximadas para amostras de CTLA4A29YL104E-Ig podem ser usadas para preparar as curvas com 8 pontos e valores de potência relativa podem ser corrigidos conforme descrito em 5.5 quando a concentração determinada está disponível).

Oito curvas de ponto foram preparadas para o padrão, controle de qualidade e amostras nas concentrações de 5000, 200, 100, 50, 25, 10, 5 e 0,1 ng/mL de CTLA4^{A29YL104E}-Ig, conforme mostrado na Tabela 55 abaixo para as concentrações finais no ensaio, após diluição de duas vezes na lâmina, de 2500, 100, 50, 25, 12,5, 5, 2,5 e 0,05 ng/mL.

Tabela 55. Diluições usadas para gerar Padrões de curva.

Ponto de curva	Curva Padrão	Controle de Qualidade	Amostra 1	Amostra 2
1	5000 ng/mL	5000 ng/mL	5000 ng/mL	5000 ng/mL
2	200	200	200	200
3	100	100	100	100
4	50	50	50	50
5	25	25	25	25
6	10	10	10	10
7	5	5	5	5
8	0,1	0,1	0,1	0,1

- Dois mapas de lâmina podem ser usados. O mapa de lâmina aleatória requer o uso de um manipulador de líquido para ajuste. O mapa de lâmina ordenada tem triplicatas adjacentes e cada ponto de curva para os artigos de teste adicionados em um layout ordenado seqüencial. Para o mapa de lâmina aleatória, adicionar 75 μ L de cada solução (4.8) às cavidades apropriadas de uma lâmina contendo células (4.5) conforme mostrado no mapa de lâmina abaixo. Para o mapa de lâmina ordenada, adicionar 75 μ L de cada solução (4.8) às cavidades apropriadas de duas lâminas contendo células (4.5) conforme mostrado no mapa de lâmina abaixo.
- 5
- 10 Vedar a(s) lâmina(s) com TopSeal-A (1,22). Assegurar que a vedação está hermeticamente no lugar. Não deverão existir vãos de ar. Incubar a(s) lâmina(s) nos pontos de ajuste da incubadora de 37°C, 5% de CO₂ e umidade de 85% durante 16 a 20 horas. Equilibrar a(s) lâmina(s) e solução de luciferase Bright-Glo (2.4) para a temperatura do instrumento.
- 15 Adicionar 150 μ L de solução de luciferase Bright-Glo a cada cavidade simultaneamente e misturar. Colocar a lâmina no TopCount NXT imediatamente após mistura para equilibrar no escuro durante 10 minutos. Medir o sinal luminescente no TopCount NXT usando uma integração de 1 segundo por cavidade ou conforme apropriado ao tipo particular de luminômetro usado.
- 20 O resultado do TopCount NXT é registrado. Quando usando o mapa de lâmina ordenada, duas lâminas serão lidas. A primeira lâmina (de pé) será lida com a cavidade A1 no canto à esquerda superior. A segunda lâmina (invertida) será lida com a cavidade A1 no canto à direita inferior.

Página

499

Ajuste de mapa de lâmina aleatória em Bioensaio:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	QC 0,05	Smp1 12,5	Stnd 0,05	Stnd 2500	QC 12,5	Stnd 100	Stnd 5	Smp2 5	Smp2 12,5	Stnd 2,5	Smp1 12,5	Stnd25
B	Stnd 5	Smp2 25	Smp1 5	Smp1 0,05	Smp1 12,5	QC 2,5	Stnd 0,05	QC 2500	Smp1 25	QC 25	QC 5	Smp2 100
C	Smp2 5	Stnd 100	QC 5	Stnd 2,5	QC 0,05	QC 5	Smp2 100	Smp1 0,05	QC 100	Smp1 100	QC 50	Stnd 5
D	Smp1 100	Smp2 12,5	Smp1 50	QC 50	Smp1 2500	Smp2 2500	Smp1 2,5	Stnd 25	Smp2 5	QC 2500	Stnd 100	Smp1 50
E	QC 100	Smp2 100	QC 25	Smp2 2500	Smp2 12,5	Smp2 50	Stnd 2500	Smp1 25	Smp1 5	Smp1 2,5	Smp1 0,05	Smp2 2,5
F	QC 2500	Stnd 12,5	Smp1 2,5	Stnd 25	Stnd 12,5	Smp1 5	Stnd 2,5	Smp2 2,5	Smp2 0,05	Stnd 2500	QC 2,5	Smp2 50
G	QC 2,5	Smp2 50	Smp2 0,05	Smp1 25	Smp2 0,05	QC 50	Smp1 100	QC 100	Stnd 0,05	QC 0,05	Smp1 2500	Smp2 2500
H	Stnd 50	Smp1 2500	Smp2 2,5	QC 12,5	QC 25	Smp2 25	Smp1 50	Stnd 50	Stnd 50	QC 12,5	Smp2 25	Stnd 12,5

Stnd: Padrão de uma concentração final de 2500 a 0,05 ng/mL mL na cavidade.

QC: Controle de Qualidade de uma concentração final de 2500 a 0,05 ng/mL na cavidade.

5 Smp1, Smp2: Amostras 1 a 2 de uma concentração final de 2500 a 0,05 ng/mL na cavidade.

Ajuste do mapa de lâmina ordenada em bioensaio:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Stnd 2500	Stnd 2500	Stnd 2500	Stnd 100	Stnd 100	Stnd 100	Stnd 50	Stnd 50	Stnd 50	Stnd 25	Stnd 25	Stnd 25
B	Stnd 12,5	Stnd 12,5	Stnd 12,5	Stnd 5	Stnd 5	Stnd 5	Stnd 2,5	Stnd 2,5	Stnd 2,5	Stnd 0,05	Stnd 0,05	Stnd 0,05
C	QC 2500	QC 2500	QC 2500	QC 100	QC 100	QC 100	QC 50	QC 50	QC 50	QC 25	QC 25	QC 25
D	QC 12,5	QC 12,5	QC 12,5	QC 5	QC 5	QC 5	QC 2,5	QC 2,5	QC 2,5	QC 0,05	QC 0,05	QC 0,05
E	Smp1 2500	Smp12 500	Smp12 500	Smp1 100	Smp1 100	Smp1 100	Smp1 50	Smp1 50	Smp1 50	Smp12 5	Smp1 25	Smp1 25
F	Smp112,5	Smp11 2,5	Smp11 2,5	Smp1 5	Smp1 5	Smp1 5	Smp12 5	Smp1 2,5	Smp1 2,5	Smp10 0,05	Smp1 0,05	Smp1 0,05
G	Smp22500	Smp22 500	Smp22 500	Smp2 100	Smp2 100	Smp2 100	Smp2 50	Smp2 50	Smp2 50	Smp22 5	Smp2 25	Smp2 25
H	Smp212,5	Smp21 2,5	Smp21 2,5	Smp2 5	Smp2 5	Smp2 5	Smp22 5	Smp2 2,5	Smp2 2,5	Smp20 0,05	Smp2 0,05	Smp2 0,05

Stnd: Padrão de uma concentração final de 2500 a 0,05 ng/mL mL na cavidade.

QC: Controle de Qualidade de uma concentração final de 2500 a 0,05 ng/mL na cavidade.

Smp1, Smp2: Amostras 1 a 2 de uma concentração final de 2500 a 0,05 ng/mL na cavidade.

200.000 células foram adicionadas por cavidade de uma lâmina com 96 cavidades e foram incubadas a 37°C, 5% de CO₂ e umidade de 85%. 12 x 10⁶ Células Jurkat.CA e 12 x 10⁶ células Daudi foram combinadas em um tubo para centrífuga estéril. As células foram centrifugadas a ~125 x g durante 10 minutos em temperatura ambiente e foram totalmente re-suspensas em 9 mL de Meio de cultura de células Daudi repetidamente pipeteando gentilmente com uma pipeta sorológica até que mais nenhum grumo de célula fosse visível, a fim de proporcionar uma concentração de 2,7 x 10⁶ células/mL. 75 μ L de cada solução da Tabela 55 foram adicionados às cavidades apropriadas de uma lâmina contendo células. A(s) lâmina(s) foi(m), então, vedada(s) com TopSeal-A e incubada(s) a 37°C, 5% de CO₂ e umidade de 85% durante 16 a 20 horas. Após as lâminas e solução de luciferase Bright-Glo terem sido equilibradas para a temperatura do instrumento, 150 μ L de solução de luciferase Bright-Glo foram adicionados a cada cavidade simultaneamente e foram misturados. A lâmina é, então, colocada no TopCount NXT imediatamente após mistura para equilíbrio no escuro durante 10 minutos. O sinal luminescente foi, então, medido em um TopCount NXT usando uma integração de 1 segundo por cavidade ou conforme apropriado ao tipo particular de luminômetro usado.

O resultado do TopCount NXT foi registrado, lido em um programa de análise de padrão e os dados foram transformados tomando seu logaritmo (base 10). Tos dados transformados de cada artigo foram adaptados a um modelo logístico com quatro parâmetros, conforme mostrado na equação abaixo:

$$\text{Log}_{10}(y_{jk}) = D + \frac{(A - D)}{1 + \left(\frac{x_j}{C}\right)^B}$$

Equação 1:

onde:

A é o platô superior da curva, D é o platô inferior da curva, B é o fator de declínio e C é a concentração que produz um efeito igual à média de A e D .

Um F-teste R² estatístico e com falta-de-adaptação pode ser cal-

culado para cada artigo. Uma proporção do mínimo, máximo e declínio dos artigos de teste com relação ao material padrão pode também ser calculada. Além disso, intervalos de confiança para as proporções podem também ser computados.

- 5 A potência relativa de cada artigo foi determinada através de adaptação de uma única equação aos dados do artigo de interesse combinados com os dados do artigo de referência.

$$\text{Log}_{10}(y_{ijk}) = D + \frac{(A - D)}{1 + \left(\frac{x_{ij}}{C_A * \left(\frac{C_R}{C_A} \right)^I} \right)^B}$$

onde:

- 10 os parâmetros A, B e D são comuns à referência e artigo de teste e C_R é o parâmetro referência, C_A é o parâmetro artigo de teste e a proporção C_R/C_A é a potência relativa. O superscrito I é uma variável indicadora. Ele é ajustado em igual a 1 se os dados se originam do artigo de interesse e 0 se os dados se originam do material padrão.

- 15 A potência relativa de cada artigo de teste foi traduzida para uma escala percentual e a potência relativa foi fornecida como resultado do programa.

- Ajuste de valores de potência relativa Obtidos com concentrações aproximadas:** Em virtude do "lag" de tempo entre recebimento da amostra e obtenção de uma concentração precisa de proteína, a amostra pode ser testada no ensaio em uma concentração aproximada e os resultados ajustados quando a concentração precisa é determinada. Esse ajuste é realizado usando a Equação 2 abaixo, onde a potência relativa determinada no ensaio é multiplicada pela proporção da concentração de CTLA4^{A29YL104E}.
 20
 25 Ig usada para ajustar o ensaio para a concentração de amostra de CTLA4^{A29YL104E}-Ig determinada.

Equação 2:

$$5 \quad \text{Potência relativa reportável} = \frac{\text{Potência relativa observada} * \text{concentração usada}}{\text{Concentração determinada}}$$

Exemplo:

Amostra foi testada em uma concentração de proteína de 25 mg/mL no ensaio.

Potência relativa determinada foi de 105%.

10 A concentração de CTLA4^{A29YL104E}-Ig determinada foi estabelecida como sendo de 25,5 mg/mL.

Potência relativa reportável = $(105 * 25) / 25,5 = 103\%$.

15 **Material padrão:** O valor de EC₅₀ para o padrão do resultado deverá estar entre 5 e 35 ng/mL. A diferença entre as concentrações padrões de 2500 ng/mL e 0,05 ng/mL (faixa) deverá ser ≈ 40.000 contagens por segundo (CPS). O valor de R-quadrado para a referência deverá ser mais de 0,95.

20 Os valores de potência relativa do artigo de teste na Tabela 9 devem estar entre 25 e 175% do padrão de referência, o qual é a faixa do ensaio. Se os valores de potência relativa estão fora dessa faixa, então, a amostra deve ser diluída ou concentrada de forma a cair dentro dessa faixa e a amostra re-analisada.

Linhagem de células B Daudi:

25 **Fonte:** Células Daudi foram obtidas da ATCC. Um banco mestre foi gerado, compreendido de 64 frascos. Um banco de trabalho foi criado a partir de um frasco de banco mestre após 4 passagens.

(NOTA: Passagem 0 é considerada o descongelamento e, então, 3 passagens adicionais foram feitas antes de geração do banco de trabalho).

30 **Meios:** Células Daudi são crescidas em Meio RPMI 1640 (contendo HEPES e L-glutamina) suplementado com soro fetal bovino a 10% e piruvato de sódio a 1%.

Condições da incubadora: Células são mantida em um T-frasco ventilado a 37°C, 5% de CO₂ e umidade de 70-90%.

Protocolo de descongelamento: Um frasco de células é removido de um congelador de nitrogênio líquido e descongelado em um banho de água a 37 °C. Os conteúdos são misturados com 10 mL de meio de cultura. As células são contadas e, então, coletada através de centrifugação a 125 x g durante 10 minutos. Após centrifugação, o sobrenadante é removido e as células são suspensas em meio fresco a 3×10^5 células viáveis/mL. As células são definidas como estando na passagem 0 nesse ponto.

Propriedades de crescimento: A linhagem de célula cresce em suspensão.

Subcultura: Culturas são mantidas através de passagem duas vezes por semana com não mais do que 5 dias entre passagens. As células são passadas em um T-frasco ventilado com meio fresco entre $0,5 \times 10^5$ e 2×10^5 células viáveis/mL. As células não deverão atingir uma densidade de mais de $1,5 \times 10^6$ células/mL. As células deverão ser mais de 80% viáveis, conforme avaliado através de coloração com azul de tripano. A data e número de passagens deverão ser rotulados sobre o T-frasco após passagem.

Tempos de duplicação: O tempo de duplicação oscila de 18 a 26 horas.

Limitações de passagem: As células de um banco de trabalho deverão ser passadas 3 vezes antes de uso no bioensaio, isto é, elas deverão estar na passagem 3 ou maior. As células deverão permanecer em cultura apenas durante 20 passagens. Um novo frasco de trabalho deverá ser descongelado de cada vez.

Protocolo de congelamento: Células são congeladas de 5 a 10×10^6 células / mL em um criofrasco. Meio crioprotetor é preparado através de suplementação de meio de cultura completo com 5% (v/v) de DMSO. As células são congeladas em uma taxa de 1°C/minuto até que elas atinjam a temperatura do nitrogênio líquido (~190°C).

Linhagem de célula T Jurkat.CA:

Fonte: Células T Jurkat foram transfectadas com um plasmídeo que codifica a molécula de CTLA4-Ig. Um banco de trabalho foi criado a partir de um frasco de banco mestre após 3 passagens.

(NOTA: Passagem 0 é considerada o descongelamento e, então, 2 passagens adicionais foram feitas antes de geração do banco de trabalho).

Meios: Células Jurkat.CA são crescidas em Meio RPMI 1640 (contendo HEPES e L-glutamina suplementado com soro de cabra a 10% e piruvato de sódio a 1% suplementado com geneticina (G418 sulfato) em uma concentração final de 400 μ g/mL.

Condições da incubadora: Células são mantida em um T-frasco ventilado a 37°C, 5% de CO₂ e umidade de 70-90%.

Protocolo de descongelamento: A frasco de células é removido de um congelador de nitrogênio líquido e descongelado em um banho de água a 37°C. Os conteúdos são misturados com 10 mL de meio de cultura. As células são contadas e, então, coletadas através de centrifugação a 125 x g durante 10 minutos. Após centrifugação, o sobrenadante é removido e as células são suspensas em meio fresco a 3×10^5 células viáveis/mL. As células são definidas como estando na passagem 0 nesse ponto.

Propriedades de crescimento: A linhagem de célula cresce em suspensão.

Subcultura: Culturas são mantidas através de passagem duas vezes por semana com não mais do que 5 dias entre passagens. As células são passadas em um T-frasco ventilado com meio fresco entre $0,5$ e 2×10^5 células viáveis/mL. As células não deverão atingir uma densidade de mais de $1,5 \times 10^6$ células/mL. As células deverão ser mais de 80% viáveis, conforme avaliado através de coloração com azul de tripano. A data e número de passagens deverão ser rotulados sobre o T-frasco após passagem.

Tempos de duplicação: O tempo de duplicação oscila de 18 a 26 horas.

Limitações de passagem: As células de um banco de trabalho deverão ser passadas 3 vezes antes de uso no bioensaio, isto é, elas deverão estar na passagem 3 ou maior. As células as células deverão permanecer em cultura apenas durante 20 passagens. Um novo frasco de trabalho deverá ser descongelado de cada vez.

Protocolo de congelamento: Células são congeladas de 5 a 10

x 10⁶ células/mL em um criofrasco. Meio crioprotetor é preparado através de suplementação de meio de cultura completo com 5% (v/v) de DMSO. As células são congeladas em uma taxa de 1°C/minuto até que elas atinjam a temperatura do nitrogênio líquido (~190°C).

5 **EXEMPLO 41: Determinação de Ligação bio-específica de CTLA4^{A29YL104E}-Ig ao receptor de B7.1-Ig através de Ressonância de plasmônio em superfície (BIAcore)**

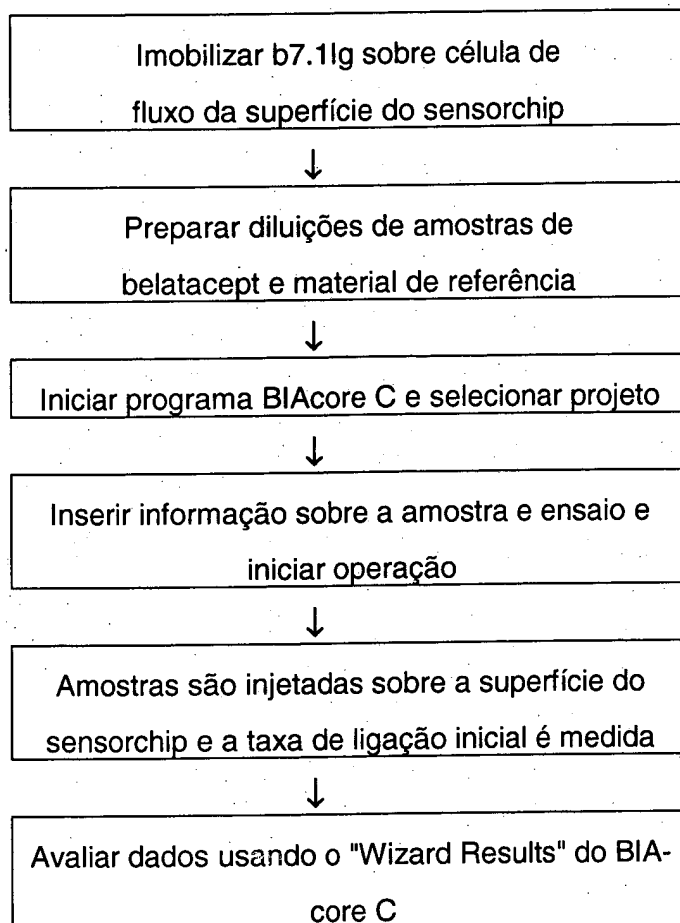
A ligação relativa de amostras de CTLA4^{A29YL104E}-Ig ao receptor de B7.1Ig foi medida através de ressonância de plasmônio em superfície usando o instrumento BIAcore. Nesse ensaio, CTLA4^{A29YL104E}-Ig se liga a uma proteína de fusão de imunoglobulina B7.1Ig derivada da proteína da membrana celular de APC B7.1. Após imobilização do receptor de B7.1Ig em uma alta densidade sobre a superfície de um chip sensor ativado, material de CTLA4^{A29YL104E}-Ig, controles de qualidade e amostras são diluídas para gerar sensorgramas de ligação. A taxa de ligação inicial (declínio)/Unidades de ressonância (RU) ligadas de CTLA4^{A29YL104E}-Ig à superfície de B7.1Ig imobilizada é medida sob as condições de transferência de massa limitativa (difusão) sobre essa superfície de B7.1Ig de alta densidade. A taxa de ligação inicial em unidades de ressonância por segundo (RU's) se correlaciona diretamente com a concentração bioativa. As taxas de ligação de amostras são calculadas em uma concentração ativa usando a curva de Padrão de Referência, onde a taxa de ligação de um material de CTLA4^{A29YL104E}-Ig é plotada contra a concentração. Os resultados finais são expressos pela ligação percentual de amostra com relação ao material de CTLA4^{A29YL104E}-Ig ou como a concentração.

REAGENTES: Amine Coupling Kit BIA Certificado (o kit contém um frasco de cada: 115 mg de N-hidróxi-succinimida (NHS), 750 mg de N-etil-N'-(3-dimetila) (EDC) e etanolamina); Tampão de regeneração (citrato de sódio a 10 mM, NaCl a 100 mM, pH 4,0).

30 **INSTRUMENTAÇÃO:** Instrumento BIAcore C com um computador PC compatível (BIAcore (Catálogo No.BR-1100-51)); software de controle BIAcore C versão 1.0.2; Software de avaliação BIAcore 1.0; lâmina de mi-

crotitulação com 96 cavidades para BIAcore com formato de U (Catálogo No. BR-1005-03); folhas vedantes para lâmina de microtitulação com 96 cavidades BIAcore (Catálogo No. BR-1005-78).

Esboço do Método:



5 MATERIAIS

Chip sensor CM5, grau certificado	BIAcore AB (Catálogo No. BR-1000-12)
Manual do instrumento BIAcore [®] C	BIAcore (Catálogo No. BR-1005-11)
Tampão de HBS BIA certificado, HEPES a 10 mM, pH de 7,4, NaCl a 150 mM, EDTA a 3,4 mM, tensoativo P20 a 0,005% v/v	BIAcore (Catálogo No. BR1001-88)
Solução BIAnormalizing (solução de glicerol a 40%)	BIAcore AB (Catálogo No. BR-1002-22)
Amine Coupling Kit BIA certificado, 115 mg de N-hidróxi-succinimida, 750 mg de N-etil-N'-(3-dimetila)	BIAcore (Catálogo No. BR-1000-50)
Cloreto de sódio (NaCl)	Sigma (Catálogo No.S-9888)
Tampão de acetato pH 5,0	BIAcore (Catálogo No. BR-1003-51)

Citrato de sódio (C₆H₃Na₃O)

Sigma (Catálogo No. S-4641)

Ácido clorídrico (HCl)

Fisher Scientific (Catálogo No. A144-212)

Kit de manutenção BIAcore

BIAcore (Catálogo No. BR-1006-67)

lulex

REAGENTES

Amine Coupling Kit BIA Certificado. O kit contém um frasco de cada: 115 mg de N-hidróxi-succinimida, 750 mg de N-etil-N'-(3-dimetila) e etanolamina. Transformar em alíquotas cada solução de acordo as orientações do fabricante e armazenar conforme indicado abaixo:

- 5 Armazenar alíquotas de 11,5 mg/ml de N-hidróxi-succinimida (NHS) a -20°C. Essa alíquota congelada expira 2 meses a partir da data de preparo. Armazenar alíquotas de 75 mg/ml de hidrocloreto de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) a -20°C. Essa alíquota congelada
- 10 expira 2 meses a partir da data de preparo. Armazenar alíquotas de etanolamina-HCl a 1,0 M, pH de 8,5, a -20°C. Essa alíquota congelada expira 2 meses a partir da data de preparo.

- Tampão de regeneração (citrato de sódio a 10 mM, NaCl a 100 mM, pH de 4,0).** Pesar analiticamente 1,5 ± 0,1 g de Citrato de sódio e
- 15 2,9 ± 0,1 g de NaCl. Adicionar 500 mL de água Milli-Q e ajustar o pH para 4,0 com HCl a 1 N. Filtrar a solução com um filtro de 0,22 µm, então, transformar em alíquotas de 500 mL em tubos cônicos de 45 mL/50 mL. A solução expira 6 meses a partir da data de preparo quando armazenada a 2-8°C.

INSTRUMENTAÇÃO

Instrumento BIAcore C com um computador
PC compatível
Software de controle BIAcore C:

BIAcore (Catálogo No. BR-1100-51)

BIAcore, conforme fornecido com o instrumento BIAcore C, versão 1.0.2

Software de Avaliação

BIAcore, conforme fornecido com o instrumento BIAcore C, versão 1.0

Medidor de pH

ORION, Modelo 720A+

20

PREPARO DE CHIP SENSOR. Inserir um novo Chip sensor CM5 no orifício de cassete sobre a unidade detectora do instrumento. Ope-

rar o sistema conforme descrito no Manual do BIAcore C usando Tampão de HBS-EP.

OPERAÇÃO DO INSTRUMENTO BIAcore C PARA FUNÇÃO DE MÉTODO. O instrumento BIAcore C é controlado a partir de um computador PC compatível sob o ambiente Microsoft Windows com o software de controle BIAcore C. Refira-se às Instruções de Operação, "Operação do Instrumento BIAcore C" e "Calibração e Manutenção do Instrumento BIAcore C" para uso e manutenção do instrumento BIAcore C.

MÉTODO DE IMOBILIZAÇÃO DE B7.1Ig

10 **Preparo de B7.1Ig:** Um frasco contendo B7.1Ig foi descongelado a 22,5 ± 5°C e diluído para uma concentração que imobiliza 3000-9000 RU, usando tampão de acetato a 10 mM, pH de 5,0 como diluente. Um frasco de EDC, NHS e Etanolamina foram, cada um, descongelados do Amine Coupling Kit conforme descrito. Frascos com reagente e ligante foram, então, colocados no suporte de amostra, conforme orientado pelo programa BIAcore e imobilização foi iniciada de acordo com as orientações do instrumento BIAcore.

PREPARO DE CURVA PADRÃO DE CTLA4^{A29YL104E}-Ig

20 Padrões e amostras (tal como CTLA4^{A29YL104E}-Ig, etc) foram descongelados em temperatura ambiente. Padrões usados para gerar uma curva padrão foram diluídos para as concentrações alvo da curva padrão (250, 500, 1000, 2000, 4000 e 8000 ng/mL).

25 Para a diluição de uma amostra de padrões (tal como um material de estoque de CTLA4^{A29YL104E}-Ig) e a concentração sendo de 25 mg/mL, pode-se realizar as seguintes diluições:

- i. Diluir 1/50 (500 µg/mL) através da adição de 20 µL a 980 µL de HBS-EP
- ii. Diluir para 16 µg/mL através da adição de 30 µL de 500 µg/mL a 908 µL de HBS-EP
- 30 iii. Diluir serialmente em 1/2 etapas (500 µL da diluição anterior + 500 µL de HBS-EP) para 250 ng/mL

Cada padrão pode ser analisados em injeções em duplicata que

resultarão em 2 valores de declínio.

AMOSTRAS DE CONTROLE DE QUALIDADE. As amostras de Controle de Qualidade (QC) de CTLA4^{A29YL104E}-Ig são preparadas em Tampão de HBS-EP nos três níveis de concentração alvo de 750, 2500 e 5000 ng/mL e são congeladas em frascos plásticos de 7 mm como alíquotas de 200 μ L a -80°C. As concentrações de CTLA4^{A29YL104E}-Ig nas amostras de QC são determinadas em três experimentos de análise de concentração independentes usando esse método. Em cada experimento, todas as amostras de injeções de QC devem ser aceitáveis, detectando dentro de \pm 20% das concentrações nominais. As amostras de QC qualificadas e congeladas expiram 6 meses após preparo. No dia de um experimento, descongelar um frasco de cada uma das três amostras de QC em temperatura ambiente. Colocar as amostras de QC nas posições do suporte de amostra conforme descrito no wizard do método e analisar cada QC com injeções triplicatas. Alternativamente, QCs podem ser preparadas frescas no dia de análise.

AMOSTRAS DE TESTE DE CTLA4^{A29YL104E}-Ig. Amostras de CTLA4^{A29YL104E}-Ig têm de ser diluídas para uma concentração dentro da faixa do ensaio (entre 750 e 5000 ng/mL). Amostras com uma concentração aproximada conhecida de CTLA4^{A29YL104E}-Ig deverão ser diluídas para uma concentração alvo de 2000 ng/mL. Após descongelamento das amostras em temperatura ambiente, elas são diluídas para uma concentração alvo de 2000 ng/mL usando Tampão de HBS-EP. Diluições de amostra podem ser preparadas para análise em tubos de ensaio de polipropileno certificados para BIAcore ou uma lâmina de microtitulação com 96 cavidades. O seguinte é um exemplo para a diluição de uma amostra de teste de CTLA4^{A29YL104E}-Ig:

Após descongelamento das amostras em temperatura ambiente, amostras de CTLA4^{A29YL104E}-Ig foram diluídas para uma concentração dentro da faixa do ensaio (tal como entre 750 ng/ml e 5000 ng/mL). As amostras com concentração aproximada conhecida de CTLA4^{A29YL104E}-Ig deverão ser diluídas para uma concentração alvo de 2000 ng/mL usando Tampão de HBS-EP em tubos de ensaio de polipropileno certificados para BIAcore ou uma lâmina de microtitulação com 96 cavidades.

O seguinte é um exemplo para a diluição de uma amostra de CTLA4^{A29YL104E}-Ig (concentração = 25,0 mg/mL):

i. Diluir 1/50 (500 µg/mL) através da adição de 20 µL a 980 µL de HBS-EP

5 ii. Diluir 1/25 (20 µg/mL) através da adição de 30 µL de 500 µg/mL a 720 µL de HBS-EP

iii. Diluir 1/10 (2 µg/mL) através da adição de 100 µL de 20 µg/mL a 900 µL de HBS-EP

Submeter a turbilhonameto em cada diluição na velocidade moderada durante 2-4 segundos. As amostras são preparadas em triplicata (três diluições independentes a partir da solução de amostra de estoque) e cada diluição é analisada com uma injeção. As amostras foram preparadas em triplicata (três diluições independentes a partir da solução de amostra de estoque) e cada diluição foi analisada com uma injeção.

15 **COMEÇANDO ANÁLISE USANDO O SOFTWARE BIACORE**

C: Abrir o software de controle BIAcore C e selecionar *File->Project->Published->8164-2 -> Concentration Analysis Wizard*. Clicar em "Next" e selecionar um *template* publicado apropriado para a análise a ser realizada, por exemplo, "CTLA4^{A29YL104E}-Ig Sample Concentration Analysis. blw". Inserir o número máximo de amostras para a análise planejada. Esse número de amostras inclui réplicas, então, por exemplo, para analisar 8 amostras em triplicata, o número 24 deverá ser inserido. Selecionar Célula de fluxo (1-4) sobre a qual o ligante B7.1Ig foi imobilizado. Clicar em "Next" e inserir ID da amostra, fatores de diluição e número de réplicas. Clicar em "Next" e verificar posições do frasco. Nesse ponto, as posições dos frascos podem ser movidas para os locais desejados. Clicar em "Next" e confirmar o set-up e escolhas para o ensaio na tela "*Preparation for Analysis*". Clicar em "Next" sobre a barra de rolagem. Colocar os padrões, QC's, soluções de regeneração e amostras de teste nas posições apropriadas. Clicar em "Start" para

20

25

30

começar a análise.

AVALIAÇÃO DE DADOS.

Iniciar o software BIAcore C e abrir o arquivo BIAcore***.blr que

foi gerado. Então, selecionar "*Wizard Results*" do menu "*View*" para avaliar os dados.

Valores exemplificativos para superfície de B7.1Ig

5 A massa de B7.1Ig immobilizada sobre uma célula de fluxo inativada foi expressa como RU's (unidades de ressonância). A massa de superfície deverá estar entre 3000 a 9000 RU's para desempenho ótimo do ensaio. Se a massa de superfície não vai de encontro a esse valor exemplificativo, um ajuste do tempo de ativação (injeção de EDC/NHS) ou da concentração de B7.1Ig pode ser feito e outra célula de fluxo pode ser immobilizada.

10 Valores exemplificativos para tendência de linha de base

A tendência de linha de base de cada operação foi calculada como a alteração percentual da linha de base ("valores de resposta absolutos") entre cada ciclo com relação à massa de superfície immobilizada do ligante. A maior alteração percentual entre qualquer dois ciclos da operação 15 deve ser $\leq 5,0\%$. Por exemplo: se a linha de base no ciclo 20 = 13500 RU, linha de base no ciclo 23 = 13650 RU e densidade de superfície de B7.1Ig = 6000 RU, então, a tendência de linha de base = $(13650-13500)/6000 \times 100 = 2,5\%$.

Valores exemplificativos para os padrões

20 Valores exemplificativos se aplicam às concentrações de Curva Padrão em ou acima de 500 ng/mL. O coeficiente de variação (CV %) dos valores em cada valor de declínio em cada concentração de padrão usada para determinar a curva padrão devem estar dentro de $\leq 10\%$. Os valores médios de concentração (ng/mL) em cada concentração de padrão devem 25 estar dentro de 15% do valor alvo (nominal). A diferença entre a concentração calculada e o alvo (concentração nominal) pode ser dividida pela concentração alvo (nominal) e multiplicada por 100. Por exemplo, no padrão de 500 ng/mL, a concentração calculada no BIAcore C é de 510 ng/mL. O desvio % será calculado como segue :

30 $(510 \text{ ng / mL} - 500 \text{ ng / mL}) / 500 \text{ ng/mL} \times 100\% = 2,0\%$.

Valores exemplificativos para amostras de QC: O CV % dos valores médios de concentração em triplicata para cada concentração alvo

de amostra de QC devem estar dentro de $\pm 10\%$. Os resultados da amostra de QC devem estar dentro de $\pm 15\%$ de seus respectivos valores alvo durante pelo menos sete das nove determinações de QC. A diferença nos valores de declínio entre a primeira e última injeção de QC ao nível de 2500 ng/mL devem estar dentro de $\pm 5,0\%$. Por exemplo, o primeiro valor de declínio é de 10.366 RU/s e o último valor de declínio é 10.230 RU/s, a diferença percentual será como segue:

$$(10,366-10,230) / 10,366 \times 100\% = 1,3\%$$

Valores exemplificativos para amostras de teste

10 O CV % das observações em triplicata obtidas para cada concentração alvo de amostra de teste devem estar dentro de 20%. Os valores de declínio para a amostra devem estar na faixa do método: declínio médio na amostra de controle de qualidade 1 \pm declínio médio da amostra \pm declínio médio da amostra de controle de qualidade 3.

15 CÁLCULOS DE RESULTADOS PARA AMOSTRA

Para determinar a ligação percentual da amostra de teste com relação ao material de CTLA4^{A29YL104E}-Ig, um valor de concentração para cada amostra de teste é calculado a partir da Curva Padrão em ng/mL. O "Wizard Results" do instrumento BIAcore calcula a concentração de CTLA4^{A29YL104E}-Ig na amostra não diluída em mg/mL, baseado no fator de diluição inserido para cada amostra.

25 ***Determinação da ligação percentual:*** Um valor de concentração média para cada amostra testada pode ser multiplicado por 100 e dividido pela concentração reportada de proteína da amostra conforme determinado através da absorbância medida a 280 nm (A_{280}). O valor pode, então, ser reportado ao número inteiro mais próximo como ligação percentual com relação à amostras padrões. Por exemplo, a amostra foi diluída em um fator de diluição de 12.500 (concentração de amostra de proteína de aproximadamente 25 mg/mL). A concentração média de CTLA4^{A29YL104E}-Ig das injeções em triplicata da amostra é de 25,3 mg/mL. A A_{280} para a amostra é de 30 24,2 mg/mL. A ligação percentual calculada com relação à amostras padrões pode ser como segue : $25,3 \text{ mg/mL} / 24,2 \text{ mg/mL} \times 100\% = 104,545 \%$.

Template do Wizard de imobilização de CTLA4^{A29YL104E}-Ig

Parâmetros de injeção de imobilização

	EDC/ NHS	B7, 1-Ig	Etanolamina	Citrato
Tempo de contato (min)	7	7	6	2
Taxa de fluxo (µL/min)	5	5	5	10
Volume de injeção (µL)	35	35	30	20

Pontos reportados de imobilização

ID	Tempo (s)	Antes/Após	Começar de/Terminar de	Injeção
Linha de base	10	Antes	Começar de	1ª Inj
Ativação	10	Antes	Começar de	2ª Inj
Nível de imobilização	85	Após	Terminar de	3ª Inj

continuação

Tipo	Com relação à	Janela (s)	Relatório
AbsResp	---	5	Não
RelResp	Linha de base	5	Não
RelResp	Linha de base	5	Sim

5 Exemplo 42: Correlações Entre dados analíticos de Carboidrato de CTLA4-Ig e dados farmacocinéticos

As estruturas de carboidrato sobre CTLA4-Ig mostram um papel importante na farmacocinética (PK) da composição terapêutica de CTLA4-Ig. Vários métodos analíticos foram desenvolvidos para caracterizar essas estruturas de carboidrato. Dois parâmetros analíticos se correlacionam bem com as taxas de clearance : a proporção de ácido siálico (NANA) para proteína de CTLA4-Ig e o percentual de Domínios III e IV do perfil de carboidrato. Um terceiro parâmetro (a proporção de galactose para manose a partir de análise de monossacarídeo) também parece se correlacionar bem. Por exemplo, as especificações para esses parâmetros podem ser:

Proporção de NANA:proteína de CTLA4-Ig: $\geq 8,0$

Perfil de carboidrato: Domínios III e IV $\geq 25\%$ (Método 1)

Proporção de Galactose: Manose $\geq 0,65$

Uma etapa importante no processo de fermentação de CTLA4-Ig

pode ser a seleção de parâmetros de coleta que maximizará o rendimento (titulação) do produto final compreendendo características especificadas aqui (veja Tabela 6). Um dos parâmetros (proporção de NANA: proteína) é suficientemente rápido e preciso para ser usado como um dos parâmetros de coleta. Uma proporção molar alvo de NANA para proteína de CTLA4-Ig de cerca de 8,0 pode assegurar que a maioria da coleta terá uma proporção de NANA >7,0. Intensificações durante purificação podem, subsequentemente, produzir moléculas de CTLA4-Ig com uma proporção de NANA >9,0.

CTLA4-Ig é uma glicoproteína com vários sítios de glicosilação N-ligada e O-ligada. As estruturas de carboidrato N-ligadas são, tipicamente, bi- ou tri-antênarias e, se totalmente sialiladas, terminam com os carboidratos NANA-Gal-GlcNAc. A maioria das moléculas são apenas parcialmente sialiladas e contêm algumas cadeias de carboidrato terminando com Gal ou GlcNAc. A ausência de resíduos de ácido siálico terminais (NANA) é um fator que leva à taxas de exposição aumentadas da corrente sanguínea. Nesse Exemplo, são apresentados dados indicando que a galactose terminal também proporciona alguma proteção contra clearance rápida.

Um parâmetro primário usado para avaliar glicosilação é a proporção molar de NANA: proteína de CTLA4-Ig. Estudos de PK de macaco tinham mostrado que clearance aceitável poderia ser obtida usando moléculas de CTLA4-Ig com uma proporção de NANA de 6,9. O primeiro Lote de Material de Processo Y de CTLA4-Ig (composição de CTLA4-Ig obtida do Processo Y) testado em macacos tinha uma proporção de NANA de 7,1. Surpreendentemente, descobriu-se que ele era eliminado duas vezes tão rapidamente quanto o material de CTLA4-Ig com uma proporção de NANA de 6,9. Uma revisão da análise de monossacarídeo das duas amostras indicou que o Material do Processo X tinha significativamente mais galactose do que o Processo com material de CD-CHO. Um processo foi desenvolvido, o qual incluía galactose na alimentação (CD-CHO1). A CTLA4-Ig produzida através desse Processo tinha níveis de galactose e ácido siálico maiores do que o material do Processo Y. Os dados analíticos e de PK para material do Processo com CD-CHO1 são discutidos abaixo e comparados com o materi-

al do Processo Y e do Processo X.

Métodos analíticos

O ensaio de perfil de carboidrato consiste da remoção enzimática das estruturas de carboidrato inteiras e sua separação através de cromatografia de troca de ânions. Os picos de carboidrato se decompõem em quatro ou cinco agrupamentos ("domínios") baseado grandemente no número de resíduos de ácido siálico em cada estrutura. O Domínio I é grandemente asialilado, o Domínio II é mono-sialilado, o Domínio III é di-sialilado, o Domínio IV é tri-sialilado e o Domínio V é tetra-sialilado. A área sob cada pico ou o Domínio pode ser determinado e reportada como um percentual da área total sob todos os picos.

A taxa de clearance foi determinada através de injeção em triplicata em macacos de 10 mg/kg de CTLA4-Ig, então, acompanhando a diminuição da concentração no soro durante um período de 28 dias. A taxa de clearance está relacionada à "área sob a curva" medida ou AUC. A AUC está relacionada à clearance, uma maior taxa de clearance está relacionada a uma menor AUC e uma menor taxa de clearance a um maior valor de AUC. Valores maiores representam clearance mais lenta de CTLA4-Ig.

A FIG. 50 representa várias das muitas estruturas de carboidrato N-ligado encontradas em proteínas de mamífero. Todas as cadeias compartilham uma estrutura central em comum contendo dois resíduos de GlcNAc e três de manose. A partir desse núcleo, duas a quatro cadeias se estendem, consistindo de uma de três estruturas: -GlcNAc-Gal-NANA, -GlcNAc-Gal ou -GlcNAc (FIG. 50, estruturas (1), (2) e (3)). Admite-se que o ácido siálico terminal (NANA) é responsável pela redução da clearance da proteína da corrente sangüínea. Foi uma surpresa verificar que a taxa de clearance de CTLA4-Ig duplicou em um estudo de PK de macaco (Tabela 56), mesmo embora a proporção de NANA permanecesse a mesma (Tabela 56 – amostras CTLA4-Ig S1 e CTLA4-Ig (-) Gal, respectivamente, na FIGS. 51-52). Uma diferença observada entre as amostras, preparadas em diferentes meios, foi a proporção de galactose-para-proteína, a qual era significativamente maior na amostra preparada através do processo X do que através do processo Y

(CTLA4-Ig). Isso sugeriu que a taxa de clearance foi primariamente determinada pelos resíduos de GlcNAc terminais e que a galactose terminal poderia proporcionar alguma proteção. Para aumentar a galactosilação de CTLA4-Ig, galactose foi adicionada à alimentação para o Processo Y. O novo Processo (CD-CHO1; CTLA4-Ig S2 na FIGS 51-52) aumentou significativamente a galactose e proporções molares de NANA da CTLA4-Ig no bio-reatores.

Outros estudos de PK de macaco foram realizados. Esses incluíram produto de CTLA4-Ig produzido através dos três diferente processos (Processo X, Processo Y e o Processo com CD-CHO1; CTLA4-Ig S1, CTLA4-Ig (-) Gal e CTLA4-Ig S2, respectivamente na FIGS: 51-52). Além disso, CTLA4-Ig com uma proporção muito baixa de NANA (recuperada de uma etapa de lavagem no procedimento de purificação; veja FIG. 62) foi testada. Os dados analíticos e de P de todas as amostras testadas até o momento são compilados na Tabela 56. No estudo de PK mais recente (Tabela 56), CTLA4-Ig produzida a partir de uma operação de fermentação pelo Processo Y prolongado (CTLA4-Ig S3) foi avaliada.

A FIG. 51 mostra a correlação entre a proporção de NANA e os valores de AUC em PK de macaco para todas as amostras nos quatro estudos. As amostras preparadas através do Processo Y (veja CTLA4-Ig (-) Gal na FIG. 51) e do Processo com CD-CHO1 (CTLA4-Ig S2 na FIG. 51) mostraram uma forte correlação entre esses parâmetros, indicando que a proporção de NANA tem um impacto significativo sobre ataxa de clearance de CTLA4-Ig. Análise da tendência para esses pontos indica que, em NANA = 9, CTLA4-Ig preparada através do Processo Y (CTLA4-Ig (-) Gal) ou CD-CHO1 (CTLA4-Ig S2) será eliminada em cerca da mesma taxa que o material de Processo X CTLA4-Ig S1). Redução da proporção de NANA para 8 reduz a AUC no PK de macaco em de cerca de 25%, enquanto que aumento da proporção para 10 aumenta a AUC em cerca de 25%. Embora haja uma forte correlação entre NANA e AUC dentro do contexto dos Processos Y (CTLA4-Ig (-) Gal) e CD-CHO1 (CTLA4-Ig S2), é importante lembrar que NANA = 7 para material X (CTLA4-Ig S1) com a mesma taxa de clearance que o material CD-CHO1 (CTLA4-Ig S2) com uma proporção de NANA de 9. Portanto, a

proporção de NANA não é unicamente responsável pela determinação da taxa de clearance de CTLA4-Ig.

Tabela 56. Avaliação de Carboidrato de CTLA4-Ig. M-1 indica que o Material de CTLA4-Ig foi analisado usando o Método 1, M-2 indica que o Material de CTLA4-Ig foi analisado usando um método ligeiramente diferente, Método 2, "PA" indica que o material que é uma amostra purificada em proteína A do caldo de fermentação.

<u>ENSAIO</u>	Processo de Ferm. <u>PARÂMETRO</u>	Proces- so X <u>MÉDIA</u>	<u>SD</u>	Processo Y <u>MÉDIA</u>	<u>SD</u>	Processo Y <u>MÉDIA</u>	<u>SD</u>
Ácido siálico	NaNA: PROT.	6,9		7,1		6,9	
Perfil de carboidrato	% Domínio 1 (PA)					43,1%	
	% Domínio 2 (PA)					32,8%	
	% Domínio 3 (PA)					19,7%	
	% Domínio 4 (PA)					3,7%	
	% Domínio 1 (M-1)	42,4%					
	% Domínio 2 (M-1)	28,2%					
	% Domínio 3 (M-1)	21,1%					
% Domínio 4 (M-1)	7,4%						
Análise de monossacarídeo	Manose	17,3		17,2		15,0	
	Fucose	5,7		5,7		6,7	
	Galactose	13,1		8,1		9,1	
	GalNAc	2,7		3,4		3,2	
	GlcNAc	19,9		21,3		26,3	
PK de macaco DS02051-1	Gal:	Man 75,7%		47,1%		60,7%	
	Gal:	GlcNAc 65,8%		38,0%		34,6%	
PK de macaco DS02051-2	AUC (horas*µg/ml)	17060	1171	8832	2203	7765	1247
	AUC (horas* µg/ml)	15753	4395				
PK de macaco DS02051-3	AUC (Horas* µg/ml)	15459					
	AUC (Horas* µg/ml)						
PK de macaco DS03228	AUC (Horas* µg/ml)						

<u>ENSAIO</u>	Processo de Ferm. <u>PARÂMETRO</u>	Processo Y <u>MÉDIA</u>	<u>SD</u>	CD-CH01 <u>MÉDIA</u>	<u>SD</u>
Ácido sialico	NaNA: PROT. (M-2)	7,3		9,9	
Perfil de car- boidrato	% Domínio 1 (PA)			36,0%	
	% Domínio 2 (PA)			35,6%	
	% Domínio 3 (PA)			23,1%	
	% Domínio 4 (PA)			5,2%	
	% Domínio 1 (M-1)	42,9%		33,6%	
	% Domínio 2 (M-1)	33,5%		31,6%	
	% Domínio 3 (M-1)	18,4%		27,5%	
	% Domínio 4 (M-1)	3,6%		5,9%	
Análise de monossacári- deo	Manose	19,6		18,0	
	Fucose	4,6		4,8	
	Galactose	11,1		15,8	
	GalNAc	3,3		3,3	
	GlcNAc	21,9		22,3	
	Gal: Man	56,6%		87,8%	
Gal: GlcNAc	50,7%		70,9%		
PK de macaco DS02051-1	AUC (horas*µg/ml)				
PK de macaco DS02051-2	AUC (horas* µg/ml)	7266	787	20445	2425
PK de macaco DS02051-3	AUC (Horas* µg/ml)				
PK de macaco DS03228	AUC (Horas* µg/ml)				

<u>ENSAIO</u>	Processo de Ferm. <u>PARÂMETRO</u>	Processo X <u>MÉDIA</u>	<u>SD</u>	(d12) CD-CH01 <u>MÉDIA</u>	<u>SD</u>	(d16) CD-CHO1 <u>MÉDIA</u>	<u>SD</u>
Ácido siálico	NaNA: PROT.	2,3		9,8		8,8	
Perfil de carboidrato	% Domínio 1 (PA)	63,8%		34,1%		42,0%	
	% Domínio 2 (PA)	26,5%		28,3%		30,1%	
	% Domínio 3 (PA)	7,3%		25,7%		22,4%	
	% Domínio 4 (PA)	2,4%		10,7%		5,3%	
	% Domínio 1 (M-1)			34,8%		38,2%	
	% Domínio 2 (M-1)			28,7%		34,8%	
	% Domínio 3 (M-1)			30,1%		22,5%	
	% Domínio 4 (M-1)			6,1%		4,3%	
	% Domínio 1 (M-2)			37,8%		44,4%	
	% Domínio 2 (M-2)			34,5%		32,8%	
	% Domínio 3 (M-2)			22,8%		19,6%	
	% Domínio 4 (M-2)			5,0%		3,2%	
Análise de monossaca- rídeo	Manose	17,9		13,6		14,5	
	Fucose	5,5		5,4		5,3	
	Galactose	4,1		12,8		11,4	
	GalNAc	2,9		2,1		2,2	
	GlcNAc	22,0		26,3		19,9	
	Gal: Man		22,9%		94,1%		78,6%
Gal: GlcNAc		18,6%		48,7%		57,3%	
	AUC (horas*µg/ml)						

PK de macaco DS02051-1			
PK de macaco DS02051-2	AUC (horas* µg/ml)	2337	41 4
PK de macaco DS02051-3	AUC (Horas* µg/ml)		20707 15779
PK de macaco DS03228	AUC (Horas* µg/ml)		

<u>ENSAIO</u>	<u>Processo de Fern. PARÂMETRO</u>	<u>(d14) Processo X MÉDIA</u>	<u>SD</u>	<u>(d16) CD-CHO1 MÉDIA</u>	<u>SD</u>	<u>(d16) CTLA4-Ig S3 CD-CHO1 MÉDIA</u>	<u>SD</u>
Ácido siálico	NaNA: PROT. (BAS)	10,0		10,3		7,9	
Perfil e carboidrato	% Domínio 1 (PA)	38,6%		41,3%		56,2%	
	% Domínio 2 (PA)	30,1%		32,2%		26,9%	
	% Domínio 3 (PA)	23,1%		21,9%		13,1%	
	% Domínio 4 (PA)	7,6%		4,6%		3,7%	
	% Domínio 1 (M-1)			39,5%		49,0%	
	% Domínio 2 (M-1)			31,8%		29,1%	
	% Domínio 3 (M-1)			21,9%		15,7%	
	% Domínio 4 (M-1)			7,8%		6,3%	
	% Domínio 1 (M-2)	38,2%		36,2%		47,1%	
	% Domínio 2 (M-2)	33,7%		34,3%		33,6%	
% Domínio 3 (M-2)	24,6%		21,1%		14,5%		
% Domínio 4 (M-2)	3,6%		8,4%		4,8%		
Análise de monossacárido	Manose	14,8		14,7		11,8	
	Fucose	5,3		4,9		5,7	
	Galactose	13,0		12,6		11,5	
	GalNAc	2,2		2,2		2,3	
	GlcNAc	20,2		16,3		28,4	
PK de macaco DS02051-1	Gal: Man	87,8%		85,7%		97,5%	
	Gal: GlcNAc	64,4%		77,3%		40,5%	
PK de macaco DS02051-2	AUC (horas* µg/ml)						
PK de macaco DS02051-3	AUC (Horas* µg/ml)	18750					
PK de macaco DS03228	AUC (Horas* µg/ml)			17739	25 46	9425	150 4

Outro estudo de PK de macaco (Tabela 56) foi realizado para comparar as taxas de clearance de CTLA4Ig produzida através dos três diferentes processos (Processo X, Processo Y e Processo com CD-CHO1). Além disso, CTLA4Ig com uma proporção muito baixa de NANA (recuperada de uma etapa de lavagem no procedimento de purificação (PA)) foi incluída

no estudo. CTLA4Ig preparada através do Processo com CD-CHO em bio-reatores de 50L ou 5000L tinha proporções molares de NANA próximas do Material do Processo X e, no estudo de PK, ambos tinham valores de AUC de cerca de metade o valor do processo X. CTLA4Ig produzida através do

5 Processo com CD-CHO1 tinha uma maior proporção de NANA do que o material de Processo X (9,9 vs. 6,9) e um valor de AUC cerca de 30% maior, indicando uma taxa de clearance mais lenta. O material de lavagem pobremente sialilado e galactosilado (NANA = 2,3) foi eliminado extremamente rápido (AUC = 2337 hora- μ g/ml vs. 15753 para o material de Processo X).

10 Outro estudo de PK de macaco (Tabela 56) comparou CTLA4Ig preparada através do Processo com CD-CHO1 em bio-reatores de 5.000 L e coletada em diferentes dias. Durante o curso da operação de fermentação, a proporção de NANA, tipicamente, picos em torno do Dia 8, então, declina gradualmente. A partir de duas operações, alíquotas foram removidos nos

15 Dias 12, 14 e 16, então, purificadas. Após purificação, as proporções de NANA oscilavam de 8,8 a 10,0. Nos Dias 12 e 14, amostras (NANA = 9,8 e 10,0 respectivamente) tinham valores de AUC 20-30% maiores do que o material de Processo X. No Dia 16, a amostra (NANA = 8,8) tinha um valor de AUC quase idêntico ao material de Processo X.

20 Outra ferramenta analítica para avaliar a glicosilação de CTLA4-Ig é o perfil de carboidrato. Estruturas de carboidrato N-ligado inteiras são enzimaticamente removidas e separadas através de HPLC de troca de ânions. Um grande número de picos são gerados, os quais se decompõem em quatro ou cinco domínios (veja FIGS. 58-62). Os Domínios I e II são estruturas grandemente asialiladas e mono-sialiladas, enquanto que os Domí-

25 nios III e IV e V são estruturas grandemente di- e tri- e tetra-sialiladas.

Foi empiricamente observado que o percentual do perfil total nos Domínios III e IV se correlacionava bem com a AUC para todas as amostras, incluindo o material de Processo X (FIG. 52). Espera-se que a maioria das

30 estruturas nesses domínios sejam totalmente sialiladas e galactosiladas. Usando dados do grupo M-1, um percentual de Domínio III e IV de cerca de 29% deverá ter a mesma taxa de clearance conforme o material de Proces-

so X. Os dados dos Domínios III e IV a partir do Método 2 são, tipicamente, cerca de 4% menores (21% vs. 25%) do que os dados gerados através do Método 1.

Além disso, também foi observado que o percentual do perfil total no Domínios I e II se correlacionava bem com a AUC para todas as amostras (FIG. 57). Espera-se que a maioria das estruturas nesses domínios sejam estruturas grandemente asialiladas e mono-sialiladas. A FIG. 57 mostra que a taxa de clearance foi maior nas amostras com um menor percentual dos Domínios I e II versus aquelas amostras com um maior percentual dos Domínios I e II. A glicosilação diminuída dos Domínios I e II se correlaciona com a presença presumivelmente aumentada de peptídeos glicosilados no Domínios III e IV.

Embora a proporção molar de ácido siálico para proteína tenha sido tradicionalmente usada para prever a taxa de clearance para CTLA4Ig, diferentes meios de fermentação têm produzido moléculas com a mesma proporção de NANA, mas diferentes taxas de clearance em estudos de PK de macaco. Para desenvolver uma melhor forma de prever as taxas de clearance, dois outros conjuntos de dados analíticos (análise de monossacarídeo e perfil de carboidrato) foram avaliados e comparados com dados de PK de macaco. O parâmetro analítico mais previsível foi a extensão de galactosilação de CTLA4Ig. Para reduzir a variabilidade analítica desse ensaio, a proporção molar de galactose foi normalizada para a proporção molar de manose. A proporção de Gal:Man resultante se correlacionava bem com os resultados de AUC do estudo de PK de macaco para todas as amostras, incluindo o material de Processo X. Esse resultado é consistente com um modelo em que a taxa de clearance de CTLA4Ig é primariamente determinada pelo número de resíduos de GlcNAc terminais expostos sobre a molécula. Se esse modelo está correto, a extensão de galactosilação poderia prever as taxas de clearance melhor do que a sialilação. Para assegurar que comparabilidade farmacocinética (AUC > 75% de material do Processo X), uma especificação para uma proporção de galactose para manose de Gal: Man > 0,65 é recomendada para Substância de Fármaco de CTLA4-Ig bruta purifi-

cada (BDS).

Quando apenas material preparado através do Processo Y ou Processo com CD-CHO1 é analisado, a proporção molar de NANA para proteína pode prever as taxas de clearance precisamente. Essa relação não se aplica, contudo, ao material preparado através do Processo X. Para ser comparável ao Material do Processo X, CTLA4-Ig preparada através do Processo Y ou do Processo com CD-CHO1 deve ter uma proporção de NANA 2 unidades maior (NANA = 9 para CD-CHO1 é comparável com NANA = 7 para o Material do Processo X). Em virtude do fato de o ensaio de ácido siálico ser preciso e ter um rápido tempo de operação, ele é útil como uma ferramenta analítica em-Processo para monitorar a qualidade da CTLA4Ig durante a operação de fermentação.

Para manter farmacocinética comparável ($AUC > 75\%$ da referência), uma especificação de NANA > 8 é recomendada para BDS purificada. Esse valor também representa um alvo razoável para coleta das operações de fermentação. Em virtude do fato de o processo de purificação aumentar a proporção de ácido siálico em pelo menos 2 unidades, ajuste do alvo de coleta em NANA = 8 assegurará um valor de coleta real de pelo menos NANA = 7. O processo de purificação aumenta esse valor para pelo menos NANA = 9, o qual é comparável com o material de Processo X e bem acima da especificação mínima recomendada antes mencionada da BDS.

O perfil de carboidrato também preveu os resultados de PK de macaco para Material de Processo X e Material de Processo Y quando a área percentual sob os Domínios III e IV foi comparada com a AUC. Os Domínios III e IV consistem grandemente de estruturas de carboidrato totalmente sialiladas e galactosiladas.

Os dados na Tabela 56 podem ser ainda apresentados de modo a mostrar uma correlação entre um valor de AUC, o valor de NANA, o valor de Gal e o percentual total da soma da AUC dos Domínios II e IV. Veja abaixo:

AUC	NANA	Gal	Soma dos Domínios III e IV
2.337	2,3	4,1	9,7
8.832	7,1	8,1	19,7
7.266	7,3	11,1	22,0
9.425	7,9	11,5	22,0
7.765	6,9	9,1	23,4
15.779	8,8	11,4	26,8
18.750	10	13,0	28,2
17.060	6,9	13,1	28,5
15.753			
15.459			
17.739	10,3	12,6	29,7
20.445	9,9	15,8	33,4
20.707	9,8	12,8	36,2

Essa tabela acima mostra que há uma correlação entre a soma dos Domínios III (e IV) e os resultados de PK da composição. A AUC dos Domínios III e IV e V são diretamente relacionadas à proporção molar de NANA e Gal para moles de proteína de CTLA4-Ig. Portanto, a invenção proporciona composições caracterizadas pelo fato de que seu perfil de carboidrato contém a soma dos Domínios III e IV ou a soma dos Domínios III, IV e V de 18 a cerca de 37 AUC %. Em uma modalidade, a soma dos Domínios II, IV e V é cerca de 19 a cerca de 36, é cerca de 20 a cerca de 35, é cerca de 21 a cerca de 34, é cerca de 22 a cerca de 33, é cerca de 23 a cerca de 32, é cerca de 24 a cerca de 31, é cerca de 25 a cerca de 30, é cerca de 26 a cerca de 29, é cerca de 27 a cerca de 28 AUC %. Em uma modalidade, a invenção proporciona Composições de CTLA4-Ig caracterizadas pelo fato de que o Domínio III tem uma AUC % do total de 19 \square 4; e o Domínio IV tem uma AUC % do total de 7 \square 4.

Exemplo 43: Mapeamento tríptico de peptídeo de CTLA4-Ig

CTLA4-Ig derivada de células de Ovário de Hâmster Chinês (CHO) transfectadas é uma glicoproteína com uma massa molecular de aproximadamente 92500 Dáltons. Mapeamento peptídico é um método altamente sensível para determinação da identidade da estrutura primária de uma proteína e é útil na detecção de modificações pós-traducionais. A proteína é desnaturada usando guanidina-HCl, reduzida e alquilada usando DTT

e IAA. A proteína é dessalinizada usando colunas NAP-5 e a mistura digerida é analisada através de cromatografia de fase reversa (C18). Detecção de pico é feita através de absorvância de UV a 215 nm.

REAGENTES: Solução de Fase móvel A (ácido trifluoroacético a 0,02 % (TFA) em Água (v/v)); solução de Fase móvel B (TFA a 0,02% em ACN a 95% (Acetonitrilo) e 5 % de água (v/v)); agente de alquilação (iodoacetamida a 200 mM (IAA)); Tampão de diluição (TRIS a 100 mM, NaCl a 25 mM, pH de 8,0); Tampão de desnaturação (guanidina a 8 M, TRIS a 50 mM, pH de 8,0); Tampão de Digestão (TRIS a 50 mM, CaCl₂ a 10 mM, pH de 8,0); Agente de Redução (DTT a 100 mM).

INSTRUMENTAÇÃO: (instrumentação equivalente pode ser usada) colunas NAP-5 (Amersham, cat. # 17-0853-02); Aquecedor para coluna de HPLC; Waters System Alliance HPLC com aquecedor de coluna e detector de UV.

Redução e Alquilação: Amostras (por exemplo, CTLA4^{A29YL104E}, Ig, padrões, etc.) foram diluídas para 10 mg/ml através da adição de água para um volume final de 100 μ L (1 mg). 560 μ L de tampão de desnaturação e 35 μ L de Agente de Redução (DTT a 100 mM) foram adicionados à amostras de 100 μ L, misturados e centrifugados em uma microcentrífuga durante 3 segundos. As amostras foram, então, incubadas a 50°C durante 20 minutos \pm 2 minutos. 35 μ L de agente de alquilação (IAA a 200 mM) foram, então, adicionados a cada amostra e novamente as amostras foram misturadas e centrifugadas em uma microcentrífuga durante 3 segundos. As amostras foram subsequentemente incubadas a 50°C durante 20 min. \pm 2 minutos, no escuro. Após as colunas NAP-5 terem sido equilibradas entornando 3 volumes de coluna (cerca de 7-8 mL) de Tampão de Digestão, 500 μ L das misturas reduzidas e alquiladas foram entornadas sobre as colunas NAP-5, permitindo que o líquido drenasse através da coluna. As amostras foram, então, coletadas das colunas NAP-5 via eluição da amostra da coluna com 1 mL de Tampão de Digestão.

Digestão: Amostras foram digeridas com 20 μ L de tripsina (0,5 μ g/ μ L) em um banho de água a 38°C durante 4 horas (\pm 0,5 horas). Quando

de término da digestão, as amostras foram acidificadas com 2,5 µL de TFA. As amostras foram, então, colocadas em frascos para amostrador automático para subsequente análise.

Método de Instrumento: O método do instrumento é mostrado abaixo:

Tempo (min)	Fluxo (mL/min)	Fase móvel A	Fase móvel B
0	0,7	100	0
17	0,7	83	17
27	0,7	78	22
42	0,7	73	27
58	0,7	65	35
74	0,7	52	48
79	0,7	0	100
84	0,7	100	0
88	0,7	100	0

- 5 A coluna foi equilibrada com 100% tampão de fase móvel A durante 25 minutos antes das primeiras injeções. A absorbância de UV foi monitorada a 215 nm enquanto a temperatura da coluna foi mantida a 37°C e a temperatura do amostrador automático a 4°C. Placebo de tampão de fase móvel A foi operado antes do primeiro Padrão de Adequabilidade de Sistema, seguido por uma única injeção de 50 µL de cada amostra. Uma injeção de Material de Referência deverá estar entre faixas a cada seis injeções de amostra. O cromatograma por mapeamento peptídico gerado para uma amostra de CTLA4-Ig é representado pela FIG. 53. As diferenças de tempo de retenção para os picos T2, T3, T15 e T19 (FIG. 53 e Tabela 57) entre os cromatogramas de Material de Referência inicial e entre faixas devem ser
- 10
- 15 □0,5 min.

Tabela 57. Fragmentos teoricamente esperados de CTLA4-Ig Digerida com Tripsina

Fragmento No.	Resíduo No.	Massa Monoisotópica	Massa média	Seqüência
T1	1-14	1464,8	1465,7	MHVAQPAVVLASSR
T2	15-28	1484,7	1485,6	GIASFVCEYASPGK
T3	29-33	574,3	574,6	ATEVR
T4	34-38	586,4	586,7	VTVLR
T5*	39-83	4895,2	4898,3	QADSQVTEVCAATYMMGNELTFLD DSICTGTSSGNQVNLTIQGLR
T6	84-93	1170,5	1171,4	AMDTGLYICK

T7*	94-128	3993,9	3996,4	VELMYPPPYLIGINGTQIYVIDPEPC PDSQEPK
T8**	129-132	435,2	435,4	SSDK
T9**	133-158	2687,4	2689,1	THTSPSPAPPELLGGSSVFLFPPKPK
T10	159-165	834,4	835,0	DTLMISR
T11	166-184	2138,0	2139,3	TPEVTCVVVDVSHEDPEVK
T12	185-198	1676,8	1677,8	FNWYVDGVEVHNAK
T13	199-202	500,3	500,6	TKPR
T14*	203-211	1188,5	1189,2	EEQYNSTYR
T15	212-227	1807,0	1808,1	VVSVLTVLHQDWLNGK
T16	228-230	438,2	438,5	EYK
T17	231-232	306,1	306,3	CK
T18	233-236	446,2	446,5	VSNK
T19	237-244	837,5	838,0	ALPAPIEK
T20	245-248	447,3	447,5	TISK
T21	249-250	217,1	217,3	AK
T22	251-254	456,2	456,5	GQPR
T23	255-265	1285,7	1286,5	EPQVYTLPPSR
T24	266-270	604,3	604,7	DELTK
T25	271-280	1160,6	1161,4	NQVSLTCLVK
T26	281-302	2543,1	2544,7	GFYPSDIAVEWESNGQPENNYK
T27	303-319	1872,9	1874,1	TTPPVLDSDGSFFLYSK
T28	320-324	574,3	574,7	LTVDK
T29	325-326	261,1	261,3	SR
T30	327-349	2800,3	2802,1	WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK
T31	350-356	659,3	659,7	SLSLSPG

* Contém carboidrato N Ligado ** Contém carboidrato O Ligado

Número de placas teóricas: Eficiência de coluna, avaliada como o número de placas teóricas, pode ser medida quantitativamente usando o tempo de retenção e a largura de pico de acordo com a Equação:

$$N = 16 \left(\frac{t}{w} \right)^2$$

5 onde:

"w" é a largura de pico na linha de base medida através de extrapolação dos lados relativamente retos para a linha de base, "t" é o tempo de retenção do pico medida a partir do momento de injeção até o momento de eluição do pico máximo.

10

Se $N < 50000$, re-equilibrar a coluna.

Resolução: A resolução (R) entre 2 picos, por exemplo, pico T30 e pico T12 conforme indicado na FIG. 53, pode ser determinada usando a seguinte equação:

$$R = \frac{2(t_2 - t_1)}{(w_1 + w_2)}$$

onde:

t_1, t_2 = tempos de retenção de pico dos fragmentos T30 e pico T12, respectivamente

5 w_1, w_2 = largura de pico tangente-definida na linha de base dos picos com tempos de retenção t_1 e t_2 , respectivamente.

Se $R < 1,5$, a coluna deverá ser re-equilibrada e se o problema persiste, a coluna deverá ser substituída.

Valores exemplificativos:

10 A diferença entre as áreas de pico relativas para os picos T3, T15 e T19 no artigo de teste e Material de Referência deve ser $\leq 10,0$ %. A Área de pico relativa de um pico é definida como a área de pico expressa como um percentual da área de pico de pico T2. A diferença entre as áreas de pico relativas do artigo de teste e a referência de Adequabilidade de sistema inicial é obtida conforme mostrado abaixo. A Área de pico relativa (R_{SX})
15 pode ser calculada para cada um dos picos T3, T15 e T19 no cromatograma do artigo de teste usando a fórmula:

$$R_{SX} = (A_{SX}/A_{S2}) * 100$$

onde:

20 R_{SX} = Área de pico relativa do pico X no cromatograma

A_{SX} = área de pico X na amostra e

A_{S2} = área de pico T2 na amostra.

25 Similarmente, as áreas de pico relativas (R_{RX}) podem ser calculadas para cada um dos picos T3, T15 e T19 no cromatograma do padrão. A diferença entre as áreas de pico relativas na amostra e no padrão (D_X) pode subseqüentemente calculada usando a fórmula:

$$D_X = [(R_{SX} - R_{RX}) / (R_{RX})] * 100$$

30 Se um único pico adicional está presente na amostra, a altura de pico relativa para esse pico, quando comparado com pico T11, pode ser determinada através de uso da seguinte fórmula:

Altura de pico relativa $R_T = (H_T/H_{11}) * 100$ onde

H_T = altura do pico com tempo de retenção t min

H_{11} = altura de pico T_{11} , o pico mais alto no cromatograma.

Em uma modalidade, se a altura de pico relativa do novo pico é $\leq 5,0\%$, então, o perfil é considerado como sendo consistente com o perfil de padrão de CTLA4-Ig. Se a altura de pico relativa do novo pico é $>5,0\%$, então, o perfil é considerado como sendo consistente com o perfil do material padrão de CTLA4-Ig.

Os dados de oxidação percentual foram adquiridos usando um ensaio de mapeamento triptico por RP-HPLC que quantifica a área de oxidação percentual de Met85 na proteína para sulfóxido de metionina. Oxidação percentual no método é obtida através de medição por UV das áreas de pico no mapeamento triptico por RP-HPLC para o peptídeo triptico T6, compreendido dos resíduos 84-93 contendo Met85 e o peptídeo triptico oxidado correspondente, T6ox, contendo Met(O)85. A área de oxidação percentual de Met85 em Met(O)85 é proporcional à área percentual do pico de T6ox:

$$\text{Oxidação percentual} = 100 * A_{T6ox} / (A_{T6ox} + A_{T6})$$

onde,

A_{T6} = área de pico para peptídeo triptico T6, (84-93).

A_{T6ox} = área de pico para peptídeo triptico T6ox, Met(O)⁸⁵(84-93).

Os dados de deamidação percentual foi adquiridos usando um ensaio de mapeamento triptico por RP-HPLC que quantifica a área de oxidação percentual de deamidação no ensaio são obtidos através de medição por UV das áreas de pico no mapeamento triptico por RP-HPLC para o peptídeo triptico T26, compreendido dos resíduos 281-302 contendo Asn294 e do peptídeo triptico deamidado correspondente, T26deam1, contendo iso-Asp294. A área percentual de deamidação de Asn294 para isoAsp294, então, é proporcional à área percentual do pico de T26deam1:

$$\text{Deamidação percentual} = 100 * \frac{A_{T26deam1}}{A_{T26} + A_{T26deam1} + A_{T26deam2} + A_{T26deam3} + A_{T26deam4}}$$

onde,

A_{T26} = área de pico para T26, (281-302)

$A_{T26deam1}$ = área de pico para T26deam1, isoAsp²⁹⁴(281-302).

$A_{T26deam2}$ = área de pico para T26deam2, Asp²⁹⁹(281-302).

$A_{T26deam3}$ = área de pico para T26deam3, Asp²⁹⁴(281-302).

$A_{T26deam4}$ = área de pico para T26deam4, Asu²⁹⁴(281-302).

EXEMPLO 44: Obtenção de perfil de carboidrato N-ligado de oligossacarídeo de CTLA4-Ig através de cromatografia de troca de ânions de elevado desempenho com Detecção eletroquímica

5 As estruturas de carboidrato presentes sobre glicoproteínas podem afetar sua função e *clearance in vivo*. Portanto, é importante monitorar a consistência estrutural dos carboidratos de lotes recombinantemente produzidos de glicoproteínas. CTLA4-Ig é uma proteína recombinante contendo sítios de glicosilação N Ligados e O Ligados (serina Ligados). Aqui, carboi-
10 dratos N Ligados (asparagina-ligados) presentes sobre CTLA4-Ig são monitorados. Nesse método, oligossacarídeos são clivados através de digestão enzimática com PNGase F (Peptídeo: N-Glicosidase F), então, isolados através de HPLC de fase reversa em um sistema com duas colunas, separados através de cromatografia de troca de ânions de elevado desempenho
15 (HPAEC) e monitorados através de detecção eletroquímica (amperometria integrada). O cromatograma gerado é o perfil de carboidrato N Ligado, em que perfis de amostras de CTLA4-Ig deverão ser similar ao mesmo.

Esse método descreve o procedimento para determinar o perfil de oligossacarídeo por HPAEC dos oligossacarídeos N Ligados liberados
20 das amostras de CTLA4-Ig. A finalidade do método é proporcionar perfis cromatográficos de oligossacarídeos N Ligados de Substância de Fármaco de CTLA4-Ig, o qual pode ser usado para análise comparativa. A glicosilação sobre a CTLA4-Ig contém oligossacarídeos N Ligados. Esses oligossacarídeos são liberados através de hidrólise enzimática com PNGase F durante o
25 curso de 22 horas. O perfil dos oligossacarídeos livres é obtido usando cromatografia de troca de ânions em pH elevado empregando detecção eletroquímica. Perfis de oligossacarídeo de Substância de Fármaco são avaliados contra amostras de Material de Referência concorrentemente operadas. Os resultados são reportados como desvio percentual de domínios e picos sele-
30 cionados dos mesmos picos nos padrões de referência.

Dif %	Diferença percentual
% RSD	Desvio relativo percentual
HPAEC	Cromatografia de troca de ânions em pH elevado
HPLC	Cromatografia de líquido de elevado desempenho
NaOAc	Acetato de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
PNGase F	Peptídeo: N-Glicosidase F

MATERIAIS. Materiais equivalentes podem ser substituídos, a menos que de outro modo especificado.

Frascos de recuperação total Waters com septo de silicone/PTFE ligado Waters Corporation, Catálogo No. 186000234

Dispositivos de filtração Microcon YM 10 Centrifugal Millipore, Catálogo No. 42407

RapiGest SF Waters Corporation, Catálogo No. 186001861

5 INSTRUMENTAÇÃO E CONDIÇÕES. Instrumentação equivalente pode ser usada, a menos que de outro modo especificado.

Instrumentação:

Sistema Alliance HPLC equipado com: Amostrador automático (refrigerado), Eluent Degas Module Detector eletroquímico modelo 2465 Waters Corporation

Coluna: CarboPac PA-1 4 x 250 mm Dionex Corporation, Catálogo No. 35391

Coluna de proteção: CarboPac PA-1 4 x 50 mm Dionex Corporation, Catálogo No. 43096

Sistema de coleta de dados Em-power Versão 3.2 ou versão BMS validada atual

Condições de cromatografia para perfil de oligossacarídeo através de cromatografia de troca de íons.

Temperatura da coluna	29 °C		
Taxa de fluxo	1 mL/min		
Fases móveis e condições de gradiente	Programa de gradiente		
1: NaOAc a 500 mM	Time		
2: NaOH a 400 mM	(min)	<u>%1</u>	<u>%2</u>
3: Água com grau para HPLC	Inicial	0	30
	0,0	0	30
	11,0	0	30
	12,0	4	30
	20,0	10	30
	80,0	45	30
	81,0	0	30
	100	0	30

Ajustes do Waters 2465

Modo Pulso

Ajustes do Empower

Faixa = 5 μ A
 E1 = +0,05V E2 = +0,75V E3 = -0,15V
 t1 = 400 mseg t2 = 200 mseg t3 = 400 mseg
 tempo de amostragem (ts) = 100 mseg
 Constante de tempo (filtro) t = 0,1seg
 Faixa de offset = 5%
 Polaridade +
 Temperatura = 29 °C

NOTA: Equilibrar a coluna e detector com a fase móvel inicial na taxa de fluxo de análise durante aproximadamente 2 horas ou até a linha de base estar estável antes de fazer injeções.

5.

Temperatura do amostrador automático ajustada para:

4 °C

Volume de injeção

60 μ L

Tempo de operação

100 minutos

Tempos de retenção aproximados (RT; minutos) de picos dominantes em cada Domínio (veja Figura 1); valores podem variar, dependendo do RT do Padrão de Adequabilidade de Sistema (SS)

SS:

RTs aproximados (min)

Pico 1A:

18,5

Pico 1B:

20,0

Pico 1C:

20,8

21,4

Pico 1D:	22,4
Pico 1E:	23,1
Pico 2	31,5
Pico 3:	44,8
Pico 4:	58,5

Limpeza de eletrodo (Waters 2465). Seguir as instruções de limpeza no manual do detector. Usar a pasta diamante fornecida no kit da célula de fluxo para polir a superfície do(s) eletrodo(s). Se polimento não proporciona resultados aceitáveis, substituir os eletrodos por um novo kit de célula de fluxo. Re-monta a célula de fluxo usando um novo espaçador (50 μm).

REAGENTES

NOTA: Rotular e documentar todos os preparados de reagente de acordo com os procedimentos do departamento.

10 Preparo de Fases móveis para obtenção de perfil de carboidrato de oligossacarídeo por HPAEC.

Eluente 1 de HPAEC: acetato de sódio a 500 mM (NaOAc).

Pesar 20,51 \square 0,05 g de Acetato de sódio (anídrico) em um cilindro graduado de 500 mL contendo 400 mL de água com grau para HPLC. Levar o volume para 500 mL com água com grau para HPLC e agitar durante 5 minutos usando uma pipeta sorológica de plástico até completamente misturado. Filtrar a solução através de a 0,2 μm nylon filtro. Transferir para uma garrafa de eluente de 1 L. Tampar a garrafa frouxamente e purgar com hélio durante 20 minutos. Apertar a tampa e pressurizar a garrafa com hélio. Armazenar a solução em temperatura ambiente sob hélio durante até três semanas.

Eluente 2 de HPAEC: hidróxido de sódio a 400 mM (NaOH).

Usando um cilindro graduado de 1 L, medir 960 mL de água com grau para HPLC e transferir para uma garrafa de eluente de 1 L limpa. Usando uma pipeta sorológica de plástico, adicionar 40,0 mL de NaOH a 10 N diretamente na garrafa de eluente e misturar o eluente através de turbilhonamento. Tampar a garrafa frouxamente e purgar com hélio durante 20 minutos. Apertar a tampa e pressurizar a garrafa com hélio. Armazenar a solução em temperatura ambiente sob hélio durante até três semanas.

Eluente 3 de HPAEC: água com grau para HPLC. Encher uma garrafa de eluente de 1 L com aproximadamente 1 L de água com grau para HPLC. Colocar a garrafa de eluente sobre o sistema, tampar frouxamente e purgar durante aproximadamente 20 minutos. Apertar a tampa e pressurizar a garrafa com hélio. Armazenar a solução em temperatura ambiente sob hélio durante até três semanas.

Tampão de fosfato de sódio a 50 mM, azida de sódio a 0,02%, pH = 7,5. Azida de sódio (NaN_3) deverá ser manipulada com cuidado para evitar inalação (tóxica) e contato com a pele (irritante). Consultar a folha de MSDS para requisitos adicionais. Após pesagem de NaN_3 , a área da balança deverá ser totalmente limpa.

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \pm \text{H}_2\text{O}$	6,9 g
Na N_3	0,2 g
H_2O	volume final de 1,0 litro

15 Pesar 6,9 g \pm 0,1 g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \pm \text{H}_2\text{O}$ e 0,2 g NaN_3 e dissolver em 800 mL de H_2O com grau para HPLC em uma garrafa de reagente usando mistura contínua com uma barra de agitação. Usando um medidor de pH, ajustar o pH da solução para 7,5 usando NaOH a 10 M. Levar o volume final para 1,0 litro usando um cilindro graduado de 1 L. Armazenar a solução em temperatura ambiente durante até seis meses.

Solução de trabalho de enzima PNGase F em tampão de fosfato de sódio a 50 mM, azida de sódio a 0,02%, pH = 7,5.

tampão de fosfato de sódio a 50 mM
azida de sódio a 0,02%, pH = 7,5, 1,8 mL

25 PNGase F do kit, Catálogo No. P0704L, 0,2 mL

Pipetear 1,8 mL de tampão de fosfato de sódio a 50 mM, azida de sódio a 0,02%, pH de 7,5 em um frasco criogênico de 1,8 mL. Adicionar 0,2 mL de PNGase F do kit e misturar totalmente. Armazenar a solução a -20°C ou pelo menos durante até seis meses. A solução pode ser transformada em alíquotas antes de congelamento.

Padrão de Adequabilidade de Sistema Externo. Solução de estoque de estaquiose (1,25 mg/mL): Pesar 0,125 g de Estaquiose sobre um

papel de pesagem. Usar uma balança analítica e transferir para um frasco volumétrico de 100 mL. Encher até a marca com água com grau para HPLC e misturar totalmente. Transformar em alíquotas em porções de 2 mL em criofrascos Nalgene. Armazenar a solução a -20°C ou pelo menos durante
5 até seis meses.

Padrão de Adequabilidade de Sistema de Estaquiase (12,5 $\mu\text{g/mL}$): Pipetear 1 mL do estoque a 1,25 mg/mL em um frasco volumétrico de 100 mL. Encher até a marca com água com grau para HPLC e misturar totalmente. Transformar em alíquotas porções de 200 μL em tubos para mi-
10 crocentrífuga de 0,65 mL. Colocar os tubos em uma caixa de armazenamento apropriadamente rotulada. Armazenar a Solução de Adequabilidade de Sistema a -20°C ou pelo menos durante até seis meses.

Preparo de padrão e amostra

Preparo de Material de Referência. A um frasco contendo 1 mg
15 de RapiGest SF liofilizado, adicionar 625 μL de tampão de fosfato de Na a 50 mM contendo azida de Na a 0,02%, pH de 7,5,

NOTA: Um único reservatório de RapiGest SF contendo tampão deverá ser usado para todas as amostras dentro do conjunto de amostra. Vários frascos de RapiGest SF podem ser reconstituídos e combinados para proporcionar
20 um volume adequado.

A um tubo de Eppendorf de 0,65 mL, adicionar 120 μL do tampão contendo RapiGest SF. Adicionar 40 μL de Material de Referência (\square 50 mg/mL). A concentração final de RapiGest SF deverá ser de 0,12 % peso/v. Adicionar 40 μL da solução de trabalho de PNGase F, misturar totalmente,
25 centrifugar a amostra e colocar a $38 \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 22 ± 2 horas (banho de água ou o compartimento do amostrador automático Alliance). Pipetear a amostra em um filtro para centrífuga Microcon YM-100 e centrifugar a 13.000 g durante 30 minutos. Colocar 200 μL de água para HPLC no filtro e enxaguar o filtrado através de centrifugação durante mais 30 minutos a 13.000 g.
30 Submeter o filtrado combinado a turbilhonamento durante 15 segundos e centrifugar a amostra durante 10 segundos. Usando uma pipeta, transferir a solução resultante (\sim 380 μL) para um frasco para amostrador automático de

HPLC de recuperação total.

Preparo de amostra: A um tubo de Eppendorf de 0,65 mL, adicionar 120 μ L do tampão contendo RapiGest SF. Adicionar 40 μ L de amostra de proteína (esse volume deverá ser igual a entre 1 e 2 mg de CTLA4-Ig). A concentração final de RapiGest SF deverá ser de 0,12 % peso/v. Adicionar 40 μ L da solução de trabalho de PNGase F misturar totalmente através de turbilhamento durante 10 segundos. Centrifugar a amostra e colocar a 38 \pm 2°C durante 22 \pm 2 horas (banho de água ou o compartimento do amostrador automático Alliance). Pipetear a amostra em um filtro para centrifuga Microcon YM-100 e centrifugar a 13.000 g durante 30 minutos. Colocar 200 μ L de água para HPLC no filtro e enxaguar o filtrado através de centrifugação durante mais 30 minutos a 13.000 g. Submeter o filtrado combinado a turbilhamento durante 15 segundos e centrifugar a amostra durante 10 segundos. Transferir a solução resultante (~ 380 μ L) para um frasco para amostrador automático de HPLC de recuperação total.

Estabilização da célula do detector eletroquímico: Injetar 30 μ L do Padrão de Adequabilidade de Sistema Externo de Estaquiouse (12,5 μ g/mL). Assegurar que a altura de pico para estaquiouse é \approx 800 nA. Assegurar que não há interferência elétrica excessiva da célula e que a linha de base é uniforme. Se a sensibilidade à estaquiouse ou a linha de base é inaceitável, verificar a composição de tampão, limpar o eletrodo ou substituir o eletrodo. Se interferência excessiva está presente, verificar a célula para assegurar remoção de todas as bolhas de ar. Re-estabilizar a célula e re-injetar padrão de estaquiouse. Se os problemas persistem, tomar outras atitudes ou contatar seu supervisor.

Placas teóricas (N): Determinar o número de placas teóricas (N) baseado no pico de estaquiouse usando a fórmula abaixo. Isso é feito através do sistema de análise de dados Empower ou pode também ser feito manualmente.

$$N = 16 (t / W)^2$$

onde:

t: tempo de retenção medido a partir do momento de injeção

até o momento de eluição de pico na altura máxima

W: largura de pico através de extrapolação dos lados para a linha de base.

N: deve ser ≥ 6000 . Se a contagem de placa é menos de 6000, ajustar o gradiente de operação ou substituir a coluna.

Fator de configuração (T): Determinar o fator de configuração de coluna (T) baseado no pico de estaquiouse usando a fórmula abaixo. Isso é feito através do sistema de análise de dados Empower ou pode também ser feito manualmente.

$$T = (W_{0,05} / 2f)$$

onde:

$W_{0,05}$: largura de pico a 5% de altura (0,05h).

f: a medida (largura) da borda frontal de pico a $W_{0,05}$ para o ápice do pico.

T deve ser $\geq 1,2$. Se o fator de configuração é maior do que 1,2, verificar a composição de tampão, substituir a coluna ou limpar a coluna e re-injetar Padrão de Adequabilidade de Sistema.

Verificação do Tempo de Retenção do Padrão de Adequabilidade de Sistema de Estaquiouse: O tempo de retenção é dependente do sistema. O Padrão de Adequabilidade de Sistema de Estaquiouse deverá exibir um tempo de retenção de $18,5 \pm 2,0$ minutos.

Material de Referência de CTLA4-Ig. Observar o perfil de carboidrato do Material de Referência entre as primeiras faixas injetadas antes de injeção de amostras. O perfil de carboidrato deverá ser similar àquele mostrado na Figura 68. Tempos de retenção absolutos são dependentes do sistema. Assegurar que a diferença nos tempos de retenção entre os primeiros picos no Domínio I (Pico 1A) e o principal pico no Domínio III (Pico 3) está entre 22 minutos e 28 minutos. Se delineamento dos picos não se assemelha àquele obtido na Figura 68, tomar as atitudes apropriadas (por exemplo, verificar a função do instrumento, limpar a coluna, verificar/substituir tampões, substituir a coluna) e re-avaliar. O procedimento a seguir pode ser usado para limpar a coluna: desligar a célula e limpar a coluna com Eluente

1 a 80%, Eluente 2 a 20% durante 5 minutos, seguido por Eluente 1 a 50%, Eluente 2 a 50% durante 10 minutos. Re-equilibrar a coluna e célula (com a célula ligada) em condições iniciais e re-avaliar.

SEQÜÊNCIA DE INJEÇÃO:

- 5 Ajustar a seqüência de injeção dos oligossacarídeos isolados como segue :

 Padrão de estaquiase (30 µL)

 Material de Referência (60 µL)

 Amostra(s) (60 µL)

- 10 Material de Referência (60 µL)

 É recomendado que □ cinco amostras sejam operadas entre injeções de Material de Referência entre as faixas.

ANÁLISE DE DADOS:

- Processamento de cromatogramas.** Processar os cromatogramas para o Material de Referência e amostras no Empower. Ajustar parâmetros de integração de modo que o delineamento de pico e a linha de base sejam similares àqueles mostrados na Figura 68. Pode ser preciso colocar as linhas de integração manualmente. Realizar cálculos para áreas de Domínio relativas e com relação áreas de pico (veja tabelas incluídas na
- 15
- 20 Breve Descrição da FIG. 68 e ao final desse Exemplo). Determinar os valores médios para esses parâmetros para o Material de Referência e para cada amostra se injeções repetidas foram feitas.

- Para o Material de Referência, determinar o desvio relativo para os Domínios I, II, III, Picos 1A e 1B para cada réplica com relação à média
- 25 de todas as réplicas.

 Comparar os Perfis de Amostra com perfis de Material de Referência.

- Comparação Visual.** Determinar se as amostras e Material de Referência têm o mesmo número de Domínios e picos primários. Picos primários são aqueles picos rotulados na descrição da Figura 68 (Picos 1A, 1B,
- 30 1C, 1D, 2, 3 e 4).

Comparação de Quantificação Relativa. Comparar as áreas

relativas de amostras (Domínios I, II e III e Picos 1A e 1B; se injeções repetidas de amostras foram feitas, usar seus valores médios) com as áreas relativas médias das injeções de Material de Referência entre as faixas. Determinar a diferença relativa dessas áreas a partir dos valores médios de Material de Referência.

Cálculos

Área de Domínio % (Área de Domínio relativa): Calcular a área de Domínio % para os Domínios dos perfis para o Material de Referência e amostras. Refira-se à Figura 68 para padrão de Áreas de Domínio. Seguindo o exemplo na Figura 68, calcular as proporções percentuais de domínio usando a informação e fórmula a seguir (tempos de retenção são dependentes do sistema e refletem os resultados na Figura 68:

- Domínio I: Soma das áreas de pico em tempos de retenção aproximados de 18-24 minutos (Picos 1A-1E)
- Domínio II: Soma dos picos de 26-38 minutos
- Domínio III: Soma dos picos de 39-50 minutos
- Domínio IV: Soma dos picos de 51-64 minutos
- Domínio V Soma dos picos de 65-75 minutos

NOTA: Janelas de tempo de retenção para os domínios se desviarão de acordo com variações no desempenho cromatográfico diário. Ajustar os tempos conseqüentemente.

$$\text{Área de domínio \%} = \frac{\text{Área de domínio individual}}{\text{Soma de todas as áreas de domínio}} \times 100\%$$

Para o Domínios I-III, calcular também os valores médios nas injeções de Material de Referência entre as faixas, bem como nas amostras, se injeções repetidas foram feitas.

Área de pico % (Área de pico relativa). Calcular a Área de pico % para os Picos 1A, 1B, 1C e 3 dos perfis para o Material de Referência e amostras. Refira-se à Figura 68 para padrão de áreas de pico; tempos de retenção são dependentes do sistema. Calcular as proporções percentuais de pico usando a informação e fórmula a seguir:

$$\text{Área de pico \% individual} = \frac{\text{Área de pico individual}}{\text{Soma de todas as áreas de domínio}} \times 100\%$$

Para cada um dos Picos 1A e 1B, calcular também os valores médios nas injeções de Material de Referência entre as faixas, bem como nas amostras, se injeções repetidas foram feitas.

Cálculo da diferença percentual dos valores médios de Material de Referência. Usar a seguinte fórmula para calcular as diferenças percentuais nas áreas relativas médias dos Domínios I-III, Picos 1A e 1B de amostras comparado com Material de Referência:

$$\text{Dif \%} = |RM - S| / RM \times 100$$

onde:

10 RM = valor de área relativa média de interesse para Material de Referência

S = valor de área relativa média de interesse para a amostra

|| = valor absoluto

Resultados: Resultados que têm de ser reportados são a diferença percentual calculada do Material de Referência para o Domínio I, o Domínio II, o Domínio II, pico 1A e pico 1B. Incluir um cromatograma representativo integrado para o Material de Referência e a amostra. Incluir as áreas percentuais relativas dos Domínios I-III e Picos 1A e 1B para um décimo de um por cento para amostra e Material de Referência (média de injeções entre faixas). Adicionalmente, para cada uma das injeções de Material de Referência entre as faixas, as áreas de Domínio % para os Domínios I, II e III e áreas de pico % para os Picos 1A e 1B deverão estar dentro de 15% de seus valores médios.

25 Figuras 57-62, 68, 76 e 82-84 mostram dados resultantes dos perfis de oligossacarídeo N-ligado conforme descrito aqui. A Figura 68 representa um perfil de oligossacarídeo N Ligado típico (Domínios I, II, III, IV e V e Picos 1A e 1B dentro de 5% das médias de lote). Picos 1A, 1B e 1C representam as estruturas de oligossacarídeo N Ligado de G0, G1 e G2.

Domínio / Pico	Tempo de Retenção (minutos)	Área percentual	Altura de pico relativa no pico mais alto	Área percentual de do Domínio precursor	Domínio Composição
Domínio I	19,413	31,3	.	.	5 Picos
Domínio II	29,076	33,2	.	.	5 Picos
Domínio III	42,819	24	.	.	5 Picos
Domínio IV	55,899	9,4	.	.	6 Picos
Domínio V	67,546	2,2	.	.	6 Picos
Pico 1A	19,413	7,3	89,8	23,3	
Pico 1B	20,29	10,7	100	34,2	
Pico 1C	21,032	8,8	94,3	28,1	
Pico 1D	21,925	2,8	27,5	8,95	
Pico 1E	22,685	1,7	11,8	5,43	
Pico 2	30,763	18,3	88,9	55,1	
Pico 3	43,823	14,5	57,8	60,4	
Pico 4	57,368	4,4	20,1	46,8	

A Figura 68 mostra um perfil de carboidrato N ligado típico para composição de CTLA4-Ig.

A tabela diretamente acima mostra dados tabulados para o perfil de oligossacarídeo N Ligado de CTLA4-Ig.

5 A tabela diretamente abaixo mostra faixas observadas de CTLA4-Ig.

Domínio / Pico	Área mínima %	Área máxima %
Domínio I	24,5	35,2
Domínio II	26,3	34,1
Domínio III	21,9	31,5
Domínio IV +V	7,9	18,6
Pico 1A	4,5	11,2
Pico 1B	8,7	11,8

EXEMPLO 45: UM BIOENSAIO BASEADO EM CÉLULA IN-VITRO PARA CTLA4-Ig

10 Células T requerem dois sinais ou ativação e subsequente proliferação. O primeiro sinal é proporcionado através da interação de um peptídeo antigênico com o complexo TCR-CD3. O segundo sinal co-estimulatório ocorre com a interação entre CD28 sobre a célula T e a proteína B7 sobre células apresentando antígeno. Quando de recebimento desses dois sinais,

15 ativação e proliferação celular, CTLA4-Ig, um composto imunossupressor solúvel, também se liga à proteína B7 sobre células apresentado antígeno,

assim, bloqueando a interação funcional com CD28 e prevenção do sinal co-estimulatório que é necessário para produção de IL-2.

Nesse método, Células T Jurkat transfectadas com o gene de luciferase, sob o controle do promotor de IL-2, são co-estimuladas com Células B de Daudi na presença de anti-CD3. A co-estimulação ativa o promotor de IL-2 o qual, por sua vez, produz proteína de luciferase. O sinal luminescente resultante é medido usando um Sistema de Ensaio de Luciferase. Nesse sistema, CTLA4-Ig produz uma diminuição dose-dependente na atividade de luciferase.

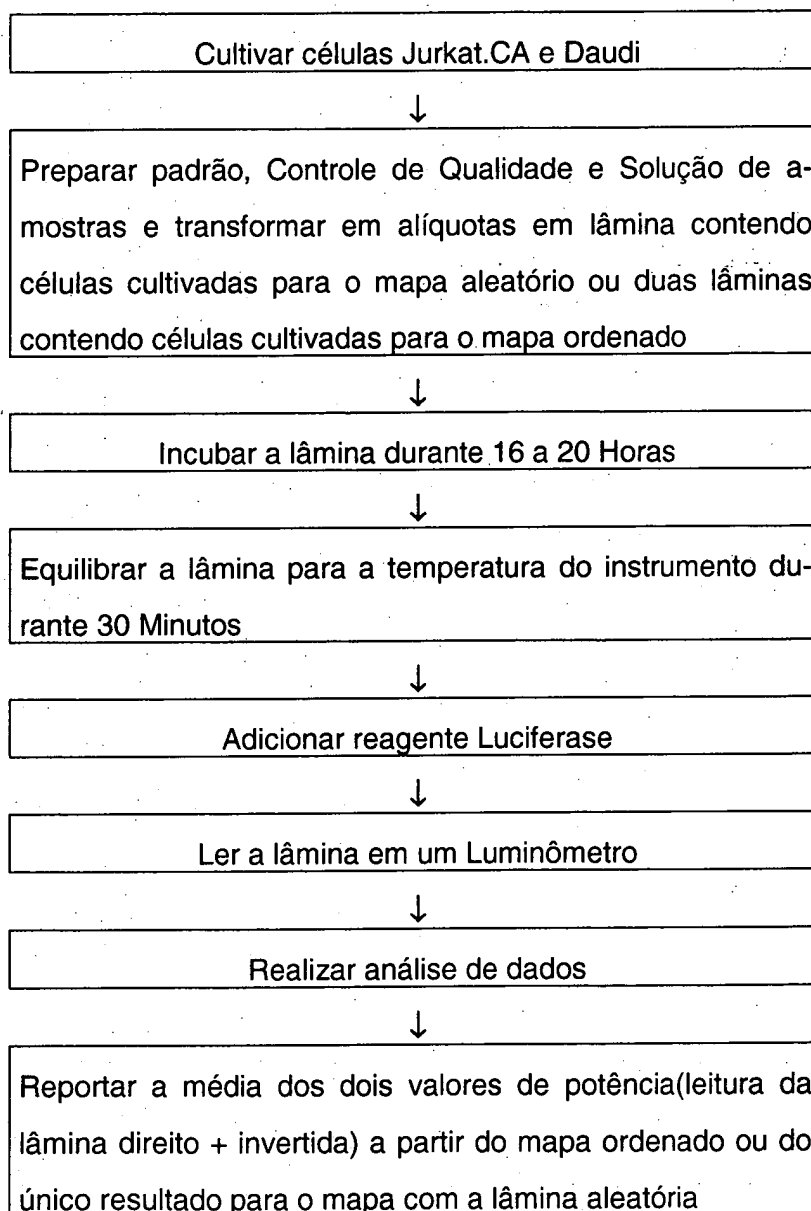
Esse método examina o efeito de CTLA4-Ig sobre o sinal co-estimulatório necessário para produção de IL-2. A presença de CTLA4-Ig solúvel impede sinalização entre a célula T e células apresentando antígeno. Sem esse sinal, IL-2 não é produzida, assim, impedindo a expansão clonal de células T. Um vetor com o gene de luciferase foi criado usando o promotor de IL-2. As células T Jurkat foram, então, transfectadas com esse vetor repórter. Um clone positivo, Jurkat.CA, foi selecionado e usado no método.

Esse bioensaio envolve estimulação de células T transfectadas (Jurkat.CA) com anti-CD3 e células B (Daudi). Co-estimulação proporcionada pelas células B é inibida através da adição de CTLA4-Ig. Jurkat.CA e células Daudi são cultivadas nas cavidades de uma lâmina com fundo plano, branca, opaca com 96 cavidades e estimuladas com anti-CD3 na presença de diferentes concentrações de CTLA4-Ig. Após uma incubação de 16 a 20 horas a 37°C, as cavidades são ensaiadas com relação à atividade de luciferase. Inibição de co-estimulação através de CTLA4-Ig é observada como uma diminuição dose-dependente na atividade de luciferase.

REAGENTES: Meio de cultura de células Daudi (soro fetal bovino a 10%, MEM piruvato de sódio a 1% em RPMI 1640); Meio de cultura de célula Jurkat.CA (soro de cabra a 10%, MEM piruvato de sódio a 1% , 400 µg/mL de geneticina em RPMI 1640); Meio de bioensaio (0,2 µg/mL de anticorpo anti-CD3 e solução de penicilina-estreptomicina a 1% em Meio de cultura de células Daudi); Solução de luciferase Bright-Glo do sistema de ensaio (Promega, Catálogo # E2620).

INSTRUMENTAÇÃO: Nikon, microscópio invertido Diaphot 200; Luminômetro Packard TopCount NXT; Manipulador de líquido Tecan Genesis; Contador de células Coulter Vi-Cell; Zymark RapidPlate-96.

Fluxograma de procedimento



5

Preparo de Soluções de trabalho: 3 mL de soluções de C-TLA4-Ig (5000 ng/mL) em meio de bioensaio.

Oito curvas de ponto foram preparadas para o padrão, controle de qualidade e amostras nas concentrações de 100, 4, 2, 1, 0,5, 0,2, 0,1 e 0,002 µg/mL de CTLA4-Ig conforme mostrado na Tabela 58 abaixo para as

concentrações finais no ensaio, após diluição duas vezes na lâmina, de 50, 2, 1, 0,5, 0,25, 0,1, 0,05 e 0,001 $\mu\text{g/mL}$.

Tabela 58. Diluições usadas para gerar Padrões de curva.

Ponto de curva	Curva Padrão	Controle de Qualidade	Amostra 1	Amostra 2
1	100 $\mu\text{g/mL}$	100 $\mu\text{g/mL}$	100 $\mu\text{g/mL}$	100 $\mu\text{g/mL}$
2	4	4	4	4
3	2	2	2	2
4	1	1	1	1
5	0,5	0,5	0,5	0,5
6	0,2	0,2	0,2	0,2
7	0,1	0,1	0,1	0,1
8	0,002	0,002	0,002	0,002

5 200.000 células foram adicionadas por cavidade de uma lâmina com 96 cavidades e foram incubadas a 37°C, 5% de CO₂ e umidade de 85%. 12 x 10⁶ Células Jurkat.CA e 12 x 10⁶ células Daudi foram combinadas em um tubo para centrifuga estéril. As células foram centrifugadas a ~125 x g durante 10 minutos em temperatura ambiente e foram totalmente re-

10 suspensas em 9 mL de Meio de cultura de células Daudi repetidamente pipeteando gentilmente com uma pipeta sorológica até que mais nenhum grumo de célula fosse visível, a fim de proporcionar uma concentração de 2,7 x10⁶ células/mL. 75 μL de cada solução da Tabela 58 foram adicionados às cavidades apropriadas de uma lâmina contendo células. A(s) lâmina(s)

15 foram, então, vedada(s) com TopSeal-A e incubada(s) a 37°C, 5% de CO₂ e umidade de 85% durante 16 a 20 horas. Após as lâminas e solução de luciferase Bright-Glo terem sido equilibradas para a temperatura do instrumento, 150 μL de solução de luciferase Bright-Glo foram adicionados a cada cavidade simultaneamente e foram misturados. A lâmina é, então, colocada no

20 TopCount NXT imediatamente após mistura para equilíbrio no escuro durante 10 minutos. O sinal luminescente foi, então, medido em um TopCount NXT usando uma integração de 1 segundo por cavidade ou conforme apropriado ao tipo particular de luminômetro usado.

25 O resultado do TopCount NXT foi registrado, lido em um programa de análise de padrão e os dados foram transformados tomando seu

logaritmo (base 10). Os dados transformados de cada artigo foram adaptados a um modelo logístico com quatro parâmetros, conforme mostrado na equação abaixo:

$$\text{Log}_{10}(y_{jk}) = D + \frac{(A-D)}{1 + \left(\frac{x_j}{C}\right)^B}$$

Equação 1:

5 onde:

A é o platô superior da curva, D é o platô inferior da curva, B é o fator de declínio e C é a concentração que produz um efeito igual à média de A e D .

10 Um F-teste R^2 estatístico e com falta-de-adaptação pode ser calculado para cada artigo. Uma proporção do mínimo, máximo e declínio dos artigos de teste com relação ao material padrão pode também ser calculada. Além disso, intervalos de confiança para as proporções podem também ser computados.

15 A potência relativa de cada artigo foi determinada através de adaptação de uma única equação aos dados do artigo de interesse combinados com os dados do artigo de referência.

$$\text{Log}_{10}(y_{ijk}) = D + \frac{(A-D)}{1 + \left(\frac{x_{ij}}{C_A * \left(\frac{C_R}{C_A}\right)^I} \right)^B}$$

Equação 2:

onde:

20 os parâmetros A , B e D são comuns à referência e artigo de teste e C_R é o parâmetro referência, C_A é o parâmetro artigo de teste e a proporção C_R/C_A é a potência relativa. O superscrito I é uma variável indicadora. Ele é ajustado em igual a 1 se os dados se originam do artigo de interesse e 0 se os dados se originam do Material de CTLA4-Ig.

25 A potência relativa de cada artigo de teste foi traduzida para uma escala percentual e a potência relativa foi fornecida como resultado do programa.

A média dos oito resultados de potência relativa de cada um dos

oito conjuntos de dados analisados pode ser calculada e o desvio padrão pode ser calculado usando as Equações 3 e 4, respectivamente. O resultado médio é reportado como "potência relativa percentual" arredondado para o número inteiro mais próximo.

5 Equação 3:

$$\text{Média} = \frac{\text{Valor 1} + \text{valor 2} + \text{valor 3} + \text{valor 4} + \text{valor 5} + \text{valor 6} + \text{valor 7} + \text{valor 8}}{8}$$

$$\text{Equação 4: Desvio padrão} = \sqrt{\frac{8 \sum x^2 - (\sum x)^2}{8(8-1)}}$$

onde:

8 é o número de medições de potência

x = medições individuais

10 **Ajuste de Valores de potência relativa Obtidos com concentrações aproximadas:** Em virtude do "lag" de tempo entre recebimento da amostra e obtenção de uma concentração precisa de proteína, a amostra pode ser testada no ensaio em uma concentração aproximada e os resultados ajustados quando a concentração precisa é determinada. Esse ajuste é
15 realizado usando a Equação 5 abaixo, onde a potência relativa determinada no ensaio é multiplicada pela proporção da concentração de CTLA4-Ig usada para ajustar o ensaio para a concentração determinada de CTLA4-Ig na amostra.

Equação 5:

$$\text{Potência relativa reportável} = \frac{\text{Potência relativa observada} * \text{concentração usada}}{\text{Concentração determinada}}$$

20 Exemplo:

Amostra foi testada em uma concentração de proteína de 25 mg/mL no ensaio.

Potência relativa determinada foi de 105%.

25 Concentração de CTLA4-Ig determinada foi estabelecida como sendo de 25,5 mg/mL

Potência relativa reportável = $(105 * 25) / 25,5 = 103\%$.

Os valores de potência relativa do artigo de teste devem estar entre 25 e 175% do padrão de referência, o qual é a faixa do ensaio. Se os valores de potência relativa estão fora dessa faixa, então, a amostra deve ser diluída ou concentrada de forma a cair dentro dessa faixa e a amostra re-analisada.

EXEMPLO 46: STRUCTURAL CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DE O-LIGOSSACARÍDEOS O-LIGADOS

A glicosilação O Ligada de CTLA4-Ig foi caracterizada por mapeamento peptídico seguido por ESI-MS/MS e através de MALDI-TOF.

Análise de T8 e T9 através de Mapeamento peptídico com ESI-MS/MS


Uma versão manual modificada do método de digestão trípica com ESI-MS/MS *in line* usando um espectrômetro de massa Finnigan Ion Trap foi realizada de forma a caracterizar glicopeptídeos O-ligados T8 e T9 (refira-se à Tabela 59 para identidade de peptídeo).

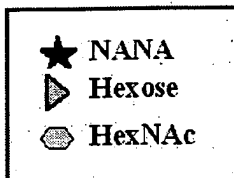
A FIG. 63 mostra o mapeamento trípico de peptídeo de CTLA4-Ig, indicando que T8 elui ao final da frente de solvente e T9 elui em T27.

O espectro de massa total do peptídeo T8 é mostrado na FIG. 64, onde o pico a 436,2 corresponde ao MW esperado do peptídeo T8 unicamente carregado não modificado e o pico a 1092,2 corresponde ao MW de T8 unicamente carregado glicosilado. A massa correspondendo ao pico principal e sua estrutura (T8-HexNAc-Hex-NeuAc) são mostrados na Tabela 61.

Tabela 61

Tabela 3.2.S.3.1.4.1.T03: Estruturas de oligossacarídeo do peptídeo T8




Glycopeptide	massa esperada em daltos	massa observada em daltos
Unmodified T8	435	436.2 [M+H] ⁺
T8 	1092	1092.2 [M+H] ⁺

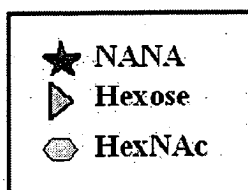


- O espectro de massa total do peptídeo T9 e mostrado na FIG. 5 65, onde ons dupla e triplamente carregados dos glicopeptdeos aparecem, correspondendo a uma faixa de glicofomas heterogneas. O principal pico a 1115,9 corresponde ao MW de T9 triplamente carregado glicosilado com HexNAc-Hex-NeuAc. Os picos a 1213,0 e 1334,8 correspondem aos pesos moleculares do T9 triplamente carregado, glicosilados com HexNAc(NeuAc)-Hex-NeuAc e (HexNAc-Hex-NeuAc)₂, respectivamente (Tabela 62). A glico- 10 forma dominante e T9-HexNAc-Hex-NeuAc mono-sialilado, enquanto que as outras glicofomas esto presentes em uma abundncia muito menor.

Tabela 62

Tabela 3.2.S.3.1.4.1.T04: Estruturas de oligossacarídeo do peptídeo T9

Glycopeptide	massa esperada em daltos	massa observada em daltos
Unmodified T9	2689	1345.1 [M+2H] ²⁺
T9 	3345	1115.9 [M+3H] ³⁺
T9 	3637	1213.0 [M+3H] ³⁺
T9 	4002	1334.8 [M+3H] ³⁺



De forma a determinar os sıtios de O Ligacao, mapeamento peptıdico de CTLA4-Ig foi realizados conforme previamente descrito no Exemplo 4 e a fracao T8-9 (em virtude de digestao incompleta atraves de tripsina) foi coletada e submetida a sequenciamento de Edman. Os dados de sequenciamento mostraram que, no 1o ciclo, um pico extra aparece alem de Ser. O tempo de retencao do pico extra nao esta em concordancia com aquele de qualquer um dos padroes de aminoacidos, sugerindo que Ser na posicao 1 em T8 (Ser 129) e modificada e contem glicanas O Ligadas. O aparecimento de Ser e do pico extra indica que Ser e parcialmente modificada. Isso esta em concordancia com os dados de MS para T8. Os experimentos de sequenciamento tambem revelam o sıtio de O Ligacao em T9 como Ser 139. Em conclusao, dois sıtios de glicosilacao O Ligada foram identificados nos resıduos de aminoacido serina 129 e serina 139. a glicana predominante presa aos dois sıtios e HexNAc-Hex-NeuAc.

Analise por MALDI-TOF de peptıdeo T9

Analise por MALDI-TOF de peptıdeo T9 demonstra a presenca de varias glicoformas (FIG. 66). O pico com um MW de 2690,8 e consistente

com o fragmento T9. O pico com um MW de 2893,7 se refere a T9 mais HexNAc. O pico com um MW de 3055,7 se refere a T9 mais HexNAc-Hex. O pico com um MW de 3345,8 indica T9 mais HexNAc-Hex-NANA. Galactose e N-Acetil Galactosamina foram detectadas em T9 baseado em análise de monossacarídeo, portanto, é postulado que as principais espécies O Ligadas em T9 são GalNAc-Gal-NANA. Análise por MALDI-TOF de peptídeo T8 não foi realizada em virtude dos baixos rendimentos de recuperação.

EXEMPLO 47: VARIANTES COM OXIDAÇÃO E DEAMIDAÇÃO EM C-TLA4-Ig

10 Oxidação e deamidação variantes de produto comuns de peptídeos e proteínas. Elas podem ocorrer durante fermentação, coleta /clarificação de célula, purificação, armazenamento de Substância de Fármaco / produto de fármaco e durante análise da amostra.

15 Oxidação de proteína é, tipicamente, caracterizada pela adição química de um ou mais átomos de oxigênio à proteína. Vários aminoácidos, Met, Cys, Tyr, His e Trp, são mais suscetíveis à oxidação comparado com outros aminoácidos naturais. O aminoácido com o maior grau de suscetibilidade à oxidação é metionina. A maior parte da oxidação de proteína identificada até o momento tem sido a oxidação de metionina à variante de sulfóxido. Oxidação em proteínas pode ser causada por vários mecanismos diferentes. O mecanismo comum de oxidação ocorre a partir de exposição à luz
20 ou catálise com metal de transição.

Deamidação é a perda de NH_3 de uma proteína, formando um intermediário de succinimida que pode sofrer hidrólise. O intermediário de succinimida resulta em uma diminuição de massa de 17 u do peptídeo precursor. A subsequente hidrólise resulta em um aumento de massa de 18 u. Isolamento do intermediário de succinimida é difícil em virtude da instabilidade sob condições aquosas. Como tal, deamidação é tipicamente detectável como aumento de massa de 1 u. Deamidação de uma asparagina resulta em
25 ácido aspártico ou isoaspártico. Os parâmetros que afetam a taxa de deamidação incluem pH, temperatura, constante dielétrica do solvente, resistência iônica, seqüência primária, conformação de polipeptídeo local e estrutura
30

terciária. Os resíduos de aminoácido adjacentes à Asn na cadeia peptídica afetam as taxas de deamidação. Gly e Ser após uma Asn em seqüências de proteína resultam em uma maior suscetibilidade à deamidação.

MATERIAIS e MÉTODOS

5 **Amostra:** padrão de CTLA4-Ig

Mapeamento peptídico com Tripsina/Asp-N/Tripsina e Quimiotripsina de CTLA4-Ig: Proteínas foram desnaturadas e reduzidas em tampão de Tris a 50 mM (pH de 8,0) contendo guanidina a 6 M e ditioneitol a 5 mM (DTT). Após 20 minutos de incubação a 50 °C, iodoacetamida (IAM) foi adicionada para uma concentração final de 10 mM e a amostra foi incubada no escuro a 50 °C durante mais 20 minutos. A mistura alquilada e reduzida foi carregada sobre a coluna NAP-5 e, então, eluída com Tris a 50 mM, CaCl₂ a 10 mM, pH de 8,0. Tripsina com grau para seqüenciamento (2% peso/peso, enzima : proteína) foi adicionada e incubada durante 4 horas a 37 °C. No caso de digestão de Asp-N, Asp-N com grau para seqüenciamento (4% peso/peso, enzima : proteína) foi adicionada e a amostra foi incubada durante 16 horas a 37 °C.

No caso de digestão com tripsina e quimiotripsina, a proteína estava em tampão de fosfato de sódio a 50 mM, pH de 7,5. Tripsina com grau para seqüenciamento (4%, peso/peso, enzima : proteína) foi adicionada e a amostra foi incubada durante 4 horas a 37 °C. Quimiotripsina foi adicionada (4%, peso/peso, enzima : proteína) e a amostra incubada durante 16 horas a 37 °C. As amostras foram armazenadas a -20 °C após a digestão.

Misturas peptídicas foram separadas através de eluição em gradiente a partir de uma coluna Atlantis C18 (2,1 x 250 mm) sobre uma Workstation de HPLC Waters Alliance (Waters, Milford, MA) a 0,120 mL/min. A coluna foi diretamente conectada ao Q-ToF micro (Waters, Milford, MA) equipado com uma fonte de ionização por eletropulverização e os espectros de massa foram coletados. No caso de mapeamento peptídico de Asp-N, misturas peptídicas foram separadas sobre uma coluna Varian C18 (4,6 x 250 mm) a 0,7 mL/min usando a mesma Workstation de HPLC. As colunas foram equilibradas com solvente A (TFA a 0,02% em água) e os peptídeos foram

eluídos aumentando a concentração de solvente B (acetonitrilo a 95%/TFA a 0,02% em água). Uma válvula de derivação pós-coluna foi usada para direcionar 15% do fluxo para o Q-Tof micro. O instrumento foi operado no modo positivo (m/z 100-2000). A tensão do capilar foi ajustada a 3000 V.

5 **Análise de peptídeos por MS/MS:** Frações de cromatografia em fase reversa foram coletadas e infundida no Q-Tof micro em uma taxa de fluxo de 20 μL / minuto. Os espectros de MS/MS foram adquiridos usando energia de colisão otimizada para o peptídeo individual (oscilando de 25 a 42 eV).

10 **RESULTADOS**

Oxidação de CTLA4-Ig: CTLA4-Ig tem sete metioninas por cadeia simples: Met¹, Met⁵³, Met⁵⁴, Met⁸⁵, Met⁹⁷, Met¹⁶² e Met³³⁸. Mapeamento peptídico foi usado para identificar as variantes de produto oxidativas em cada um desses sítios. Oxidações de Met¹, Met⁸⁵ e Met¹⁶² são identificadas usando a técnica de mapeamento triptico de peptídeo (FIG. 67A-B). Nenhuma oxidação de Met³³⁸ é detectada. Os fragmentos tripticos contendo Met⁵³, Met⁵⁴ ou Met⁹⁷ são grandes peptídeos contendo carboidratos N-ligados heterogêneos. Esses peptídeos não são passíveis de identificação e quantificação relativa de oxidação. Portanto, proteólise usando múltiplas enzimas, as
15 quais produzem peptídeos não-glicosilados mais curtos, foi realizada. O peptídeo de Asp-N EVCAATYMMGN (46-56) e peptídeo triptico / quimiotriptico MYPPPY (97-102) são usados para determinar a oxidação de Met⁵³, Met⁵⁴ e Met⁹⁷. A quantificação relativa de oxidação de metionina é calculada de acordo com a área de pico percentual dos cromatogramas de íons extraídos.
20 As quantidades relativas de peptídeos oxidados são listadas na Tabela 63. Oxidação sobre seis das sete metioninas de CTLA4-Ig com cadeia simples é detectada. Os picos A e B são as formas unicamente oxidadas do peptídeo EVCAATYMMGN (46-56) (pico 3). Peptídeos dos picos 2A e 2B são isobáricos e têm um aumento de massa de 16 u quando comparado com a massa
25 do peptídeo não modificado. Cada pico representa a oxidação em diferentes
30 Met. O grau da oxidação é diferente nos dois sítios.

Tabela 63. A oxidação de Met em CTLA4-Ig

Met	Peptídeo	Massa esperada não-oxidada	Massa observ. não-oxidada	Massa esperada oxidada	Massa observ. oxidada	Oxidação Percentuaç
1	AT1: AMHVAQPAVVLASSR	768,9 (+2)	768,9	776,91 (+2)	776,9	0,9
1	T1: MHVAQPAVVLASSR	733,4 (+2)	733,4	741,4 (+2)	741,4	2,4
53	D5: EVCAATYMMGN	1246,5	1246,6	1262,5	1262,5	3,4
54	D5: EVCAATYMMGN	1246,5	1246,6	1262,5	1262,6	4,3
85	T6: AMDTGLYICK	1171,6	1171,5	1187,6	1187,5	1,0
97	MYPPPY	767,3	767,9	783,3	783,9	1,5
162	T10: DTLMISR	835,4	835,4	851,4	851,4	1,7
338	T30: WQQGDVFCSCVMHEALH-NHYTQK	1401,1 (+2)	1401,1	1409,1 (+2)		

*Em virtude da contribuição mínima de oxidação de AT1, o percentual de oxidação em AT1 não é incluído no cálculo da quantidade estimada de oxidação de CTLA4-Ig.

A quantidade estimada total de oxidação de metionina em CTLA4-Ig é calculada como sendo de 2,0% para CTLA4-Ig. Isso é calculado através da adição do percentual total de oxidação em cada sítio e dividindo pelo número total de metioninas, o qual é sete. Análise por MS/MS foi realizada sobre peptídeos oxidados e nativos listados na Tabela 63.

Todos os peptídeos, com exceção de D5, são seqüenciados usando MS/MS. O aminoácido oxidado é determinado através da diferença de massa dentro da série de íons b e y. Os espectros de MS/MS do peptídeo T1 oxidado e nativo requer os íons precursores duplamente carregados em m/z 741,4 e 733,4. A diferença de massa é de 8 u (para o estado duplamente carregado) que é de 16 u quando corrigida para o estado carregado. O peptídeo tríptico T1 (1–14) contém o resíduo de Met¹. O peptídeo nativo e seu derivado oxidado são separados da linha de base através de cromatografia de fase reversa. O cromatograma de íons para íons duplamente carregados de T1 e seus derivados é mostrado na FIG. 67A-B. A série de íons b e y é os íons predominantes produzidos em dissociação induzida por colisão. Os íons y₆–y₁₃ têm as mesmas massas modificada e não modificada. O íon b₂ do peptídeo oxidado é 16 u maior do que o íon b₂ correspondente do peptídeo nativo. A série de íons b e y, tomada junto com as massas de peptídeo, identificam metionina 1 como o aminoácido modificado no peptídeo T1. Da mesma forma, oxidações de Met nos peptídeos AT1, T6, T10 e MYPPPY (97–102) são identificadas.

Deamidação de CTLA4-Ig: CTLA4-Ig tem 15 asparaginas por cadeia simples. Três asparaginas são conhecidas por estarem presas à estruturas de carboidrato N-ligado. Mapeamento peptídico foi usado para identificar e quantificar relativamente a deamidação que ocorre nos outros 12 resíduos de Asn. Deamidações de Asn¹⁸⁶, Asn²²⁵, Asn²⁷¹, Asn²⁹⁴ e Asn³⁴⁴ são identificadas através do mapeamento tríptico de peptídeo por LC/MS (Tabela 64). A quantificação relativa de deamidação de asparagina é calculada de acordo com a área de pico percentual dos cromatogramas de íon extraídos. As quantidades relativas de peptídeos deamidados são listadas na Tabela 64. A quantidade total estimada de deamidação de asparagina em

CTLA4-Ig é calculada como sendo de 0,3% para CTLA4-Ig. Isso é calculado através da adição do percentual total de deamidação em cada sítio e dividido por 15. Análise por MS/MS foi realizada sobre peptídeos deamidados e nativos listados na Tabela 64.

Tabela 64. A deamidação de Asn em CTLA4-Ig

Asn	Peptídeo	Massa esperada não-deamidada	Massa observ. não-deamidada	Massa esperada deamidada	Massa observ. deamidada	Deamidação Percentuaç
186	T12: FNWYVDGVEVHNAK	839,4 (+2)	839,4	839,9 (+2)	839,9	0,9
225	T15: WSVLTVLHQDWLNGK	904,5 (+2)	904,5	905,0 (+2)	905,0 / 905,0	1,5/0,8
271	T25: NQVSLTCLVK	1161,6	1161,7	1162,6	1162,7	0,3
294	T26: GFYPSDIAVEWESNGQPENNYK	1272,6 (+2)	1272,6	1273,1 (+2)	1273,1	1,2
344	T30: WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK	1401,1 (+2)	1401,2	1401,6 (+2)	1401,7	0,2

O aminoácido deamidado é determinado através da diferença de massa dentro da série de íons b e y. Por exemplo. Se existem dois picos deamidados para o peptídeo T15 - massas de 905,0 u. Pico 1 elui antes do pico nativo; o pico 3 elui após o pico nativo. Peptídeos trípticos e suas formas amidadas são separados da linha de base sobre a coluna de fase reversa. Análise por MS/MS foi realizada sobre os peptídeos trípticos e peptídeos deamidados são listados na Tabela 64. Os Picos 1–3 contêm os mesmos íons y1 e y2, indicando que os aminoácidos C-terminais são os mesmos para todos os três picos; contudo, os íons y3–y14 dos picos 1 e 3 são 1 u maiores do que os íons correspondentes do pico 2. A diferença de massa entre y2 e y3 é de 114 u para o pico 2; isso corresponde a um resíduo de Asn. A 115 u para os picos 1 e 3 é um aumento de massa de 1 u comparado com a massa do resíduo de Asn; isso corresponde ao ácido aspártico ou isoaspártico. Da mesma forma, deamidações em T12, T25, T26 e T30 foram identificadas e os íons de fragmento identificam sítios de modificação.

Deamidações de asparagina e oxidações de metionina são determinados a partir de análises de LC/MS e LC/MS/MS da clivagem com endopeptidase de CTLA4-Ig. As modificações são identificadas através de desvios nas massas entre os peptídeos modificados e não modificados. Os aminoácidos modificados são identificados através de seqüenciamento por MS/MS. Seis oxidações de metionina e cinco deamidações de asparagina por cadeia simples estão presentes no material de CTLA4-Ig em um pequeno percentual. Descobriu-se que Met¹, Met⁵³, Met⁵⁴, Met⁸⁵, Met⁹⁷ e Met¹⁶² de CTLA4-Ig são todas oxidadas. Verificou-se que essas oxidações determinadas de CTLA4-Ig são menos de 2,5% de todas as metioninas de CTLA4-Ig. Descobriu-se que Asn¹⁸⁶, Asn²²⁵, Asn²⁷¹, Asn²⁹⁴ e Asn³⁴⁴ de CTLA4-Ig são todas deamidadas em baixas quantidades. Verificou-se que essas deamidações determinadas de CTLA4-Ig são menos de 0,5% de todas as asparaginas em CTLA4-Ig.

Exemplo 48 – Ensaio de endotoxina bacteriana para CTLA4-Ig e CTLA^{4A29YL104E}-Ig

Em uma modalidade, a composição de Substância de Fármaco

de CTLA4-Ig tem menos de ou igual a 0,15 EU/mg de endotoxina bacteriana. CTLA4-Ig é ensaiada com relação à presença de endotoxinas bacterianas usando a técnica de coagulação em gel *Limulus Amebocyte Lysate* (LAL) baseada na USP<85>. No preparo para e aplicação do ensaio, observar precauções ao manipular espécimes de forma a evitar contaminação microbiana bruta; tratar quaisquer recipientes ou utensílios empregados para destruir endotoxinas estranhas que possam estar presentes sobre suas superfícies, tal como aquecimento em um forno quente usando um ciclo validado.

Reagente LAL: (Associates of Cape Cod, Inc.- ou equivalente). *Limulus* liofilizado: Reagente Amebocyte Lysate (LAL), tal como Pyrotell, deverá ser armazenado de acordo com as instruções do fabricante. Reagente LAL reconstituído pode ser mantido congelado durante não mais do que um mês e não deverá ser descongelado ou congelado mais de uma vez.

Padrões de endotoxina: (Associates of Cape Cod, Inc.- ou equivalent). O padrão de controle de endotoxina (CSE) usado nos testes deve ser rastreável e padronizado contra Padrão de Referência de Endotoxina (RSE). Armazenar recipientes na reconstituídos de endotoxina em um refrigerador; uma vez reconstituído, eles podem ser mantidos a 2°-8°C durante não mais do que 14 dias, a menos que validação durante períodos mais longos mostrem reatividade adequada.

Testagem de lotes de Produção

A falta de inibição de produto ou intensificação do procedimento LAL deverá ser validada para cada formulação de fármaco. Testagem dos lotes de produção é realizada usando três unidades individuais representando o início, meio e final de produção. Essas unidades podem ser operadas individualmente ou empoçadas. Um controle de produto positivo representativo da amostra na concentração de teste, inoculado com duas vezes a quantidade de CSE (ou RSE) como a sensibilidade rotulada do ensaio, deve ser incluído para um teste válido. Ajustar o pH de modo que a solução de produto/lisato final esteja na faixa de 6,0 a 8,0 usando tampão de HCl, NaCl estéril isento de endotoxina ou outro. Em algumas situações, pode ser útil usar um agente de tamponamento, tal como Pyrosol, como uma alternativa

ao ajuste de pH. Refira-se às orientações do fabricante para uso específico.

Uso de agente de tamponamento para reconstituição de lisato

Um agente de tamponamento, tal como Pyrosol (Associates of Cape Cod, Inc.) dirigido a reconstituir o lisato usado para testagem e é projetado para amplificar a capacidade de tamponamento do lisato. Lisato reconstituído com Pyrosol pode ser usado para amostras de teste ou diluições de amostra que possam, de outro modo, requerer ajuste de pH com ácido ou base ou as quais se precipitam quando de ajuste do pH. Quando combinado com a amostra de teste, lisato reconstituído com Pyrosol proporciona uma cor rosa para indicar que o pH está na faixa para um teste válido. Se fora dessa faixa, a cor será amarela ou púrpura; nesse caso, a amostra de teste requererá ajuste de pH adicional. Métodos específicos orientarão o uso de Pyrosol para reconstituição de lisato.

Uso de tampão de inibição de glicana para reconstituição de lisato

Um tampão de inibição de glicana, tal como Glucashield (Associates of Cape Cod, Inc.) é usado para reconstituir o lisato usado para testagem e é projetado para bloquear interferência potencial por glicana. Lisato reconstituído com Glucashield pode ser usado para amostras de teste ou diluições de amostra que possam conter contaminação por glicana. Interferência proveniente de contaminação por glicana pode dar origem a falsos positivos em determinados materiais de teste, de modo que uso do lisato reconstituído com Glucashield pode bloquear ou reduzir a interferência, permitindo um número reduzido de falsos positivos. Métodos específicos orientarão o uso de Glucashield para reconstituição de lisato.

25 Diluições de amostra

Se necessário para se aproximar do nível de concentração de endotoxina na amostra, preparar uma série apropriada de diluições da amostra em água isenta de endotoxina estéril. Submeter a turbilhamento e adicionar 0,1 mL de cada preparado a ser testado a cada um de dois tubos de ensaio de vidro estéreis isentos de endotoxina de 10 x 75 mm.

Preparo de soluções de padrão de endotoxina para Curva Padrão

Reconstituir o frasco de endotoxina com água isenta de endoto-

xina conforme as instruções do fabricante. Misturar o frasco vigorosamente sobre um misturador com turbilhonamento intermitentemente durante 30 minutos. Preservar o concentrado em um refrigerador a 2°-8°C durante não mais do que 4 semanas. Misturar vigorosamente usando um misturador com turbilhonamento durante não menos de 3 minutos antes de uso. Consultar o

5 Certificado de Análise do fabricante para verificar a concentração do estoque de endotoxina e preparar uma série de diluições de padrão de endotoxina, projetados para colocar o endpoint entre faixas, tal como no exemplo a seguir:

10 0,5 mL (1000 EU/mL) + 9,5 mL de água isenta de endotoxina =
50 EU/mL

5,0 mL (50 EU/mL) + 5,0 mL de água isenta de endotoxina = 25
EU/mL

15 1,0 mL (25 EU/mL) + 9,0 mL de água isenta de endotoxina = 2,5
EU/mL

1,0 mL (2,5 EU/mL) + 9,0 mL de água isenta de endotoxina =
0,25 EU/mL

5,0 mL (0,25 EU/mL) + 5,0 mL de água isenta de endotoxina =
0,125 EU/mL

20 5,0 mL (0,125 EU/mL) + 5,0 mL de água isenta de endotoxina =
0,06 EU/mL

5,0 mL (0,06 EU/mL) + 5,0 mL de água isenta de endotoxina =
0,03 EU/mL

25 5,0 mL (0,03 EU/mL) + 5,0 mL de água isenta de endotoxina =
0,015 EU/mL

Certifique-se de submeter vigorosamente a turbilhonamento cada diluição durante pelo menos 30 segundos antes prosseguir para a próxima diluição. Incluir um controle negativo de água do diluente usado. Submeter a turbilhonamento e adicionar 0,1 mL de cada uma das concentrações de

30 0,125 EU/mL, 0,06 EU/mL, 0,03 EU/mL, 0,015 EU/mL (ou curva alternativa) e o controle negativo de água, a cada um de dois tubos de ensaio de vidro estéreis isento de endotoxina de 10 x 75 mm para proporcionar duas curvas

repetidas.

Preparo de solução de reagente LAL

Remover o reagente LAL liofilizado do congelador. Adicionar as-
septicamente 5,0 mL de água isenta de endotoxina (a menos que de outro
5 modo orientado pelo método específico, usar um tampão de reconstituição)
ao frasco. Agitar ou girar o frasco para dissolver o reagente.

Preparo de controle de produto positivo

Todos os produtos devem ser testados com um controle de pro-
duto positivo. Refira-se ao método específico aplicável para instruções sobre
10 o preparo do controle positivo. Se nenhuma instrução é proporcionada, pre-
parar o controle de produto positivo para conter endotoxina reforçada a 2X o
nível da sensibilidade do lisato, em combinação com o produto em seu nível
de teste. Quando de testagem de Água para injeção ou água High Quality
Process, usar a diluição do padrão de endotoxina reconstituída de modo
15 que, quando adicionado à amostra, a concentração de endotoxina será 2X a
sensibilidade da solução LAL. Por exemplo, se a sensibilidade do lisato =
0,06 EU/mL, adicionar 0,1 mL de uma solução de endotoxina a 2,5 EU/mL a
1,9 mL de amostra de teste (na forma conforme adicionado à solução LAL) =
0,125 EU/mL. O volume da solução de endotoxina não é maior do que 0,1
20 mL e a diluição global não é menor do que 1: 20.

Procedimento de teste

1. Distribuir assepticamente 0,1 mL da solução de reagente LAL
em cada uma das amostras de tubos de ensaio e tubos com padrão de en-
dotoxina, tomando cuidado para evitar contaminação cruzada entre os tubos.
25 **NOTA:** Colocar qualquer reagente restante em um congelador em torno de
menos 10°C a menos 25°C.

2. Refira-se à bula do lisato específico para instruções de mistu-
ra da mistura de produto-lisato.

3. Colocar cada tubo em um dispositivo de incubação, tal como
30 um banho de água ou bloco de aquecimento mantido a $37^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Registrar
o tempo de início de incubação e a temperatura do banho de água ou bloco
de aquecimento.

4. Incubar cada tubo, sem perturbar, durante 60 ± 2 minutos.

5. Após a incubação, registrar o ponto final da incubação e observar cada tubo invertendo gentilmente o tubo 180° . Um resultado positivo é denotado por um gel firme, o qual permanece firme quando invertido cuidadosamente, um resultado negativo é caracterizado pela ausência de tal gel ou através da formação de um gel viscoso que não mantém sua integridade. Manipular os tubos cuidadosamente e evitar submeter os mesmos à vibrações, as quais poderiam causar observações falso-negativas.

Avaliação

10 A menor concentração em cada série de réplica para proporcionar um resultado positivo é denominada o endpoint. Calcular o endpoint de média geométrica par ao teste através do procedimento a seguir:

Média geométrica = o anti-logaritmo da soma logarítmica dos endpoints de gelificação dividido pelo número de ensaios de endpoint repetidos

15 O teste é válido contanto que o endpoint de média geométrica esteja dentro uma diluição de duas vezes da sensibilidade do lisato rotulado, o controle de produto positivo seja positivo e o controle negativo de água seja negativo. Determinar o nível aproximado de endotoxina bacteriana em ou sobre o artigo de teste através de comparação da sensibilidade do lisato rotulado com os resultados positivos ou negativos acoplados aos fatores de diluição do artigo testado. O artigo vai de encontro aos requisitos do teste se não há formação de um gel firme ao nível de endotoxina especificado nos monográficos individuais ou especificação.

Método para CTLA4^{A29YL104E}-Ig

25 Esse método é usado para quantificar endotoxinas bacterianas nas amostras de Substância de Fármaco e produto de fármaco de CTLA4^{A29YL104E}-Ig usando o método turbidimétrico cinético LAL. Os resultados são reportados como EU/mL e EU/mg de produto de fármaco equivalente.

Termos:

30 LAL – lisato de *Limulus* Amebocyte

CSE – Endotoxina padrão de controle

EU – unidades de endotoxina na Farmacopéia Norte Americana

EU/mg – Unidades por miligrama de endotoxina na Farmacopéia Norte Americana

EU/mL – Unidades por mililitro de endotoxina na Farmacopéia Norte Americana

5 LRW – LAL Reagent Água

Solução turbidimétrica de lisato de Limulus Amebocytec (Pyrotell-T[□]). Deixar os frascos de Pyrotell-T[□] e PyroSol[□] aquecer para a temperatura ambiente durante 30 minutos antes de abrir. Remover a vedação de metal do Pyrotell-T[□] e remover assepticamente a rolha. Reconstituir
10 Pyrotell-T[□] com 5,0 mL de tampão de reconstituição PyroSol[□]. Girar a garrafa gentilmente para misturar até completamente dissolvida. Reconstituir o tampão imediatamente antes de uso. Pyrotell-T[□] reconstituída pode ser mantida a 2-8°C durante não mais do que 24 horas. Cobrir a parte de cima do recipiente com uma camada de Parafilm[□].

15 **Solução de endotoxina padrão de controle.** Deixar o frasco de CSE (1.2) aquecer para a temperatura ambiente durante 30 minutos antes de abrir. Remover a vedação metálica do frasco e remover assepticamente a rolha. Levantar cuidadosamente a rolha apenas o bastante para deixar o ar entrar, desse modo, quebrando o vácuo. Reconstituir endotoxina padrão de
20 controle (CSE) com 5,0 mL de LRW (1.4). Vedar com Parafilm[□]. Submeter a turbilhonamento vigorosamente durante um minuto, em intervalos de 5-10 minutos durante um intervalo de 30-60 minutos em temperatura ambiente. CSE está, então, pronta para. Refira-se ao Certificado de Análise do fabricante para obter a potência da endotoxina padrão de controle (CSE) em
25 USP-EU por frasco vs. o lote específico de Pyrotell-T[□]. Calcular a USP-EU/mL da CSE no frasco. CSE reconstituída pode ser mantida a 2-8°C durante 30 dias. Após cada uso, vedar o recipiente com um novo Parafilm[□].

Exemplo:

30 Para um frasco tendo uma potência de 6.000 USP-EU/frasco reconstituído com 5,0 mL de LRW, a potência seria 1.200 USP-EU/mL.

$$\text{Potência} = \frac{6,000 \text{ EU/vial}}{5,0 \text{ mL}} = 1,200 \text{ EU/mL}$$

Ajuste de Parâmetros de ensaio no software Pyrosoft-11[□]

Parâmetros gerais. Ajustar parâmetros na aba General Test Information, conforme mostrado na Tabela abaixo.

Informação geral de teste

Parâmetro	Valor
Validar faixa min. de Temp	36,5
Validar faixa Max. de Temp	37,5
Faixa recuperação Reforçada min.	50
Faixa recuperação Reforçada Max.	200
Limiar OD (mAbs)	20
OD Max Armazenado (mAbs)	100
Tempo máximo de teste (mins)	120
Linha de base Adj. Ativo	verificado
Auto-terminar	Não verificado
Verificar controle negativo	Não verificado

5 Opções

Parâmetro	Valor
Assinalar coeficiente de correlação	Verificado
Mostrar coeficiente de correlação	Não verificado
Assinalar coeficiente de variação	Não verificado
Extrapolar além	Não verificado
Auto Teste ID	Não verificado
Mostrar resultados de falha de passe	Verificado
Auto-impressão	Não verificado

Atribuições de Tubo - Exemplo

Tubo No.	Descrição de amostra	Concentração de Padrão/Reforçada	Unidades	Diluição de amostra
1	Controle negativo		EU/mL	
2	Controle negativo		EU/mL	
3	Padrão	0,064	EU/mL	
4	Padrão	0,064	EU/mL	
5	Padrão	0,032	EU/mL	
6	Padrão	0,032	EU/mL	
7	Padrão	0,016	EU/mL	
8	Padrão	0,016	EU/mL	
9	Padrão	0,008	EU/mL	
10	Padrão	0,008	EU/mL	
11	Padrão	0,004	EU/mL	
12	Padrão	0,004	EU/mL	
13	Padrão	0,002	EU/mL	
14	Padrão	0,002	EU/mL	
15	Amostra 1		EU/mL	1: 1
16	Amostra 1		EU/mL	1: 1
17	Amostra 1 Reforçada	0,016	EU/mL	1: 1
18	Amostra 1 Reforçada	0,016	EU/mL	1: 1
19	Amostra 2		EU/mL	1: 1
20	Amostra 2		EU/mL	1: 1
21	Amostra 2 Reforçada	0,016	EU/mL	1: 1
22	Amostra 2 Reforçada	0,016	EU/mL	1: 1
23	Amostra 3		EU/mL	1: 1
24	Amostra 3		EU/mL	1: 1
25	Amostra 3 Reforçada	0,016	EU/mL	1: 1
26	Amostra 3 Reforçada	0,016	EU/mL	1: 1
27	Amostra 4		EU/mL	1: 1
28	Amostra 4		EU/mL	1: 1
29	Amostra 4 Reforçada	0,016	EU/mL	1: 1
30	Amostra 4 Reforçada	0,016	EU/mL	1: 1
31	Controle positivo água	0,016	EU/mL	
32	Controle positivo água	0,016	EU/mL	

Preparo de concentrações de Curva Padrão.

- Preparo de solução de trabalho de estoque de padrão de controle de endotoxina (CSE, 2.2) a 4 USP-EU/mL. Preparar a solução de trabalho de CSE em uma potência de 4 EU/mL. Calcular o volume de LRW necessário para a diluição usando a Equação 1. Adicionar 20 μ L de solução CSE (2.2) na quantidade apropriada (Equação 1) de LRW (1.4) em um tubo de poliestireno (1.9). Submeter a turbilhamento a diluição durante 30 segundos.

Exemplo:

Para uma solução CSE em uma potência de 1,200 EU/mL, adi-

cionar 20 μ L de solução CSE a 5,980 μ L de LRW.

$$\text{Volume LRW} = \left(\frac{20\mu\text{L} * 1,200\text{EU/mL}}{4\text{EU/mL}} \right) - 20\mu\text{L}$$

- 5 **Preparo de solução de trabalho de estoque CSE a 0,64 EU/mL.** Preparar a solução de trabalho de CSE em uma potência de 0,64 USP-EU/mL através da adição de 1,6 mL de solução de estoque CSE a 4 USP-EU/mL a 8,4 mL de LRW em um tubo de poliestireno. Submeter a turbilhonamento durante 30 segundos.
- 10 **Preparo de Soluções padrões de estoque.** Soluções padrões de estoque são preparadas a 0,128, 0,064, 0,032, 0,016, 0,008 e 0,004 EU/mL a partir da solução de trabalho de CSE em tubos de poliestireno. Submeter a turbilhonamento cada tubo durante 30 segundos após diluição. Um esquema de diluição é mostrado na tabela abaixo.
- 15 **Esquema de diluição para Soluções padrões de estoque**

Volume (μ L) de Concentração (EU/mL)	LRW (mL)	Concentração final de estoque (EU/mL)*
2 mL de 0,64 EU/mL de solução	8	0,128
4 mL de 0,128 EU/mL solução	4	0,064
4 mL de 0,064 EU/mL de solução	4	0,032
4 mL de 0,032 EU/mL de solução	4	0,016
4 mL de 0,016 EU/mL de solução	4	0,008
4 mL de 0,008 EU/mL de solução	4	0,004

* A diluição final de duas vezes ocorre nos tubos de reação.

Preparo de amostra

- Preparo de amostra de Substância de Fármaco. Preparar a diluição de amostra para 0,25 mg/mL. Calcular o volume de LRW necessário para a diluição usando a Equação abaixo. Remover cuidadosamente a parte de cima do recipiente de amostra e adicionar 50 μ L de amostra na quantidade apropriada (Equação abaixo) de LRW em um tubo de poliestireno para fazer uma solução a 0,25 mg/mL. Submeter a turbilhamento a amostra durante 30 segundos. Cobrir a parte de cima do recipiente de amostra com uma camada de Parafilm[□].

Exemplo:

- 10 Para uma amostra tendo uma concentração de 24,7 mg/mL, adicionar 50 μ L (0,05 mL) de amostra a 4,89 mL de água.

Equação

2:

$$\text{Volume LRW (mL)} = \left(\frac{0.05 * \text{Concentração de proteína (mg / mL)}}{0.25 \text{ mg / mL}} \right) - 0.05 \text{ mL}$$

- 15 **Preparo de amostra de liofilizado de Produto de fármaco.**

NOTA: Um único lote de Produto de fármaco consiste de três amostras distintas, "início", "meio" e "fim".

- Reconstituir um frasco de produto de fármaco com água LAL Reagent de acordo com as especificações de Identificação de produto (PI).
- 20 Diluir a amostra reconstituída para 0,25 mg/mL. Calcular o volume de LRW necessário para a diluição usando a Equação 2. Remover cuidadosamente a parte de cima do recipiente de amostra e adicionar 50 μ L de amostra na quantidade apropriada (Equação 2) de LRW em um tubo de poliestireno para fazer uma solução a 0,25 mg/mL. Submeter a turbilhamento a amostra
- 25 durante 30 segundos. Cobrir a parte de cima do recipiente de amostra com Parafilm[□].

Preparo de amostra de Produto de fármaco pronta para uso.

- Diluir a amostra para 0,25 mg/mL. Calcular o volume de LRW necessário para a diluição usando a Equação 3. Remover cuidadosamente a parte de
- 30 cima do recipiente de amostra e adicionar 10 μ L de amostra à quantidade apropriada (Equação 3) de LRW em um tubo de poliestireno para fazer uma

solução a 0,25 mg/mL. Submeter a turbilhonamento a amostra durante 30 segundos. Cobrir a parte superior do recipiente de amostra com Parafilm[□].

Exemplo:

- 5 Para uma amostra tendo uma concentração de 125,0 mg/mL, adicionar 10 μ L (0,01 mL) de amostra a 4,99 mL de água.

Equação 3:

$$\text{Volume LRW (mL)} = \left(\frac{0.01 \text{ *] concentração de proteína (mg/mL)}}{0.25 \text{ mg/mL}} \right) - 0.01 \text{ mL}$$

- 10 Placebo de Produto de fármaco pronto para uso. Diluir um placebo (conforme se ele estivesse em uma concentração nominal de produto de fármaco de proteína de 125 mg/mL) para 0,25 mg/mL. Isso é equivalente a uma diluição de 1: 500. Calcular o volume de LRW necessário para a diluição usando a Equação 3. Remover cuidadosamente a parte superior do re-combinante de amostra e adicionar 10 μ L de amostra até a quantidade apropriada (Equação 3) de LRW em um tubo de poliestireno para fazer uma solução equivalente a 0,25 mg/mL.

- 15 **Controle positivo água.** O controle positivo é preparado a partir da Curva Padrão através da adição de 100 μ L de 0,032 EU/mL de padrão a 100 μ L de LRW nos tubos de reação.

Ajuste do tubo de reação – Exemplo

Tubo No.	Descrição	Conc. De estoque de padrão (EU/mL)	Padrão/ Amostras (μ L)	LRW (μ L)	Sol. Reforçada (μ L)	Conc. Final (EU/mL)
1	Controle negativo	-	0	200	0	0,000
2	Controle negativo	-	0	200	0	0,000
3	Padrão 1	0,004	100	100	0	0,002
4	Padrão 1	0,004	100	100	0	0,002
5	Padrão 2	0,008	100	100	0	0,004
6	Padrão 2	0,008	100	100	0	0,004
7	Padrão 3	0,016	100	100	0	0,008
8	Padrão 3	0,016	100	100	0	0,008
9	Padrão 4	0,032	100	100	0	0,016
10	Padrão 4	0,032	100	100	0	0,016
11	Padrão 5	0,064	100	100	0	0,032
12	Padrão 5	0,064	100	100	0	0,032
13	Padrão 6	0,128	100	100	0	0,064
14	Padrão 6	0,128	100	100	0	0,064

Continuação

15	Amostra 1	-	100	100	0	desconhecida
16	Amostra 1	-	100	100	0	desconhecida
17	Amostra Reforçada 1	-	100	0	100	Constitutiva + 0,016
18	Amostra Reforçada 1	-	100	0	100	Constitutiva + 0,016
19	Amostra 2	-	100	100	0	desconhecida
20	Amostra 2	-	100	100	0	desconhecida
21	Amostra Reforçada 2	-	100	0	100	Constitutiva + 0,016
22	Amostra Reforçada 2	-	100	0	100	Constitutiva + 0,016
23	Amostra 3	-	100	100	0	desconhecida
24	Amostra 3	-	100	100	0	desconhecida
25	Amostra Reforçada 3	-	100	0	100	Constitutiva + 0,016
26	Amostra Reforçada 3	-	100	0	100	Constitutiva + 0,016
27	Amostra 4	-	100	100	0	desconhecida
28	Amostra 4	-	100	100	0	desconhecida
29	Amostra Reforçada 4	-	100	0	100	Constitutiva + 0,016
30	Amostra reforçada 4	-	100	0	100	Constitutiva + 0,016
31	Controle positivo água	0,032	0	100	100	0,016
32	Controle positivo água	0,032	0	100	100	0,016

- 5 **Adição de reagente Pyrotell-T[□].** Adicionar 50 □L de solução de Pyrotell-T[□] a cada tubo de reação (controle negativo, padrões, amostras, amostras reforçadas e controle positivo água) com uma pipeta de repetição. Submeter a turbilhonamento cada tubo durante 1-2 segundos e inserir os mesmos na cavidade atribuída (Tabela 1) no instrumento Pyros Kinetix.

ANÁLISE DE DADOS

- 10 **Análise.** O software PyroSoft[□]-11 realizará uma auto-análise de todos os padrões, controles e amostras e reportará os resultados para a amostra em EU/mL ao término da operação. Cada amostra em duplicata é reportada como um valor médio de das duas. Se um dos tubos do valor com par em duplicata não é detectados pelo software PyroSoft[□]-11, esse tubo pode ser excluído de análise de dados adicional e os resultados re-

calculados. Recuperação (controle de amostra positivo) será calculada baseado na quantidade de endotoxina na amostra mais a quantidade endotoxina reforçada na amostra (0,016 EU/mL).

5 Converter o valor de EU/mL para o valor de EU/mg de amostra diluída de Substância de Fármaco ou Produto de fármaco.

Os dados brutos são gerados como EU/mL e reportados como EU/mg de proteína. Para converter EU/mL para EU/mg, dividir o valor de endotoxina (EU/mL) pela concentração de proteína (0,125 mg/mL). Os resultados são reportados em um quadro significativo.

10 Exemplo:

Para a amostra tendo 0,23 EU/mL no ensaio, o valor de reportável EU/mg será de 2 EU/mg (1,8 arredondado para um quadro significativo).

$$\left(\frac{0.23 \text{ EU/mL}}{0.125 \text{ mg/mL}} \right) = 1.84 \text{ EU/mg} = 2 \text{ EU/mg}$$

15 **Resultados para amostra de Substância de Fármaco.** Os resultados são determinados como um quadro significativo. O QL do ensaio é 0,02 EU/mg. Se a amostra é \square 0,02 EU/mg, o resultado reportável é [$<$ QL, (QL = 0,02 EU/mg)].

20 **Resultados para amostra de Produto de fármaco.** A média das três amostras para cada Lote de produto de fármaco ("começo", "meio" e "final") em EU/mg é o resultado reportável para amostras de produto de fármaco em um quadro significativo. Para o caso onde uma ou mais das amostras para um Lote são $<$ QL (0,02 EU/mg), o valor de 0,02 EU/mg será usado para cálculo da média. Se o resultado médio reportável é \square 0,02 EU/mg, o resultado reportável é [$<$ QL, (QL = 0,02 EU/mg)].

25 Exemplo:

Amostra de um Lote de Produto de fármaco	Valor de EU/mg
Início	$<$ QL = 0,02 EU/mg
Meio	0,023
Final	0,031
Valor reportável (Média)	0,02 EU/mg

Para esse Exemplo, o placebo de produto de fármaco seria reportado como: 3 EU/mL, equivalente a 0,02 EU/mg em uma concentração nominal de produto de fármaco de 125 mg/mL.

Adequabilidade de sistema. A amostra de Substância de Fármaco deverá ser recebida em recipientes de poliestireno a 2-8 °C. Se as amostras são recebidas em diferentes recipientes em uma temperatura diferente, elas não podem ser usadas no ensaio. O coeficiente de determinação para a Curva Padrão (r^2) deve ser $\geq 0,99$. Se o valor de r^2 é $< 0,99$, o ensaio não é válido e deve ser repetido. A concentração média de endotoxina para o controle negativo deve ser $< 0,002$ EU/mL. Se o controle negativo é $\geq 0,002$ EU/mL, o ensaio não é válido e deve ser repetido. O valor de amostra reforçada deve cair dentro da faixa de 50 – 200% do valor esperado. Se o valor de amostra reforçada é $\leq 49\%$ ou $\geq 201\%$ do valor esperado, o ensaio não é válido e deve ser repetido. A concentração média de endotoxina para o controle positivo água deve cair dentro da faixa de 50-200% da mesma concentração na Curva Padrão. Se o valor do controle positivo, água, é $\leq 49\%$ ou $\geq 201\%$ do valor esperado, o ensaio não é válido e deve ser repetido. Valores de endotoxina para as amostras deve cair dentro da faixa da Curva Padrão de endotoxina (entre 0,002 e 0,064 USP-EU/mL). Se as amostras são $< 0,002$ EU/mL, elas estão abaixo do QL do ensaio e reportar-se à seção 5.4. Se amostras são $> 0,064$ USP-EU/mL, as amostras devem ser ainda diluídas para a faixa do ensaio.

Exemplo 49 – Testes de limites microbianos (Biocarga) para CTLA4-Ig

Esse método proporciona procedimentos de teste para estimativa do número de microorganismos aeróbicos viáveis presentes e para isenção de espécies microbianas designadas. Em uma modalidade, a composição de CTLA4-Ig deverá ter a biocarga em um nível de ≤ 1 CFU/10 mL. No preparo para e na aplicação dos testes, observar precauções assépticas ao manipular os espécimes. O termo "Crescimento" é definido como a presença e proliferação presumida de microorganismos viáveis. A validade dos resultados do teste repousa grandemente sobre a demonstração de que os espécimes de teste aos quais eles são aplicados não inibem, em si, o crescimen-

to, sob as condições de teste, de microorganismos que possam estar presentes. Essa demonstração incluirá estimulação de espécimes apropriadamente preparados do material a ser testado com culturas viáveis distintas de organismos de estimulação apropriados para assegurar que o teste não inibe o crescimento dessas classes de organismo, por que elas estariam presentes no material testado. Qualquer parte de qualquer produto de beta lactame o qual é usado para testagem deve ser tratada com uma quantidade adequada de penicilinase de acordo com os procedimentos validados.

Fluidos de diluição e Meios

10 **1. Preparo de meio de cultura e fluidos de diluição.** Meios de cultura e fluidos de diluição podem ser preparados ou meios de cultura desidratados podem ser usados contanto que, quando reconstituídos diretamente pelo fabricante ou distribuidor, eles tenham ingredientes similares e/ou proporcionem meios comparáveis àqueles obtidos de uma formulação fornecida aqui. No preparo de meios através das fórmulas, dissolver os sólidos solúveis na água, usando calor se necessário, para obter dissolução completa e adicionar soluções de ácido clorídrico ou hidróxido de sódio em quantidades suficientes para proporcionar o pH desejado no meio quando ele está pronto para uso. Os meios têm de ser esterilizados em uma autoclave usando um procedimento de esterilização validado. Determinar o pH após esterilização a $25^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$.

Promoção de Crescimento

25 a) Cada lote de meio submetido à autoclave é testado com relação à sua capacidade de promover o crescimento através de inoculação de recipientes de teste em duplicata de cada meio com menos de 100 microorganismos e incubação de acordo com as condições especificadas abaixo. Os organismos não podem ter mais de 5 passagens da cultura originalmente recebida da ATCC.

30 b) O meio de teste é satisfatório se evidência de crescimento aparece dentro de 48-72 horas para bactérias e 5 dias para fungos. O teste de promoção de crescimento pode ser conduzido simultaneamente com o uso do meio de teste para testagem de materiais. Contudo, a testagem de

materiais é considerada inválida se esse teste de promoção de crescimento não tem sucesso.

Microorganismos de teste para uso em testagem de meio que promove o crescimento

TESTE	MEIO	MICROORGANISMOS DE TESTE	ATCC #	TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO
<u>Contagem microbiana aeróbica total</u>	TSA	(1) <u>Staphylococcus aureus</u> ou:	6538	30° – 35° C
		<u>Micrococcus luteus</u>	9341	30° – 35° C
		(2) <u>Bacillus subtilis</u>	6633	30° – 35° C
		(3) <u>Escherichia coli</u>	8739	30° – 35° C
<u>Contagem total combinada de mofos e levedos</u>	SDA	(1) <u>Candida albicans</u>	10231	20° – 25° C
		(2) <u>Aspergillus niger</u>	16404	20° – 25° C
<u>Ausência de Pseudomonas aeruginosa</u>	TSB	(1) <u>Pseudomonas aeruginosa</u>	9027	30° – 35° C
<u>Ausência de Staphylococcus aureus</u>	TSB	(1) <u>Staphylococcus aureus</u>	6538	30° – 35° C
<u>Ausência de Salmonela</u>	FLM	(1) <u>Salmonella choleraesuis</u> ou: <u>Salmonella typhimurium*</u>	13311	30° – 35° C 30° – 35° C
<u>Ausência de Escherichia coli</u>	FLM	(1) <u>Escherichia coli</u>	8739	30° – 35° C

- 5 *Outras espécies Salmonella não patogênicas também podem ser adequadas.

Procedimento para contagem de micróbios aeróbicos totais ou contagem combinada total de mofos e levedos

- 10 a) **Preparo de amostra.** A menos que de outro modo orientado pelo método específico, preparar o espécime para testagem como segue. Refira-se à seção apropriada abaixo para informação adicional com relação aos meios e procedimentos de incubação, dependendo de qual teste está sendo realizado.

- 15 i) Pós brutos e matérias primas - Dissolver ou suspender 10 gramas ou 10 mL de amostra em 90 mL de tampão de fosfato estéril, pH de 7,2. Misturar bem e transferir 1,0 mL para cada um de dois discos de Petri estéreis.

- 20 ii) Cápsulas - Transferir assepticamente 2 envoltórios de cápsula e seus conteúdos para 20 mL de tampão de fosfato estéril, pH de 7,2. Aquecer em um banho de água (aproximadamente 45°C) durante cerca de 10 minutos. Agitar vigorosamente até que a suspensão se torne uniforme e transferir 1,0 mL para cada um de dois discos de Petri estéreis.

- iii) Pós para suspensão - Reconstituir a amostra de acordo com

as orientações no rótulo usando tampão de fosfato estéril, pH de 7,2 como o diluente. Agitar bem e transferir 1,0 mL para cada um de dois discos de Petri estéreis.

5 iv) Soluções/Suspensões - Transferir 1,0 mL para cada um de dois discos de Petri estéreis.

v) Tabletes - Transferir 4 tabletes (tabletes duros deverão primeiro ser pulverizados com um pilão estéril) para 20 mL de tampão de fosfato estéril, pH de 7,2. Agitar bem até que os tabletes desintegram ou dissolvam completamente e transferir 1,0 mL para cada um de dois discos de Petri estéreis.

10

vi) Envoltórios de cápsula - Transferir 25 envoltórios de cápsula para 100 mL de tampão de fosfato estéril, pH de 7,2 e aquecer em um banho de água (aproximadamente 45°C) durante cerca de 15 minutos, agitando intermitentemente para dissolver. Agitar bem e transferir 1,0 mL para cada um de dois discos de Petri estéreis.

15

vii) Pomadas - Em um recipiente estéril, empoçar aproximadamente 5 mL de cada uma de 3 amostras tomadas através do lote e misturar. Transferir 0,1 mL dessa amostra empoçada para cada um de dois discos de Petri estéreis. Dispersar a amostra sobre a superfície do meio com o auxílio de uma haste de vidro curvada estéril ("hockey stick"). Usando uma haste estéril separada para cada lâmina, incubar conforme descrito em "Contagem Aeróbica Total".

20

b) Filtração em membrana. Como uma alternativa aos procedimentos em lâmina, um procedimento de teste de filtração em membrana adequado validado pode ser usado. Esse pode ser especialmente útil para produtos contendo substâncias inibitórias.

25

c) Re-testagem. Para fins de confirmar um resultado duvidoso através de qualquer um dos procedimentos a seguir, um re-teste pode ser realizado usando duas vezes e meia (mínimo) do tamanho da amostra inicial, com ajustes de diluente apropriados.

30

Teste com relação à contagem de micróbios aeróbicos totais

1. Preparar as amostras a serem testadas conforme descrito. A

cada lâmina, adicionar 15-20 mL de TSA estéril o qual tenha sido fundido e esfriado para aproximadamente 45°C. Cobrir cada gentilmente inclinar ou agitar o disco para misturar a amostra com o agar e deixar os conteúdos solidificar em temperatura ambiente. Inverter as lâminas e incubar durante 48 a
5 72 horas a 30°-35°C.

2. Após incubação, examinar as lâminas com relação ao crescimento usando um dispositivo de ampliação, tal como um Quebec Colony Counter, contar o número de colônias e calcular os resultados em uma base unitária (por tablete, cápsula, mL, gram, etc.) conforme designado na especificação dos materiais e avaliar a aceitabilidade contra a especificação dos
10 materiais.

3. Caracterizar adicionalmente a contaminação bacteriana através de coloração de gram e morfologia microscópica. Submeter bactérias gram-negativas e cocos gram-positivos à testagem bioquímica (ou meios
15 alternativos adequados de identificação).

Nota: Quando de contagem das colônias, de forma a facilitar a diferenciação de crescimento de colônias do Material que está sendo testado, algumas vezes é aconselhável usar uma solução a 2% de cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (TTC) como um agente de intensificação para observar
20 o crescimento microbiano. TTC é um indicador de oxidação-redução incolor que se torna vermelho quando é hidrogenado através dos açúcares de redução encontrados em células vivas, desse modo, tornando a colônia de uma cor vermelho profundo. Usar TTC, inundar a lâmina de Petri com aproximadamente 1 mL da solução a 2% e incubar a lâmina a 30°-35°C durante aproximadamente 2 horas. Colônias microbianas corarão diferentemente de outro material presente sobre a lâmina e podem ser mais facilmente contadas.
25

C. Teste para contagem total combinada de mofos e levedos

1. Preparar as amostras a serem testadas conforme descrito. A cada lâmina, adicionar 15-20 mL de SDA estéril o qual tenha sido fundido e esfriado para aproximadamente 45°C. Cobrir cada disco e gentilmente inclinar ou agitar o disco para misturar a amostra com o agar e deixar os conteúdos solidificar em temperatura ambiente. Inverter as lâminas e incubar du-
30

rante 5 a 7 dias a 20°-25°C.

[NOTA: Não mexer nas lâminas durante incubação, porque a dispersão de mofo dentro da lâmina proporcionaria uma contagem maior do que aquela realmente presente.]

5 2. Após incubação, examinar as lâminas com relação ao crescimento usando um dispositivo de ampliação, tal como um Quebec Colony Counter, contar o número de colônias e calcular os resultados em uma base unitária (por tablete, cápsula, mL, gram, etc.) conforme designado na especificação dos materiais e avaliar a aceitabilidade contra a especificação dos
10 materiais.

3. Caracterizar adicionalmente a contaminação fúngica através da morfologia macroscópica e microscópica. Onde apropriado, submeter os levedos à testagem bioquímica (ou meios alternativos adequados de identificação).

15 **Procedimento para Testagem da ausência de organismos indesejáveis**

a) Preparo de amostra - A menos que de outro modo especificado pelo Método específico, preparar a amostra para testagem conforme descrito acima na seção preparo de amostra para os mofos e levedos aeróbicos totais e totais combinados. Refira-se à seção apropriada abaixo para informação adicional, dependendo de qual teste está sendo realizado.
20

b) Filtração em Membrana - Como uma alternativa aos procedimentos de pré-enriquecimento, um procedimento de teste de filtração em membrana validado pode ser usado. Esse pode ser especialmente útil para produtos contendo substâncias inibitórias.

25 c) Re-testagem – Para fins de confirmar um resultado duvidoso através de qualquer um dos procedimentos a seguir, um re-teste pode ser realizado usando duas vezes e meia (mínimo) do tamanho da amostra inicial, com ajustes de diluente apropriados.

B. Teste com relação à ausência de Staphylococcus aureus e Pseudomonas aeruginosa. A uma amostra, adicionar TSB para fazer 100
30 mL, misturar e incubar durante 24-48 horas a 30°-35°C. Examinar o meio com relação ao crescimento e, se presente, usando um loop de inoculação,

colocar uma porção em um meio seletivo, incubar e examinar com relação às características listadas abaixo (kits de identificação comercialmente disponíveis podem substituir os testes de reação individuais):

Características de Staphylococcus aureus

Méio:	Vogel-Johnson	Sal-Manitol	Baird-Parker
Morfologia:	Colônias pretas circundadas por zonas amarelas	Colônias amarelas com zonas amarelas	Colônias pretas brilhantes circundadas por zonas claras de 2-5 mm
Teste com coagulase*:	positivo	positivo	Positivo
Coloração gram:	Cocos positivos (agrupamentos)	Cocos positivos (agrupamentos)	Cocos positivos (agrupamentos)

- 5 *Transferir colônias suspeitas representativas do agar seletivo para tubos individuais contendo 0,5 mL de plasma de mamífero (de preferência coelho ou cavalo), incubar a 37 °C, examinar a 3-4 horas e, substancialmente, em intervalos adequados durante até 24 horas com relação à coagulação.

Características de Pseudomonas aeruginosa

Méio:	Cetrimide	PSF*	PSP*
Morfologia:	Esverdeado	Incolor a amarelado	esverdeado
Fluorescência em luz UV	Esverdeado	Amarelado	Azul
Oxidase**:	positivo	positivo	Positivo
Coloração gram:	Bastonetes negativos	Bastonetes negativos	Bastonetes negativos

- 10 *Para o teste de pigmento, colocar colônias suspeitas representativas do Cetrimide Agar em discos de PSF e PSP. Cobrir e incubar a 35°C ± 2 °C durante um mínimo de três dias. Examinar as lâminas sob luz UV.

- 15 **Para o teste de oxidase, confirmar quaisquer colônias suspeitas transferindo para tiras ou discos impregnados com dihidroclorato de N,N-dimetil-o-fenilenodiamina; se não há desenvolvimento de uma cor rosa mudando para púrpura, a amostra vai de encontro aos requisitos com relação à ausência de Pseudomonas aeruginosa. Note que kits de teste comercialmente disponíveis os quais foi demonstrado ter um bom desempenho de
20 um modo aceitável também podem ser usados.

Se nenhum crescimento é observado ou se nenhuma das colônias se conforma ao conjunto de características listadas nas tabelas acima,

a amostra vai de encontro aos requisitos do teste com relação à ausência desse organismo.

Teste com relação à ausência de espécies Salmonella e Escherichia coli

5 Transferir a amostra para um recipiente estéril para conter um total 100 mL de meio Fluido de Lactose e incubar a 30°-35°C durante 24-48 horas. Agitar gentilmente e examinar com relação ao crescimento. (Kits de identificação comercialmente disponíveis podem substituir os testes de reação individuais).

10 a) Salmonella - se crescimento está presente em meio Fluido de Lactose:

1. Transferir porções de 1,0 mL para tubos de 10 mL com meio Fluido de Selenita-Cistina e meio Fluido de Tetracionato, misturar e incubar a 30°-35°C durante 24-48 horas.

15 2. Por meio de um loop de inoculação, colocar porções de ambos os meios sobre meio de agar Brilliant Green, meio de agar Xilose-Lisina-Deóxicolato e meio de agar de sulfito de bismuto. Cobrir, inverter e incubar a 30°-35°C durante 24-48 horas e examinar com relação às características morfológicas listadas abaixo:

Características da Salmonella			
Meio:	Brilliant Green	Xilose-lisina-deóxicolato	Sulfito de bismuto
Morfologia:	Pequena, transparente, incolor ou rosa a branco opaco (freqüentemente circundada por uma zona rosa ou vermelha)	Vermelha, com ou sem centros pretos	Preto ou verde

20 3. Identificação adicional pode ser conduzida transferindo colônias suspeitas para um tubo com ponta/declive com meio triplo de açúcar-ferro-agar primeiro riscando a superfície do declive e, então, colocando o fio por baixo da superfície. Incubar a 30°-35°C durante 24-48 horas e examinar. Se nenhum tubo mostra evidência de declives alcalinos (vermelhos) e pontas ácidos (amarelo) (com ou sem formação concomitante da cor preta da
25 ponta), a amostra vai de encontro aos requisitos do teste com relação à ausência do gênero Salmonella.

b) Escherichia coli - se crescimento está presente no meio de

lactose fluido:

1. Por meio de um loop de inoculação, colocar uma porção em meio de agar MacConkey. Cobrir, inverter e incubar a 30°-35°C durante 24-48 horas.

5 2. Se nenhuma das colônias resultantes mostra uma aparência vermelho-tijolo (com uma possível zona circundante de bile precipitada) e são bastonetes gram negativos (Cocos-Bacilos), a amostra vai de encontro aos requisitos do teste com relação à ausência de *Escherichia coli*.

10 3. Se as colônias combinam com essa descrição, transferir as mesmas para meio de agar Levine-Eosin-Methylene Blue. Cobrir os discos, inverter e incubar a 30°-35°C durante 24-48 horas. Se nenhuma das colônias exibe as características de um brilho metálico sob a luz refletida e aparência azul-preta sob luz transmitida, a amostra vai de encontro aos requisitos do teste com relação à ausência de *Escherichia coli*.

15 **Fórmulas de meio**

1. **Tampão de fosfato**, pH de 7,2

a) Solução de estoque: fosfato de potássio monobásico 34,0 g; Água (destilada ou desionizada) 1000 mL; Hidróxido de sódio TS 175 mL. Dissolver 34 gramas de potássio monobásico; fosfato em cerca de 500 mL
20 de água contido em um frasco volumétrico de 1000 mL. Ajustar para pH de 7,1-7,3 através da adição de Hidróxido de sódio TS (cerca de 175 mL), adicionar água até volume e misturar. Esterilizar e armazenar sob refrigeração (2°-8°C) até uso.

b) Solução de trabalho. Para uso, diluir a solução de estoque
25 com água em uma proporção de 1 a 800 e esterilizar.

2. **TSA** (Agar de tripticase de soja/agar de digestão de soja com caseína). Digestão pancreática de caseína 15,0 g; digestão com papaína de farinha de soja 5,0 g; Cloreto de sódio 5,0 g; Agar 15,0 g; Água 1000 mL; pH após esterilização: 7,3 ± 0,2.

30 3. **TSB** (Caldo de tripticase de soja/caldo de digestão de caseína de soja). Digestão pancreática de caseína 17,0 g; digestão com papaína de farinha de soja 5,0 g; Cloreto de sódio 5,0 g; fosfato de sódio dibásico 2,5 g;

Dextrose 2,5 g; Água 1000 mL; pH após esterilização: $7,3 \pm 0,2$;

4. **SDA** (Agar de dextrose de Sabouraud); Dextrose 40 g; Mistura de partes iguais de digestão péptica de tecido animal e digestão pancreática de caseína 10,0 g; Agar 15,0 g; Água 1000 mL; misturar e levar à ebulição para obter uma solução; pH após esterilização: $5,6 \pm 0,2$,

5. **FLM (meio de lactose fluido)**. Extrato de carne 3,0 g; digestão pancreática de Gelatina 5,0 g; Lactose 5,0 g; Água 1000 mL; Esfriar tão rapidamente quanto possível após esterilização. pH após esterilização: $7,1 \pm 0,2$.

10 **Exemplo 50 – Análise de Gel de Focalização Isoelétrica de CTLA4-Ig**

A finalidade desse exemplo é determinar o ponto isoelétrico, número de isoformas e micro heterogeneidade de CTLA4-Ig.

Materiais

15 Kit de Calibração IEF (pH de 3 a 10), (Amersham Pharmacia, Catálogo No. 17-0471-01) ou (pH de 2,5 a 6,5), (Amersham Pharmacia, Catálogo No. 17-0472-01).

Ampholine PAGplate gel: pH de 4,0 a 6,5, (Amersham Pharmacia, Catálogo No. 80-1124-81).

20 Aplicadores de amostra de IEF (Amersham Pharmacia, Catálogo No. 80-1129-46).

Tiras de eletrodo de IEF (Amersham Pharmacia, Catálogo No. 80-1104-40).

Ácido fosfórico (85%), (EMD, Catálogo No. PX0995-6).

Equipamento

25 Multiphor II Electrophoresis System, (GE Healthcare, Catálogo No. 18-1018-06).

Preparo de Reagentes

30 Solução Tampão de Anodo (ácido glutâmico a 0,1 M em ácido fosfórico a 0,5 M) (pavios embebidos com a mesma são colocados sobre o lado (+) do esfregaço).

Exemplo:

3,4 mL de ácido fosfórico a 85%

1,47 g de ácido glutâmico a \pm 0,02 g

Água com grau para HPLC

5 Combinar os reagentes acima em um cilindro graduado de 100 mL, compondo até 100 mL com água com grau para HPLC, tampar e inverter várias vezes para misturar.

Armazenar a solução a 2-8 °C durante até seis meses.

Solução Tampão de Catodo (α -alanina a 0,1 M) (pavios embebidos com a mesma são colocados sobre o lado (-) do esfregaço).

Exemplo:

10 0,9 g de α -alanina a \pm 0,02 g

Água com grau para HPLC.

15 Combinar os reagentes acima em um cilindro graduado de 100 mL, compondo até 100 mL com água com grau para HPLC, tampar e inverter várias vezes para misturar.

Armazenar a solução a 2-8 °C durante seis meses.

Solução de Fixação (ácido 5-sulfo-salicílico a 3,5% em ácido tricloroacético a 12%).

Exemplo:

20 240 g de ácido tricloroacético a \pm 5,0 g

70 g de ácido 5-sulfo-salicílico a \pm 2,0 g

2000 mL de água para HPLC

25 Combinar os reagentes acima para compor um volume de 2000 mL.

Armazenar a solução em temperatura ambiente durante até três meses.

Solução de coloração:

Misturar a solução GelCode Blue Reagent imediatamente antes de uso invertendo gentilmente e agitando a garrafa várias vezes.

30 **Nota:** É importante misturar o reagente de coloração antes de entornar ou distribuir para assegurar que uma amostra de reagente homogênea de usada.

Preparo de Controle de Coloração:

Reconstituir a Anidrase Carbônica II com água com grau para HPLC para fazer uma solução de estoque a 1,0 mg/mL.

5 10 mL de solução de estoque são combinados com 90 mL de água com grau para HPLC para proporcionar uma solução de trabalho a 0,10 µg/mL.

carregar 10 mL da solução a 0,10 µg/mL sobre o gel (carga de 1,0 µg).

Procedimento**10 Diluição de amostra**

Preparar uma solução de amostra a 20 µg/mL e material de referência em água para HPLC.

Concentração desejada (2 µg/mL)

x 200 mL = µl de amostra adicionado até um volume final de 200 µl

15 Concentração de amostra (50 µg/mL)

Exemplo:

2 µg/mL

x 200 mL = 0,04 x 200 µl = 8 µl de amostra (adicionar 192 µl de água H-PLC)

20 50 µg/mL**Aparelho e Preparo de Gel**

Conectar a placa de resfriamento da unidade de eletroforese Multiphore II ao Circulador Termostático e ajustar a temperatura a 10 °C ± 2 °C.

25 **Nota:** Deixar o circulador pelo menos 20 minutos para atingir a temperatura acima.

Remover o gel do refrigerador. Cortar cuidadosamente ao longo dos lados do envelope, certificando-se de não cortar o gel/suporte de gel.

30 Adicionar aproximadamente 1,0 mL de água com grau para H-PLC a uma borda da plataforma de resfriamento.

Colocar uma borda do gel/suporte de gel na água de modo que a ação capilar transporte a água através de toda a borda do gel. Lentamen-

te, certificar-se de que bolhas de ar não estão encerradas, aplicar o gel através da plataforma de resfriamento. Água com grau para HPLC adicional pode ser aplicada se necessário.

Remover o filme transparente da superfície do gel.

- 5 Embeber um eletrodo com Solução Tampão de Anodo e colocar sobre a borda do gel mais próxima das marcações (+) da plataforma de resfriamento.

- 10 Embeber um eletrodo na Solução Tampão de Catodo e colocar sobre o outro lado do gel, o qual está mais próximo das marcações (-) sobre a placa de resfriamento.

Após as tiras de eletrodo terem sido aplicadas, cortar cuidadosamente o excesso usando uma lâmina de barbear nova, de modo que as tiras terminam na borda do gel e não no suporte de gel.

- 15 Aplicar pedaços de aplicação de amostra sobre as marcações (-) do lado mais próximo sobre a plataforma de resfriamento, certificando-se de que há bom contato entre os pedaços de aplicação de amostra e o gel.

- 20 **Nota:** Certificar-se de que os aplicadores de amostra de IEF não tocam a tira embebida com tampão de catodo, não vazam para o tampão de catodo e estejam suficientemente separadas para assegurar que cada amostra ocorre separadamente. Um aplicador de amostra deverá estar firmemente colocado sobre o pedaço de gel.

- 25 Colocar o prendedor de eletrodo da unidade Multiphor II e alinhar os eletrodos ao longo do centro dos cabos de eletrodo sobre o gel. Conectar os dois eletrodos do prendedor de eletrodo à unidade de base e colocar a tampa de segurança em posição. Usando fita adesiva, cobrir os orifícios na tampa de segurança para impedir o gel de secar. Conectar os eletrodos ao suprimento de energia. Pré-focalizar o gel com o conjunto de suprimento de energia nos ajustes abaixo, até a tensão atingir $\square 300V$.

Tabela 1. Ajustes de suprimento de energia para géis de IEF pré-foco

Parâmetros de operação	Ajuste
Tensão (parâmetro variável)	2000 volts no máximo
Corrente (parâmetro constante)	25 mAmps
Energia (parâmetro constante)	25 watts

Carregamento de gel

Após o gel ter sido pré-focalizado, desligar o suprimento de energia, remover a tampa de segurança, desconectar os eletrodos e remover o prendedor de eletrodo da unidade Multiphor II.

Carregar as amostras sobre aplicadores de amostra em uma seqüência específica. Para esse procedimento, certifique-se de que a tira de tampão de catodo (-) está próxima do analista.

As amostras são carregadas da direita para a esquerda. Primeiro, fazer duas ou mais aplicações dos padrões de calibração de IEF (fileiras 1 & 2), uma do material de referência (fileira 3), uma da amostra de teste #1 (fileira 4), uma do preparado de controle de calibração (fileira 5), uma de amostra de teste #2 (fileira 6), uma do material de referência (fileira 7) e uma do padrão de calibração de IEF (fileira 8).

Adicionar as terceira e quarta amostras aplicando uma aplicação de material de referência (fileira 9), uma aplicação de amostra de teste #3 (fileira 10), uma aplicação do reparo de controle de coloração (fileira 11), uma aplicação de amostra de teste #4 (fileira 12), uma aplicação de material de referência (fileira 13) e uma aplicação de padrão de calibração de IEF (fileira 14). As quinta e sexta amostras são aplicadas repetindo o mesmo padrão que as amostras 3 e 4, usando as fileiras 15 a 20. O padrão de carregamento de amostra é mostrado na Tabela 2.

Tabela 2. Diluição de amostra e padrão de carregamento de gel

Fileira	Descrição	($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	(μL)	Carga de proteína (μg)
1	Marcador de pI de IEF*	-	10	-
2	Marcador de pI de IEF	-	10	-
3	Material de Referência	2,0	10	20
4	Amostra 1	2,0	10	20
5	Controle de coloração	0,10	10	1,0
6	Amostra 2	2,0	10	20
7	Material de Referência	2,0	10	20
8	Marcador de pI de IEF	-	10	-
9	Material de Referência	2,0	10	20
10	Amostra 3	2,0	10	20
11	Controle de coloração	0,10	10	1,0
12	Amostra 4	2,0	10	20
13	Material de Referência	2,0	10	20
14	Marcador de pI de IEF	-	10	-
15	Material de Referência	2,0	10	20
16	Amostra 5	2,0	10	20
17	Controle de coloração	0,10	10	1,0
18	Amostra 6	2,0	10	20
19	Material de Referência	2,0	10	20
20	Marcador de pI de IEF	-	10	-

- Eletroforese.** Quando o gel está carregado, colocar o prendedor de eletrodo da unidade Multiphor II e alinhar os eletrodos ao longo do centro dos cabos de eletrodo sobre o gel. Conectar os dois eletrodos do prendedor de eletrodo à unidade de base e colocar a tampa de segurança em posição. Usando uma fita adesiva, cobrir os orifícios na tampa de segurança para impedir o gel de secar. Conectar os eletrodos ao suprimento de energia. Ajustar tensão, corrente e energia apropriados e começar a operação.
- 10 **Tabela 3. Ajustes de suprimento de energia para operação dos géis de IEF**

Parâmetros de operação	Ajuste
Tensão (parâmetro variável)	2000 volts no máximo
Corrente (parâmetro constante)	25 mAmps
Energia (parâmetro constante)	25 watts
Tempo (parâmetro constante)	2,5 horas

Após o gel ter sido operado, desligar o suprimento de energia,

remover a tampa de segurança, desconectar os eletrodos e remover o prendedor de eletrodo da unidade Multiphor II. Remover cuidadosamente os cabos de eletrodo e aplicadores de amostra do gel.

Nota: *Você pode colocar o gel de esfregação diretamente em solução de fixação e deixar os cabos de eletrodo e peças de aplicação flutuar do gel.*

5
10
Remover o gel/suporte de gel da lâmina de resfriamento e colocar em um disco plano contendo um volume suficiente de solução de fixação (etapa 3.3) para manter o gel úmido. Cobrir com um envoltório plástico e colocar sobre uma plataforma orbital e incubar 20 – 60 minutos. Registrar os tempos inicial e final sobre a planilha de IEF.

NOTA: *Géis de IEF deixados em fixador muito tempo algumas vezes delaminam. Isso é evitado limitando o tempo de fixação para aproximadamente uma hora.*

4.5 Coloração do gel

15
Após fixação, enxaguar o gel 3 x 5 minutos com um volume suficiente de água com grau para HPLC para manter o gel úmido. Registrar os tempos inicial e final sobre a planilha de IEF.

20
Após mistura da solução de Reagente de Coloração GelCode Blue antes de uso (etapa 3.4), colocar o gel em um volume suficiente de corrente para manter o gel úmido. Incubar 15 □ 24 horas em um recipiente hermeticamente vedado para impedir evaporação de reagente. Registrar os tempos inicial e final sobre a planilha de IEF.

25
Géis corados são descorados substituindo a Solução de Coloração por água com grau para HPLC. Enxaguar o gel com pelo menos três trocas de água durante um período de 1-2 horas. Registrar os tempos inicial e final sobre a planilha de IEF. Após descoloração, o gel está pronto para exploração.

Nota: *Lavagens adicionais podem ser requeridas para reduzir a coloração de base sobre o gel de IEF.*

30 Adequabilidade de sistema

Padrões de focalização isoelétrica deverão ser facilmente distinguidos da base. Padrões de proteína que migram para valores de pI entre

4,0 e 6,5 são visíveis sobre o gel. Padrões de proteína com pls que estão fora dessa faixa não são visíveis sobre o gel. Os marcadores de pl a 3,50, 4,55, 5,20 e 5,85 são identificados e rotulados sobre a imagem do gel.

Tabela 4: Componentes dos padrões de calibração IEF

Padrão de proteína	pl
Tripsinogênio	9,30
Banda básica de lectina de lentilha	8,65
Banda mediana de lectina de lentilha	8,45
Banda ácida de lectina de lentilha	8,15
Banda básica de mioglobina	7,35
Banda ácida de mioglobina	6,85
Anidrase carbônica B humana	6,55
Anidrase carbônica B bovina	5,85
□-lactoglobulina A	5,20
Inibidor de tripsina de soja	4,55
Aminoglicosídeo	3,50

- 5 Um controle de coloração de padrão de anidrase carbônica II (pl de 5,4) em um baixo nível de carregamento de proteína (1,0 □g) é usado para visualização da consistência de coloração do gel. Essa banda deve ser facilmente distinguida da base através de inspeção visual da imagem de gel explorada.
- 10 O material de referência de CTLA4-Ig deverá ser enumerado a 10-22 bandas dentro da faixa de pl de 4,3 a 5,6.
- A intensidade cumulativa percentual das principais bandas proeminentes de material de referência de CTLA4-Ig deverá estar □90% dentro da faixa de pl de 4,3 a 5,3.
- 15 Para o material de referência, confirmar através de inspeção visual que existem três bandas principais focalizadas entre os marcadores de pl de 4,5 - 5,2 (veja Figura para o padrão das bandas principais).

Exploração e análise de gel

Após eletroforese e coloração, todos os géis são explorados u-

sando um densitômetro. Os arquivos de imagem são armazenados sobre o disco rígido/network local do computador e arquivados via a network de área local. A análise das imagens de gel exploradas é realizada usando o software ImageQuant TL (v2003.03). Os parâmetros de exploração e análise são listados na Tabela 5. As explorações são geradas e quantificadas usando os procedimentos do departamento.

Tabela 5 – Parâmetros de exploração e análise de gel

Parâmetros de exploração	Ajuste
Tamanho de pixel de exploração	100
Resolução digital de exploração	12 bits
Parâmetros de detecção de banda	
Declínio mínimo	Inicial 100
Redução de interferência	Inicial 10
Pico máximo %	Inicial 0
Largura % de fileira	Ajustar a 90%

Nota: Os procedimentos acima proporcionam etapas básicas para a análise de imagens de gel. Os parâmetros de exploração na Tabela são definidos. Os parâmetros de detecção de banda na Tabela são ajustes iniciais sugeridos. Ajuste dos parâmetros de detecção de banda pode ser necessário para identificar precisamente bandas em virtude de alterações físicas do gel (tal como encolhimento do gel após coloração/descoloração) e alteração do formato e desvio de banda do gel. Corrigir manualmente quaisquer bandas que faltam ou erroneamente identificadas.

Explorar os géis usando os parâmetros de exploração definidos na Tabela. Toda a análise e avaliações do gel deverão ser feitas a partir da imagem explorada. Abrir um arquivo de imagem (dados brutos explorados) de <1D Gel Analysis> no ImageQuantTL. Ir para <Contrast> na barra de ferramentas e diminuir o parâmetro <Image Histogram> até que todas as bandas estejam claramente visíveis. Selecionar <Lane Creation> e escolher <Manual> para ajustar <Number of Lanes> a ser analisado. Ajustar <Lane % Width> para 100% para cobrir as fileiras de gel. Alinhar apropriadamente fileiras únicas se necessário. Usar o método <Rolling Ball> para subtrair a base. Detectar bandas usando os ajustes iniciais <Minimum Slope>, <Noise Reduction>, <%Maximum Peak> listados na Tabela 3. Ajuste desses

valores é necessário para identificar precisamente as bandas. Computar o valor de pI de banda usando o marcador de pI padrão dos marcadores rotulados listados na Seção Adequabilidade de Sistema para o gel com pH/pI de 4,0-6,5. Pular as etapas de calibração e normalização. Enumerar o número de bandas dentro da faixa de pI de 4,3 a 5,6. Exportar os resultados na planilha do Excel para documentação e relatório adicionais.

Cálculo da Intensidade Cumulativa Percentual de Amostras Com relação ao Material de referência.

Nota: A intensidade cumulativa percentual para a amostra é o percentual de bandas que migram dentro da faixa de pI de 4,3-5,3, quando comparado com 100% de todas as bandas presentes na fileira. A seguinte equação deverá ser usada para o cálculo da intensidade cumulativa percentual de amostras com relação ao material de referência:

$$\text{Percentual relativo amostra (\%)} = \frac{\text{Intensidade de Banda \% de amostra (pI de 4,3-5,3)}}{\text{Intensidade de banda \% relativa (pI de 4,3-5,3)}} \times 100$$

Nota: Refira-se ao padrão de carregamento de gel; o material de referência próximo a uma amostra deverá ser usado para o cálculo. Se o material de referência tem um valor cumulativo de 100% e a amostra tem um valor de 95%, o percentual relativo da amostra é $95/100 \times 100 = 95\%$. Se a referência tem um valor cumulativo de 95% e a amostra tem um valor de 100%, o percentual relativo da amostra é $100/95 \times 100 = 105\%$.

20 Reportagem de resultados

Reportar o número de bandas enumerados dentro da faixa de pI de 4,3 – 5,6. Reportar a intensidade cumulativa percentual com relação àquela do material de referência de CTLA4-Ig dentro da faixa de pI de 4,3 – 5,3 (veja Figura para um exemplo de como reportar a análise de gel IEF quantitativa definida nesse método). Confirmar através de inspeção visual que existem três bandas principais focalizadas entre os marcadores de pI 4,5 – 5,2 com relação ao material de referência (veja Figura 1 para o padrão de bandas principais) e reportar o número de bandas principais observado dentro dos marcadores de pI 4,5 - 5,2. Confirmar, através de inspeção visu-

al, que não existem mais novas bandas significativas entre os marcadores de pI 4,5 - 5,2 com relação ao material de referência.

Em determinadas modalidades, os resultados desse método mostrarão bandas em uma faixa de pI de 4,3- 5,6 ou 4,3 - 5,3, sendo identificadas de 10 a 22 bandas, com a intensidade de banda cumulativa de 90 - 110%. Em outra modalidade, a faixa de pI é de 4,5 - 5,2 com 3 bandas principais. Em outra modalidade, a faixa de pI é 4,3- 5,6 com 10 a 22 bandas. Em outra modalidade, a faixa de pI é 4,3 - 5,3 com uma intensidade de banda cumulativa de 95 - 105%. Em outra modalidade, a faixa de pI é de 4,5 - 5,2 com 2 bandas proeminentes.

Exemplo 51: SDS-PAGE de CTLA4-Ig

O exemplo mostra o exame de CTLA4-Ig sob condições reduzidas e não-reduzidas através de SDS-PAGE.

Materiais

15 2X Tampão de Amostra de Tris-Glicina (Tris-Gly) SDS (Invitrogen, Catálogo No. LC2676).

10X Agente de Redução de Amostra "NuPAGE" (Invitrogen, Catálogo No. NP0004).

20 Gel de Tris-glicina a 4-20% - cavidades de 1,0 mm x 12 (Invitrogen, Catálogo No. EC60252BOX).

10X tampão de Operação de Tris-Glicina SDS (Invitrogen, Catálogo No. LC2675).

Padrão Não Corado de Faixa Ampla Mark12TM (Invitrogen, Catálogo No. LC5677).

25 Reagente de Coloração GelCode Blue (Azul Coomassie), (Pierce, Catálogo No. 24590: 500 mL; Catálogo No. 24592: 3,5 L).

Kit SilverSnap® Stain II (coloração com prata) (Pierce, Catálogo No. 24612).

Instrumentação:

30 Xcell SureLock Mini Cell (Invitrogen, Catálogo No. EI0001).

Suprimento de energia para eletroforese (OWL Separation Systems, Catálogo No. OSP-

300).

Reagentes:

Solução de fixação para corante Azul Coomassie (metanol a 50% e ácido acético a 7% em água com grau para HPLC).

5 **Exemplo:**

A um recipiente graduado de tamanho apropriado contendo uma barra de agitação:

Adicionar 500 mL de Metanol.

Adicionar 70 mL de Ácido acético.

10 Ajustar o volume para 1000 mL com água com grau para HPLC.

Armazenar em temperatura ambiente durante até seis meses.

15 Corante azul Coomassie (GelCode Blue). Usar retificação do recipiente. Adicionar quantidade suficiente para cobrir o gel, aproximadamente 50 mL para um mini gel (10 x 10 cm) em uma pequena bandeja. Armazenar a 2-8 °C durante até um ano.

Solução de Fixação de Corante de Prata (etanol a 30% e ácido acético a 10% em água com grau para HPLC). A um recipiente graduado de tamanho apropriado contendo uma barra de agitação: Adicionar 300 mL de Etanol. Adicionar 100 mL de Ácido acético. Ajustar o volume para 20 1000 mL com água com grau para HPLC. Misturar solução e armazenar a solução em temperatura ambiente durante até seis meses.

Solução de Lavagem de gel (etanol a 10%). A um tubo para centrífuga de 50 mL: Adicionar 1,0 mL de Intensificador (Kit de Coloração com Prata). Adicionar 50 mL de Corante de Prata (Kit de Coloração com 25 Prata). Tampar o tubo e misturar através de leve turbilhamento durante 3 a 5 segundos.

Solução de Trabalho de Revelador. Preparar imediatamente antes de uso. A um tubo para centrífuga de 50 mL: Adicionar 1 mL de Intensificador (Kit de Coloração com Prata). Adicionar 50 mL de Revelador (Kit de 30 Coloração com Prata). Tampar o tubo e misturar através de leve turbilhamento durante 3 a 5 segundos.

1X tampão de Operação de Tris-Glicina SDS. Preparar no dia

de uso. A um cilindro graduado: Adicionar 900 mL de água com grau para HPLC. Adicionar 100 mL de 10X tampão de Operação de Tris-Glicina-SDS. Combinar os reagentes acima, cobrir com parafilme e inverter várias vezes para misturar.

- 5 **Controle de Coloração.** Adicionar 1 mL de água com grau para HPLC a um frasco contendo 2 mg de inibidor de Tripsina (controle de coloração). Isso proporcionará uma solução de estoque a 2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ estável durante seis meses a -200 C. Para impedir degradação em virtude numerosos ciclos de congelamento/descongelamento, transferir alíquotas de 50 μL para pequenos tubos e armazenar a -200 C. Adicionar 25 μL de solução de estoque a 75 μL de água com grau para HPLC a fim de proporcionar uma solução a 0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Adicionar 40 μL da solução a 0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ a 160 μL de água com grau para HPLC a fim de proporcionar uma concentração de 0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Adicionar 10 μL da solução a 0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 50 μL de 2X tampão de Amostra de TrisGly e 40 μL de água com grau para HPLC a um tubo para microcentrífuga. A concentração final do controle de coloração de inibidor de Tripsina é de 0,01 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Amostras analisadas quanto à liberação e coradas com Azul Coomassie são carregadas em uma concentração de 10 mg por 10 μL .

- 20 Para géis com Azul Coomassie, diluir o Material de referência e amostra em água com grau para HPLC para uma concentração de 10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Exemplo: Adicionar 80 μL de uma solução de amostra de Material de Referência a 50 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ + 320 μL de água com grau para HPLC. Para **Amostras não-reduzidas**, adicionar 10 μL da solução concentrada a 10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ a 50 μL de 2X tampão de Amostra de Tris-Gly e 40 μL de água com grau para HPLC em um tubo para microcentrífuga. Para as **Amostras reduzidas**, adicionar 10 μL da solução a 10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ a 50 μL de 2X tampão de Amostra de Tris-Gly, 30 μL de água com grau para HPLC e 10 μL de 10X Agente de Redução. Para géis corados com prata, diluir ainda uma solução a 10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ para 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ em água com grau para HPLC. Exemplo: Adicionar 40 μL de solução a 10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ + 360 μL de água com grau para HPLC. Para **Amostras não-reduzidas**, adicionar 10 μL da solução a 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ a 50 μL de 2X tampão de Amostra de Tris-Gly e 40 μL de água com grau para

HPLC em um tubo para microcentrífuga. Para as **Amostras reduzidas**, adicionar 10 μ L da solução a 1 μ g/ μ L, 50 μ L de 2X tampão de Amostra de Tris-Gly, 30 μ L de água com grau para HPLC e 10 μ L de 10X Agente de Redução a um tubo para microcentrífuga. Para o placebo, combinar 50 μ L de 2X tampão de Amostra de Tris-Gly e 50 μ L de água com grau para HPLC em um tubo para microcentrífuga.

Tabela 6: A faixa de peso molecular (kDa) para bandas esperadas de proteína mínima que podem estar presentes em amostras de abatacept reduzidas e não-reduzidas

Descrição de banda(s)	Não-reduzida (kDa)	Reduzida (kDa)
Banda(s) mínima(s)	NA	15-45
Banda(s) mínima(s)	30-70	NA
Banda(s) mínima(s)	NA	80-155
Banda(s) mínima(s)	175-230	175-200

10 Remover o(s) gel(eis) de sua embalagem e enxaguar o exterior com água com grau para HPLC para remover pedaços de poliacrilamida. Remover cuidadosamente o pente da cavidade certificando-se de que as cavidades estão retificadas com uma ponteira de carregamento de gel se necessário. Encher as cavidades com água com grau para HPLC e sacudir de modo que a água seja removida das cavidades. Repetir o enxágüe das
15 cavidades mais duas vezes.

5.2 Inserir os géis no aparelho XCell de modo que a face curta da lâmina faça a câmara interna. Se apenas um gel está sendo usado, inserir uma lâmina de Plexiglass sobre o lado oposto. Cunhar o(s) gel(eis) hermeticamente, formando uma câmara interna e uma externa. Encher a câmara interna com 1X tampão de Operação de Tris-Glicina SDS. Verificar quanto a vazamentos, então, encher a câmara externa com 1X tampão de Operação de Tris-Glicina SDS. Todos os géis devem conter pelo menos uma fileira com Placebo e uma fileira com marcador de peso molecular. Adicionar
20 um Controle de Coloração para géis corados com Azul Coomassie apenas. Usar ponteiras de carregamento de gel. Carregar pelo menos um "Placebo"

entre as amostras reduzidas e não-reduzidas. Tratar os marcadores de peso molecular como amostra reduzida. Isso ajudará a prevenir a redução das amostras não-reduzidas em virtude de carregamento de agente de redução. Prender a parte de cima do aparelho Xcell e conectar os eletrodos ao suprimento de energia. Ajustar a corrente para 25 mAmps por gel e ajustar a tensão (v) e energia (w) para o máximo. Se operando dois géis, ajustar a corrente para 50 mAmps. Ajustar a corrente quando operando dois géis em um aparelho ou múltiplos aparelhos Xcell sobre o mesmo suprimento de energia. Submeter à eletroforese durante 60 ± 5 minutos ou até que a frente de tampão se mova pelo menos 80% da distância de migração disponível. Registrar o tempo de início e tempo de término sobre a planilha. Separar cuidadosamente duas lâminas plásticas contendo o gel separando com uma faca para gel. Após separação do gel, seguir o procedimento para coloração.

Coloração com Azul Coomassie - Colocar o gel em 50 mL de solução de Fixação Azul Coomassie (metanol a 50% e ácido acético a 7%) durante 15 minutos. Enxaguar o gel 3 vezes com ~100 mL de água com grau para HPLC durante 5 minutos, durante um total de 15 minutos. Adicionar o corante Azul Coomassie diretamente ao(s) gel(eis) e incubar durante 15 a 24 horas. Os géis corados são descorados substituindo o reagente de coloração Azul Coomassie por 100 mL de água com grau para HPLC. Após 1 hora de descoloração, o gel está pronto para exploração.

Exploração e análise de gel. Após eletroforese e coloração, os géis são explorados usando um densitômetro. Os arquivos de imagem são armazenados no disco rígido do computador e/ou rede e arquivados via a network de área local. A análise das imagens de gel exploradas é realizada usando o software ImageQuant TL (v2003.03). As explorações são geradas e quantificadas usando os procedimentos do departamento.

Tabela 4: Parâmetros de exploração e análise de gel

Parâmetros de exploração	Ajuste
Tamanho de pixel de exploração	100
Resolução digital de exploração	12 bits
Parâmetros de detecção de banda	
Declínio mínimo	Inicial 100
Redução de interferência	Inicial 10
Pico máximo %	Inicial 0
Largura % de fileira	Ajustar a 90%

Através de inspeção visual, a principal banda de CTLA4-Ig reduzida deve aparecer como uma banda ampla que migra para uma posição proximal ao marcador de peso molecular de 55.400 Da (dehidrogenase glutâmica).

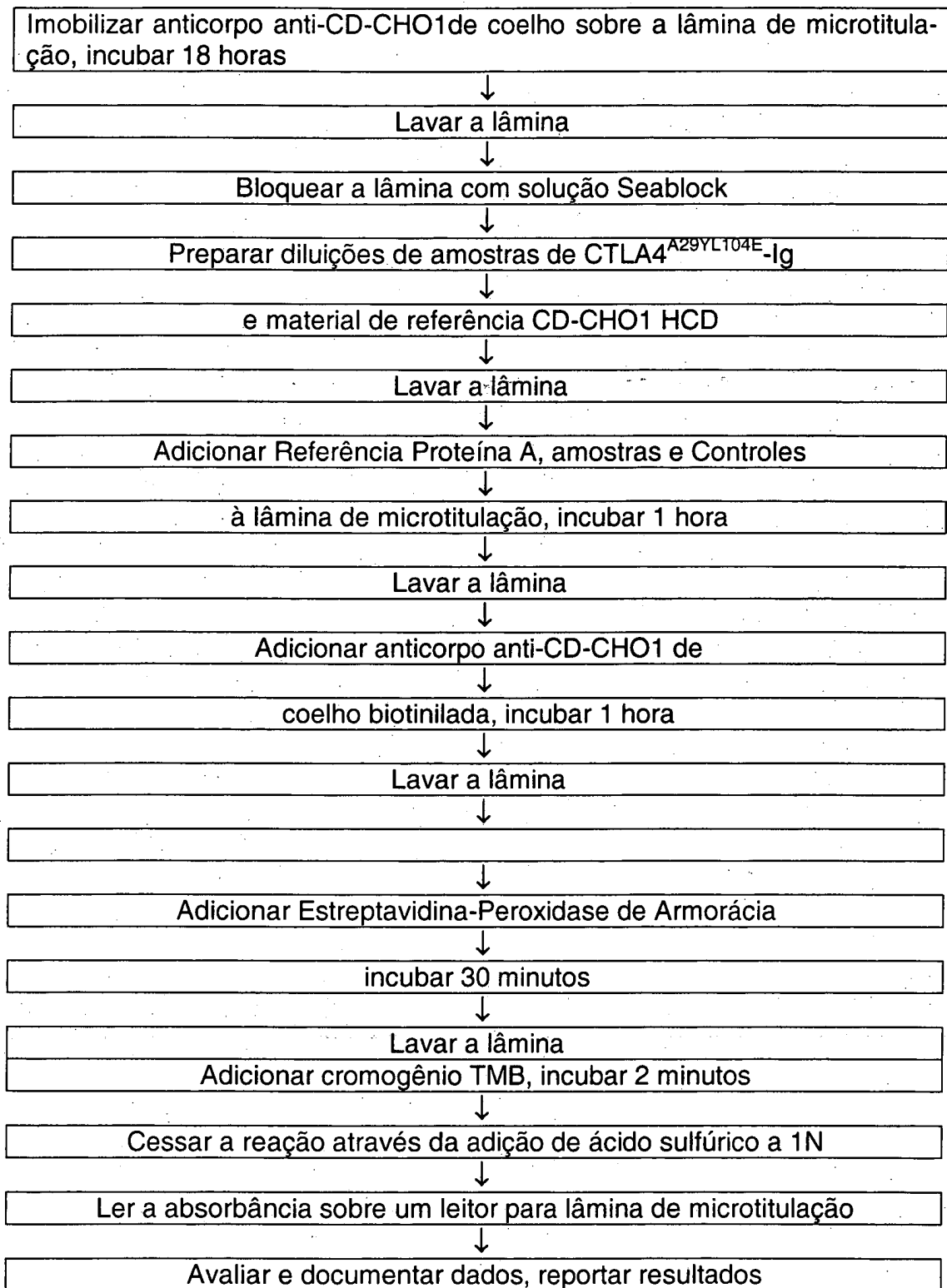
Exemplo 52 - DETERMINAÇÃO DE IMPUREZAS DE PROTEÍNA EM CÉLULAS HOSPEDEIRAS DE OVÁRIO DE HÂMSTER CHINÊS (CHO) EM SUBSTÂNCIA DE FÁRMACO DE CTLA4^{A29YL104E}-Ig ATRAVÉS DE ELISA

Esse exemplo descreve um ensaio imunoabsorvente enzimático (ELISA) para quantificar os níveis de contaminação de proteína residual CD-CHO1 de células hospedeiras (HCP) em amostras de teste. Uma IgG anti-CD CHO1 HCP policlonal de coelho é primeiro revestida sobre a lâmina de microtitulação. Amostras de padrões de referência de HCP, controles de qualidade e Substância de Fármaco CTLA4^{A29YL104E}-Ig são incubadas com a IgG anti-CD CHO1 HCP de coelho ligada. Após lavagem das lâminas de microtitulação, o anticorpo de IgG anti-CD CHO1 HCP de coelho policlonal/Biotina é adicionado, o qual se liga ao HCP capturado durante a etapa inicial. As lâminas de microtitulação são lavadas para remover quaisquer anticorpos policlonais não ligados. Estreptavidina-peroxidase de armadilha é adicionada e as lâminas de microtitulação são novamente lavadas para remover quaisquer anticorpos conjugados não ligados. Cromogênio TMB é, então, adicionado para proporcionar uma reação colorimétrica. A reação é terminada com ácido sulfúrico e a absorbância é medida a 450 nm em um leitor para microlâmina com 96 cavidades. A cor se desenvolve em proporção à quantidade HCP capturado. As concentrações de amostra são

determinadas baseado em uma curva padrão gerada através de plotagem da absorbância versus concentração de HCP na faixa de 4,11 ng/mL a 3000 ng/mL.

A linhagem de células de Ovário de Hâmster Chinês (CHO) (DG44) é usada na produção de CTLA4^{A29YL104E}-Ig. Para a produção de proteína CD-CHO1 (HCP), células DG44 foram estavelmente transfectadas com o vetor recombinante pD16 e crescidas em meio CD-CHO1 suplementado com galactose e Recombulina. Os anticorpos policlonais para essa versão do ELISA foram gerados em coelhos brancos New Zealand imunizados com um concentrado de material CD-CHO1 HCP. Anticorpos de coelho foram purificados por afinidade (Proteína A), então, submetidos à diálise em solução salina tamponada com fosfato e concentrados. Aproximadamente 50 mg da fração de IgG de anticorpo anti-CD-CHO1 de coelho foi biotiniado usando química com N-hidróxi-sulfo-succinimida éster. O anticorpo anti-CHO1 de coelho não modificado é usado para revestir lâminas de microtitulação com 96 cavidades. Ele captura CD-CHO1 HCP, o qual é detectado pelos anticorpos anti-CD-CHO1 de coelho biotiniado. O conjugado de Estreptavidina/Peroxidase de Armorácia se liga à biotina e uma reação colorimétrica com cromogênio TMB é usada para quantificar CD-CHO1 HCP.

Esse método é projetado para determinar quantitativamente os níveis residuais de proteína CD-CHO1 em células hospedeiras através de ELISA para testagem de liberação de material de Substância de Fármaco de CTLA4^{A29YL104E}-Ig.

ESBOÇO DO MÉTODO

Anticorpo anti-CD-CHO1 de coelho é biotinilado usando um kit de biotinilação com haxanoato de sulfo-succinimidila-6 (biotinamido) como reagente de biotinilação. O reagente de biotinilação da PIERCE (produto #

21335) com Sulfo-NHS-LC-Biotina pode ser usado. O anticorpo é rotulado de acordo com as recomendações do fabricante no manual fornecido com o reagente de biotilação. Após rotulação e separação sobre a coluna de exclusão de tamanho, a incorporação de biotina é determinada e a amostra é congelada em alíquotas de 50 μ L em ou abaixo de -70°C . A proporção de biotina/IgG do produto final deverá estar entre 2 e 4. Armazenar em ou abaixo de -70°C .

Revestimento da lâmina. Preparar uma solução a 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de anti-CD-CHO1 HCP purificada de coelho em Tampão de Carbonato a ser usado para o revestimento de lâminas de microtitulação (12 mL de solução são requeridos por lâmina de microtitulação). Adicionar 100 μL dessa solução a cada cavidade de uma lâmina de microtitulação Immulon 4 usando uma pipeta com múltiplos canais calibrada. Cobrir a lâmina de microtitulação com parafilme e incubar a 4°C durante 18 \pm 2 horas.

Lavagem e Bloqueio de lâmina. Lavar a lâmina três vezes com Tampão de Lavagem usando um instrumento para lavagem de lâminas. Adicionar 300 μL de SeaBlock a cada cavidade usando uma pipeta com múltiplos canais calibrada. Incubar a lâmina durante 1 hora a $22,5 \pm 5^{\circ}\text{C}$. Preparar concentrações de Padrões de referência de proteína CD-CHO1 e Amostras de controle de qualidade em tubos de polipropileno estéreis graduados de 15 mL. Diluir as amostras de Material de referência e controle de qualidade usando Diluente Teknova (1,21). A concentração de padrão é preparada no dia do experimento nas concentrações listadas no exemplo abaixo:

Diluições para Amostras de Curva Padrão (Exemplo para Preparo Diário)

A concentração de estoque de proteína CD-CHO1 é de 5,7 mg/mL.

Diluição A:

26,3 μL (5,7 mg/mL) + 4,973 mL PTB Diluente = 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$

Diluição B:

0,6 mL (30 $\mu\text{g}/\text{mL}$) + 5,4 mL de Diluente = 3000 ng/mL

	2 mL (3000 ng/mL) + 4 mL de Diluente	1000 ng/mL
	2 mL (1000 ng/mL) + 4 mL de Diluente	333,3 ng/mL
	2 mL (333,3 ng/mL) + 4 mL de Diluente	111,1 ng/mL
	2 mL (111,1 ng/mL) + 4 mL de Diluente	37,0 ng/mL
5	2 mL (37,0 ng/mL) + 4 mL de Diluente	12,3 ng/mL
	2 mL (12,3 ng/mL) + 4 mL de Diluente	4,11 ng/mL
	0 + 4 mL de Diluente	0 ng/mL

Análise de Concentração, Armazenamento e Expiração de QC

10 Amostras de Controle de Qualidade (QC) em três concentrações alvo diferentes (25, 100 e 700 ng/mL) são preparadas e usadas frescas no dia de análise ou preparadas em maiores quantidades e armazenadas congeladas em alíquotas em ou abaixo -70°C. Alíquotas congeladas são analisadas em três experimentos independentes. O resultado médio calculado dos três experimentos é reportada em um Certificado de Análise (COA) para cada uma das três amostras de QC. No dia do experimento, amostras congeladas de QC são descongeladas e analisadas conforme descrito abaixo. Após descongelamento, cada amostra de QC é submetida a turbilhonamento em velocidade média 2-4 segundos. Amostras congeladas de QC expiram 6 meses após a data de preparo. Elas são usadas em sua concentração nominal reportada sobre o COA. QC recentemente preparada expira 24 horas após preparo.

Diluições para Amostras de Controle de Qualidade (QC) (exemplo)

Diluição A: 26,3 µL (5,7 mg/mL) + 4,973 mL de Diluente = 30 µg/mL

25 233 µL (30 µg/mL) + 9,767 mL de Diluente = 700 ng/mL (QC 1)

1,43 mL (700 ng/mL) + 8,57 mL de Diluente = 100 ng/mL (QC 2)

2,5 mL (100 ng/mL) + 7,5 mL de Diluente = 25 ng/mL (QC 3)

30 **Preparo de amostra.** Diluir as amostras de Substância de Fármaco para aproximadamente 12,5, 6,25 e 3,125 mg/mL.

Diluição A: 400 µL amostra (~25 mg/mL) + 400 µL de diluente = 12,5 mg/mL

Diluição B: 400 μ L (~12,5 mg/mL) + 400 μ L de diluente = 6,25 mg/mL

Diluição C: 400 μ L (~6,25 mg/mL) + 400 μ L de Diluente = 3,125 mg/mL

5 **Lavagem de lâmina.** Lavar as lâminas três vezes com Tampão de Lavagem usando um lavador para lâminas. Adicionar 100 μ L por cavidade de cada concentração de padrão, amostras e amostras de QC em triplicata à lâmina bloqueada e lavada. Cada concentração de QC é adicionada duas vezes a um total de seis cavidades por lâmina. Veja mapa de lâmina no

10 Método em Anexo para colocação sugerida. Incubar durante 1 hora a 22,5 \pm 5°C. Repetir a etapa lavagem 5 vezes. Diluir anti-CD-CHO1 HCP/Biotina de coelho para 2 μ g/mL em Tampão Teknova. Submeter a turbilhamento a solução aproximadamente 2-4 segundos em velocidade média. Adicionar 100 μ L por cavidade. Incubar durante 1 hora a 22,5 \pm 5°C. Repetir a etapa

15 lavagem 5 vezes. Diluir Estreptavidina-HRP (SA-HRP) apropriadamente em Tampão Teknova (exemplo: diluição a 1/20.000 usualmente resulta em leituras de absorbância aceitáveis). Adicionar 100 μ L de diluição de SA-HRP a cada cavidade e incubar a 22,5 \pm 5°C durante 1 hora. Remova o cromogênio TMB do refrigerador e decantar um mínimo de 10 mL por lâmina em um

20 recipiente adequado. Colocar em um local escuro e deixar ir para a temperatura ambiente. Repetir a etapa lavagem 5 vezes. Adicionar 100 μ L de cromogênio TMB a cada cavidade e incubar a 22,5 \pm 5°C durante aproximadamente 2 minutos. Cessar a reação com cromogênio através da adição de 100 μ L de H₂SO₄ a 1N a cada cavidade. Adicionar Solução de Término às

25 lâminas e cavidades na mesma ordem em que o cromogênio foi adicionado para assegurar os mesmos tempos de reação de cromogênio com a enzima em cada cavidade. Medir a absorbância a 450 nm com um comprimento de onda de referência de 630 nm sobre um leitor para lâmina com 96 cavidades apropriado.

30 **ANÁLISE DE DADOS.** O *template* "CHO1 Elisa template.ppr" do programa Softmax é ajustado para gerar valores médios, desvios padrões, CVs %, concentrações calculadas, parâmetros de adaptação de curva, etc.

Curva Padrão. Dados do Padrão de Referência são adaptados a uma curva padrão usando uma função de adaptação de curva com quatro parâmetros:

$$5 \quad Y = \frac{(A - D)}{(1 + (X/C)^B)} + D$$

onde:

Y = valor de absorbância ($A_{450} - A_{630}$)

A = valor de absorbância correspondendo ao assíntota mínimo

D = valor de absorbância correspondendo ao assíntota máximo

10 C = absorbância correspondendo à metade da diferença absoluta entre os valores assintóticos máximo e mínimo (ponto de inflexão).

B = o declínio no ponto de inflexão da curva

X = concentração de CD-CHO1 HCP

O *template* "CHO1 Elisa template.ppr" do programa Softmax determina o coeficiente de correlação (R^2) da linha de regressão para os padrões usando a média calculada.

VALORES EXEMPLIFICATIVOS. Determinar se os resultados para Padrões, QC e amostras vão de encontro aos valores exemplificativos listados abaixo.

Valores exemplificativos para os padrões. O coeficiente de correlação (R^2) para a Curva Padrão deve ser $\geq 0,99$. A base média para a concentração de padrão de zero ng/mL deve ser $\leq 0,2$ unidades de absorbância. Se duas ou mais das sete concentrações nominais da curva padrão, excluindo zero e concentrações abaixo o QL (12,3 ng/mL), não vão de encontro às condições 6.1.4 e 6.1.5, o ensaio é considerada inválido e deve ser repetido. A média dos valores calculados (ng/mL) em cada concentração de padrão usada para determinar a curva padrão, excluindo zero e concentrações abaixo do QL (12,3 ng/mL) deve estar dentro de 20% do valor alvo (nominal). O coeficiente de variação (CV%) dos valores de absorbância em triplicata em cada concentração de padrão, excluindo zero e concentrações abaixo do QL (12,3 ng/mL) deve ser menor de 20%. Para assegurar que pe-

lo menos dois pontos de dados congruentes estão disponíveis para cálculo; os padrões, controles de qualidade e amostras são carregados em cavidades em triplicata. Analisar cada valor em triplicata separadamente. Reduzir o valor que repousa mais distante do alvo. Recalcular a curva e re-analisar os valores exemplificativos.

Exemplo:

	<u>Valor alvo (ng/mL)</u>	<u>Valor real (ng/mL)</u>
	25	12
		24
10		26

O único valor que está mais distante do valor alvo de 25 ng/mL é 12 ng/mL. Eliminando o valor de 12 ng/mL da triplicata, a média dos valores restantes irá de encontro aos valores exemplificativos. Se é mostrado que a média dos dois valores restantes ainda não vão de encontro aos valores exemplificativos, então, o ponto único é eliminado e a curva é recalculada.

Exemplo:

	<u>Valor alvo (ng/mL)</u>	<u>Valor real (ng/mL)</u>
	25	5,0
		5,5
20		10

O valor médio é > 20% do alvo, a despeito de qual valor é eliminado, portanto, o ponto único cai da curva e a curva será recalculada.

Valores exemplificativos para amostras de QC. A amostra de QC é um conjunto de seis cavidades na concentração estabelecida. Pelo menos quatro das seis cavidades para uma amostra de QC devem estar dentro de 20% do nominal para que a amostra de QC seja aceitável. Todas as três amostras de QC devem ser aceitáveis. Se esses valores exemplificativos não são obtidos, o ensaio deve ser repetido.

Valores exemplificativos para amostras de teste. O valor de absorbância para a amostra de teste ensaiada deve ser menor do que a maior QC. Se o valor excede aquele da maior amostra de QC, a amostra de

teste deve ser diluída suficientemente de modo a obter um valor médio entre 700 e 12,3 ng/mL. Pelo menos uma de três diluições de amostra (12,5, 6,25 e 3,125 mg/mL) deve cair dentro da faixa da curva padrão para um resultado reportável, a menos que a absorbância para todas as diluições esteja abaixo o QL do ensaio. Nesse caso, as amostras de teste são reportadas como <QL. A média dos valores de absorbância em triplicata da diluições de amostra que são maiores do que o QL e cai dentro da faixa do ensaio deverá exibir uma CV de menos de 20%.

CÁLCULO E REPORTAGEM DE RESULTADOS DE CONCENTRAÇÃO DE CD-CHO1 HCP NAS AMOSTRAS. Cálculo de concentração de CD-CHO1 HCP nas amostras. Multiplicar os resultados médios da amostra pelo fator de diluição apropriado (isto é 2, 4 e 8) para obter a concentração de CD CHO1 HCP na amostra não diluída em ng/mL para cada umas das diluições. Determinar a média para os resultados daquelas diluições que caem dentro da faixa do ensaio. Dividir o resultado pela concentração de proteína de CTLA4^{A29YL104E}-Ig reportada (mg/mL) para obter a concentração de CD CHO1 HCP em ng/mg de CTLA4^{A29YL104E}-Ig.

Cálculo exemplificativo:

Resultado médio da amostra: 235 ng de CD-CHO1 HCP/mL = 9,4 ng/mg

20

Conc. de proteína: 25,0 mg/mL

NOTA: ng de CD-CHO1 HCP/ mg de produto (ng/mg) é equivalente a partes por milhão (ppm).

Exemplo 53: DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE PROTEÍNA A EM CTLA4^{A29YL104E}-Ig ATRAVÉS DE ELISA

Esse ensaio imunoabsorvente enzima-ligado (ELISA) quantifica os níveis de contaminação de Proteína A em amostras de teste de CTLA4^{A29YL104E}-Ig. Anti-Proteína A de coelho é primeiro revestida sobre uma lâmina de microtitulação. Amostras de padrões de referência de Proteína A, controles de qualidade, controles de recuperação e CTLA4^{A29YL104E}-Ig são incubadas com a IgG anti-Proteína A de coelho ligada. Após lavagem das

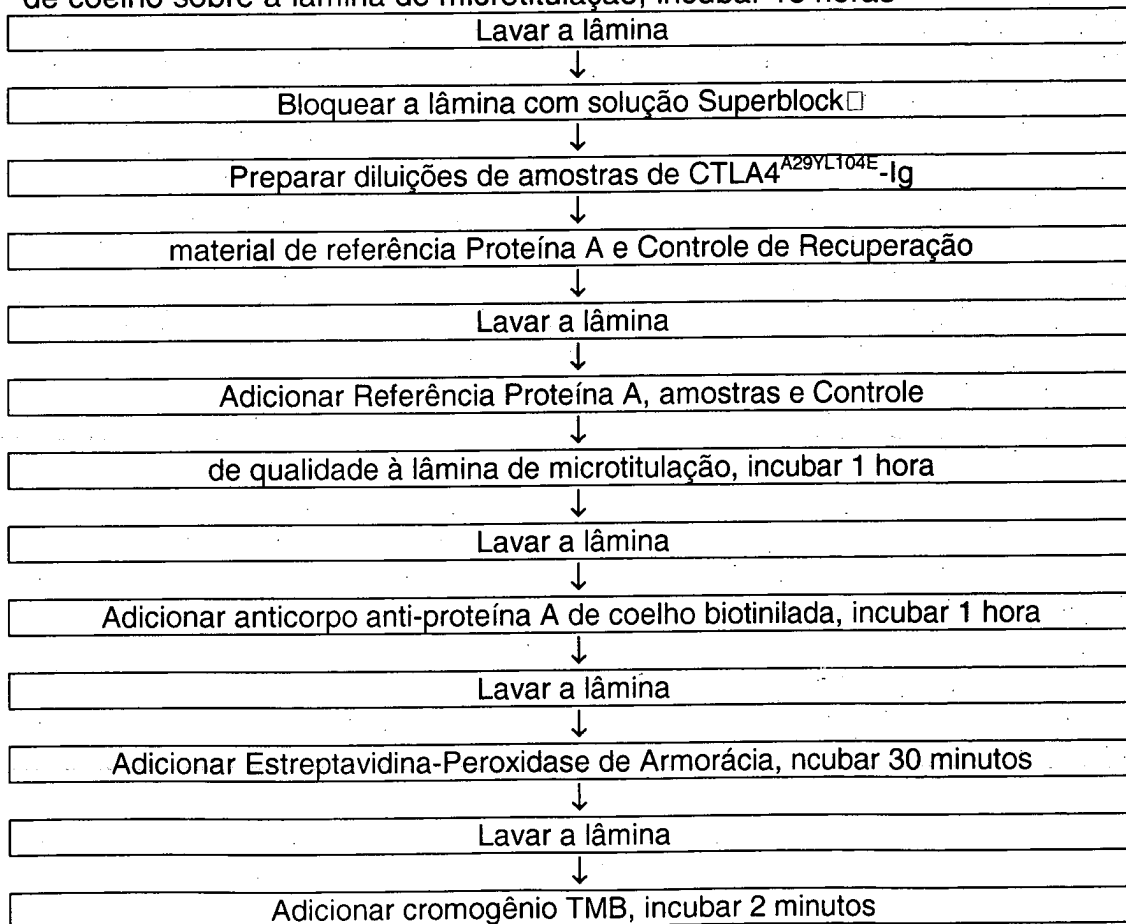
30

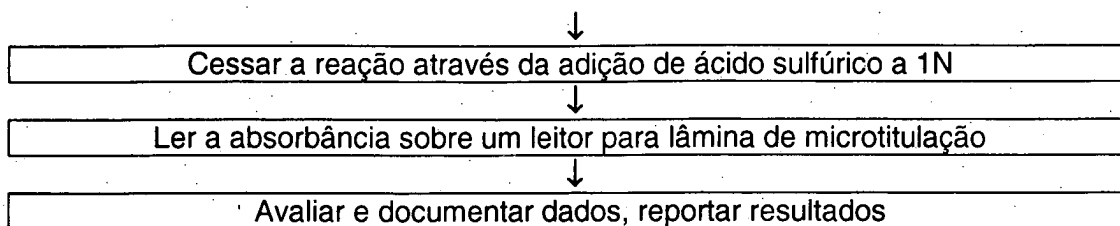
lâminas de microtitulação, anticorpo monoclonal anti-Proteína A de coelho biotinizada é adicionado, o qual se liga à proteína A capturada durante a etapa inicial. As lâminas de microtitulação são lavadas para remover quaisquer anticorpos monoclonais não ligados. Estreptavidina-peroxidase de armorácia é, então, adicionada após uma hora de incubação; a lâmina de microtitulação é novamente lavada para remover quaisquer anticorpos conjugados não ligados. Cromogênio TMB é, então, adicionado para proporcionar uma reação colorimétrica. A reação é terminada com ácido sulfúrico e as densidades ópticas são medidas a 450 nm em um leitor para microlâmina com 96 cavidades. A cor se desenvolve em proporção à quantidade de Proteína A capturada. As concentrações de amostra são determinadas baseado sobre uma curva padrão gerada através de plotagem da densidade óptica versus a concentração de Proteína A na faixa de 0,188 ng/mL a 12 ng/mL.

ESBOÇO DO MÉTODO

15 Imobilizar anticorpo anti-Proteína A

de coelho sobre a lâmina de microtitulação, incubar 18 horas





Revestimento da lâmina com Anticorpo de captura. Preparar uma solução a 1 μ g/mL de anticorpo anti-Proteína A de coelho em Tampão de Revestimento e adicionar 100 μ L da solução a cada cavidade de uma lâmina de microtitulação Costar. Incubar a 4°C durante 18 \pm 2 horas.

- 5 **Lavagem e Bloqueio de lâmina.** Lavar as lâminas três vezes com Solução de Lavagem usando o lavador de lâminas. Adicionar 200 μ L de SuperBlock \square a cada cavidade. Incubar a lâmina de microtitulação durante 60 minutos em temperatura ambiente.

- 10 **Preparo de Padrão de Referência.** Preparar Padrão de Referência através de mistura da quantidade apropriada de Material de referência Proteína A no volume apropriado de tampão de acetato. Submeter a turbilhonamento solução em velocidade média durante 2-4 segundos. Incubar as amostras de Padrão de referência, Controle de Qualidade e Controle de Recuperação durante 10 minutos em temperatura ambiente antes de adição à
- 15 lâmina de microtitulação.

Exemplo: Material de referência Proteína A, concentração de estoque de 2,3 mg/mL

1: 200 10 μ L (2,3 mg/mL) + 1990 μ L (Tampão de acetato) = 11500 ng/mL

20 1: 479 10 μ L (11500 ng/mL) + 4780 μ L (Tampão de acetato) = 24 ng/mL

2 mL (24 ng/mL) + 2 mL (Tampão de acetato) = 12 ng/mL

2 mL (12 ng/mL) + 2 mL (Tampão de acetato) = 6 ng/mL

2 mL (6 ng/mL) + 2 mL (Tampão de acetato) = 3 ng/mL

25 2 mL (3 ng/mL) + 2 mL (Tampão de acetato) = 1,5 ng/mL

2 mL (1,5 ng/mL) + 2 mL (Tampão de acetato) = 0,75 ng/mL

2 mL (0,75 ng/mL) + 2 mL (Tampão de acetato) = 0,375 ng/mL

2 mL (0,375 ng/mL) + 2 mL (Tampão de acetato) = 0,188 ng/mL

0 mL + 2 mL (Tampão de acetato) = 0 ng/mL

5 Cada concentração de padrão é analisada em triplicata. Colocar as amostras sobre lâminas de microtitulação conforme descrito no método em anexo.

Preparo de amostras de controle de qualidade. Amostras de Controle de Qualidade (QC) de Proteína A são preparadas em tampão de acetato em três níveis de concentração alvo de 0,5, 2 e 5 ng/mL. Elas são preparadas frescas no dia do experimento ou em maiores quantidades e congeladas em alíquotas de 750 μ L a -70°C . As concentrações de Proteína A nas amostras de QC congeladas são predeterminadas em três experimentos ELISA de proteína A independentes usando esse método e os resultados da concentração média calculada são reportados como as concentrações "nominais" de QC em um Certificado de Análise para cada amostra de QC.

20 No dia de um experimento, descongelar um frasco de cada uma das três amostras de QC em temperatura ambiente. Analisar cada concentração de QC duas vezes (em duas análises em triplicata por concentração). Colocar as amostras de QC sobre lâminas de microtitulação conforme descrito no método em anexo.

Material de referência Proteína A, 2,3 mg/mL

1: 200 μ L (2,3 mg/mL) + 1990 μ L (Tampão de acetato) = 11500 ng/mL

25 1: 479 μ L (11500 ng/mL) + 4780 μ L (Tampão de acetato) = 24 ng/mL

833,3 μ L (24 ng/mL) + 3,166 mL (Tampão de acetato) = 5 ng/mL (QC1)

1,600 mL (5 ng/mL) + 2,4 mL (Tampão de acetato) = 2 ng/mL (QC2)

30 1 mL (2 ng/mL) + 3 mL (Tampão de acetato) = 0,5 ng/mL (QC3)

Preparo da amostras de teste. Preparar concentrações de 2,5 mg/mL, 1,25 mg/mL e 0,625 mg/mL das amostras de teste de C-

TLA4^{A29YL104E}-Ig em tubos de polipropileno usando tampão de acetato (pH de 3,5). Amostras de teste são incubadas durante aproximadamente 10 minutos em temperatura ambiente antes de adição à lâmina de microtitulação.

- Lavagem da lâmina.** Lavar as lâminas três vezes com Solução de Lavagem usando o lavador de lâminas. O lavador de lâminas deverá ser ajustado para encher as cavidades com 300 μ L de tampão de lavagem, tempo de embebiamento zero. Adicionar 100 μ L de cada de Padrão de Referência, Controle de Qualidade, Controle de Recuperação e amostras de teste a cada cavidade e incubar durante uma hora em temperatura ambiente.
- 5
- 10 Repetir a etapa. Diluir anticorpo anti-Proteína A biotilado com Diluente Teknova para uma concentração desejada, conforme indicado através de otimização para cada novo lote. Por exemplo, fazer uma diluição a 1: 64.000 para o conjugado de anticorpo monoclonal anti-proteína A/biotina, submeter a turbilhonamento em velocidade média e adicionar 100 μ L a cada cavidade
- 15 usando uma pipeta com múltiplos canais. Incubar em temperatura ambiente durante uma hora.

- Diluir Estreptavidina-Peroxidase de Armorácia com Diluente Teknova para uma concentração desejada, conforme indicado através de otimização para cada novo lote. Por exemplo, fazer uma diluição a 1: 80.000
- 20 para a Estreptavidina-Peroxidase de Armorácia. Submeter a turbilhonamento em velocidade média e adicionar 100 μ L a cada cavidade e incubar durante 30 minutos em temperatura ambiente. Repetir a etapa, mas lavar cinco vezes. Adicionar 100 μ L de cromogênio TMB a cada cavidade. Incubar em temperatura ambiente durante aproximadamente 2 minutos. A densidade
- 25 óptica para uma maior concentração para a Curva Padrão deverá estar entre 0,980 e 1.400. Cessar a reação com cromogênio através da adição de 100 μ L/cavidade de H₂SO₄ a 1N. Adicionar Solução de Término às lâminas e cavidades na mesma ordem em que o cromogênio foi adicionado para assegurar os mesmos tempos de reação de cromogênio com a enzima em cada
- 30 cavidade. Medir a absorbância a 450 nm com um comprimento de onda de referência de 630 nm sobre um leitor para lâmina com 96 cavidades apropriado.

ANÁLISE DE DADOS. Refira-se ao *template* do programa SoftMax para um ELISA de Proteína A uma vez que ele gera a média, desvios padrões e CV%s, etc. Todos os cálculos realizados nas seções Análise de Dados serão realizados usando um *template.ppr* para ELISA de proteína A no SoftMax Pro.

Calcular a média dos valores de absorbância em triplicata (Abs) obtida para cada concentração de referência e amostra ensaiada. Calcular um modelo de dados para um padrão de Proteína A usando uma regressão com quatro parâmetros ponderada da forma:

$$Abs = \frac{\min - \max}{1 + (C / ED_{50})^B} + \max$$

onde:

- Abs = absorbância
- min = valor de absorbância correspondendo ao assíntota mínimo
- max = valor de absorbância correspondendo ao assíntota máximo
- ED₅₀ = absorbância correspondendo à metade da diferença absoluta entre os valores assintóticos máximo e mínimo
- B = o declínio do ponto de inflexão de adaptação da curva
- C = Concentração de Proteína A

VALORES EXEMPLIFICATIVOS

Valores exemplificativos para os padrões. Os valores exemplificativos para os padrões se aplicam àqueles valores em ou acima do limite quantitativo (QL), uma vez que valores abaixo do QL são usados apenas para ajudar a estabelecer os extremos da curva. O coeficiente de determinação (R²) para a Curva Padrão deverá ser $\geq 0,99$. A base média para o padrão de zero ng/mL deverá ser $\leq 0,08$ unidades de absorção. A média dos valores calculados (ng/mL) em cada concentração de padrão usada para determinar a curva padrão exceto zero e o QL devem estar dentro de 15% do valor alvo (nominal). A média dos valores de absorbância em triplicata do QL da curva padrão deve exibir um CV% de menos de 20% e estar dentro de 20% do alvo.

Exemplo 54 - ELISA PARA A DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNA SEME-
LHANTE À MCP-1 em CTLA4^{A29YL104E}-Ig

Esse ELISA é realizado para determinar a concentração de Proteína semelhante à MCP-1 em CTLA4^{A29YL104E}-Ig. As concentrações de uma curva padrão (0,4 a 25,6 ng/mL), Controle de Qualidade e amostras de teste são aplicadas à lâminas de microtitulação absorvidas com anticorpo anti-MCP-1 de camundongo de cabra e incubadas durante 60 minutos em temperatura ambiente (22,5 ± 5°C). As lâminas são lavadas, anticorpo secundário (IgG anti-MCP-1 de rato de coelho) é adicionado e incubadas durante 60 minutos a 22,5 ± 5°C. As lâminas são lavadas, igG anti-coelho de cabra conjugado com Peroxidase de Armorácia é adicionada a cada cavidade e incubada durante 30 minutos a 22,5 ± 5°C. As lâminas são lavadas e cromogênio TMB é adicionado para proporcionar uma reação colorimétrica. Após cessar a reação H₂SO₄ a 1N, as densidades ópticas são medidas a 450 nm em um leitor para microlâmina com 96 cavidades e os dados são modelados usando uma curva de regressão com 4 parâmetros. A concentração de Proteína semelhante à MCP-1 é, então, calculada para cada amostra de teste com relação ao Material de referência MCP-1. A concentração é reportada em ng de proteína semelhante à MCP-1 por mg (partes por milhão, ppm) de amostra dividindo o resultado obtido com relação à Curva Padrão e a concentração de amostra não diluída. Esse método permite a determinação de impurezas semelhantes à MCP-1 em amostras biológicas derivadas de cultura de células, incluindo *em-processo*, Substância de Fármaco e produto de fármaco purificado. Proteína semelhante à MCP-1 pode estar presente em amostras biológicas produzidas em cultura de células de Ovário de Hâms-ter Chinês (CHO). Dois anticorpos policlonais foram identificados, os quais se ligam a uma impureza semelhante à MCP-1 purificada de células CHO. Os anticorpos são dirigidos contra MCP-1 de murino e rato (intacta) e ambos reagem cruzadamente proteína semelhante à MCP-1 de células CHO, o que é demonstrado nesse relatório.

Revestimento da lâmina. Para revestimento, diluir anticorpo anti-MCP-1 de camundongo de cabra para 5 µg/mL com Tampão de Reves-

timento. Revestir as lâminas com 100 μ L/cavidade. Cobrir as lâminas com vedantes para lâmina e incubar a 22,5 \pm 5°C durante 12 a 18 horas. Lavar a lâmina. Lavar as lâminas três vezes com Solução de Lavagem usando um lavador de lâminas. O lavador deverá ser ajustado em três lavagens, 300 μ L/cavidade com um tempo de embebição zero. Alternativamente, as lâminas podem ser lavadas manualmente. Adicionar 300 μ L de solução a cada cavidade de cada lâmina usando uma pipeta com múltiplos canais calibrada. Esvaziar as cavidades sacudindo em uma pia e secar gentilmente sobre papéis toalha. Repetir três vezes.

10 **Bloqueio de lâmina.** Adicionar 300 μ L Tampão de Bloqueio & Estabilizante de Revestimento a cada cavidade usando uma pipeta com múltiplos canais calibrada. Incubar as lâminas durante uma a duas horas a 22,5 \pm 5°C.

15 **Lavagem e armazenamento de lâmina.** Lavar as lâminas três vezes com Solução de Lavagem conforme descrito sob 4.2. Encher as lâminas com 300 μ L Tampão de Revestimento por cavidade, cobrir com vedantes para lâmina e armazenar no escuro a 2-8°C durante até uma semana.

20 **Preparo dos padrões.** A partir do estoque de Proteína semelhante à MCP-1, preparar uma solução a 25,6 ng/mL em PTB e diluir daí em etapas de diluição serial (1: 2) para 12,8, 6,4, 3,2, 1,6, 0,8, 0,4 e 0 ng/mL usando PTB como diluente. Alternativamente, padrões congelados podem ser usados através de preparo de uma grande quantidade de padrões. Transformar em alíquotas e armazenar a -70°C a -80°C. Evitar congelamento/descongelamento repetido. Padrões congelados precisam ser qualificados

25 contra Controles de qualidade em três operações ELISA independentes. Os Padrões congelados e QC devem ser aceitáveis em cada operação. Após término de três operações aceitáveis, um Certificado de Análise é emitido. Padrões congelados serão usados em suas concentrações nominais. Eles expiram 3 meses a partir da data de preparo.

30 Exemplo para uma referência de MCP-1 com uma concentração de estoque de 0,97 mg/mL:

a) Preparar 2,5 mL de 5200 ng/mL em PTB:

13,4 mL de estoque + 2,487 mL de Diluente

b) Preparar 160 mL de 25,6 ng/mL em PTB:

788 mL de estoque a +160 mL de Diluente

5 **Misturar cada solução através de turbilhamento do tubo durante aproximadamente 2-3 segundos e, então, invertendo gentilmente 2-3 vezes.**

10 **Controle de qualidade.** Controles de qualidade (QCs) são proteína semelhante à MCP-1 preparada em concentrações nominais de 17,7 ng/mL, 5,3 ng/mL e 1,2 ng/mL em PTB. Preparar a uma grande quantidade de QCs, transformar em alíquotas e armazenar a -70°C a -80°C durante até 3 meses. Evitar congelamento/descongelamento repetido. Os controles de qualidade são qualificados contra a Curva Padrão em três operações ELISA independentes. O QC deve ser aceitável em cada operação. Após término de três operações aceitáveis, o resultado da média calculada para cada QC

15 aceitável é reportado e um Certificado de Análise é emitido. O QC será usado em suas concentrações calculadas. Eles expiram três meses a partir da data de preparo. Exemplo para o preparo de diluições de QC congeladas a partir de uma referência de MCP-1 com uma concentração de estoque de 0,97 mg/mL:

20 a) Preparar 2,5 mL de 5200 ng/mL em PTB:

13,4 mL de estoque + 2,487 mL de Diluente

b) Preparar diluição final de Proteína semelhante à MCP-1s a-
mostras de controle de qualidade como segue:

Concentração de MCP-1 (ng/mL)	5200 ng/ml de Proteína semelhante à MCP-1 a Adicionar (µL)	Quantidade de tampão de PTB a Adicionar (mL)	Volume total (mL)
17,7	409	119,6	120
5,3	122	119,9	120
1,2	28	120	120

25 **Misturar cada solução através de turbilhamento 2-3 segundos e, então, inverter gentilmente 2-3 vezes. Alternativamente, QCs podem ser preparados frescos no dia de análise.**

Amostras de teste. Amostras de teste são preparadas através da adição de 200 µL da amostra de teste a 200 µL de PTB e sujeição a turbi-

lhonamento durante 2 - 4 segundos. Adicionar padrões de referência, controles de qualidade (x2) e amostras de teste à lâmina, em triplicata, 100 μ L por cavidade e incubar durante 1 hora a 22,5 \pm 5°C (não usar as cavidades externas). Preparar anticorpo secundário anti-MCP-1 de rato de coelho em tampão de PTB em uma concentração de 2 μ g/mL em um volume suficiente para as lâminas usadas no ensaio. Submeter a turbilhonamento a solução aproximadamente 2 - 4 segundos. Repetir a lavagem, mas lavar cinco vezes. Adicionar 100 μ L da solução de anticorpo secundário a cada cavidade e incubar durante 60 minutos a 22,5 \pm 5°C. Preparar solução de anticorpo terciário anti-coelho de cabra conjugado com HRP (por exemplo, diluição a 1:20.000 ou diluição apropriada) usando PTB como diluente. Submeter a turbilhonamento a solução aproximadamente 2 - 4 segundos. Repetir a lavagem. Adicionar 100 μ L de conjugado de HRP a cada cavidade e incubar a 22,5 \pm 5°C no escuro durante 30 minutos. Repetir a lavagem. Adicionar 100 μ L de TMB a cada cavidade e incubar a 22,5 \pm 5°C no escuro durante 3 - 6 minutos ou até a cor apropriada ter se desenvolvido. Cessar a reação com cromogênio através da adição de 100 μ L de H₂SO₄ a 1N na mesma ordem conforme a adição de cromogênio foi feita. Ler as densidades ópticas a 450 nm com um comprimento de onda de referência de 630 nm sobre um leitor para lâminas com 96 cavidades apropriado.

REDUÇÃO DE DADOS

Usar o software Softmax[®] com o arquivo de protocolo MCP-1.ppr para construir uma curva padrão usando uma regressão com quatro parâmetros ponderada da forma.

onde:

A = valor de absorbância₄₅₀ correspondendo ao assíntota mínimo.

D = valor de absorbância₄₅₀ correspondendo ao assíntota máximo.

c = concentração correspondendo à metade da diferença absoluta entre os valores assintóticos máximo e mínimo.

B = o declínio aproximado da porção linear da curva.

$x =$ concentração de padrão de referência.

Reportar os resultados apenas para amostras com dados aceitáveis para Curvas Padrões, controles de qualidade e amostras de teste.

Valores exemplificativos para os padrões. Os valores exemplificativos para os padrões se aplicam àqueles valores em ou acima o QL (0,8 ng/mL), uma vez que valores abaixo do QL são usados apenas para ajudar a estabelecer os extremos da curva. A base média (o zero ng/mL de padrão) deve ser $\leq 0,1$ unidades de absorção. A concentração média recalculada de MCP-1 (ng/mL) em cada concentração de padrão usada para determinar a curva padrão deve estar dentro de 15% do valor alvo (nominal). O coeficiente de variância (CV%) dos valores de A_{450} em triplicata em cada concentração de padrão usada para determinar a curva padrão deve ser $\leq 15\%$. A média dos valores de A_{450} em triplicata no QL da curva padrão deve exibir uma CV% de $\leq 20\%$ e re-calcular para dentro de 20% do alvo (concentração nominal, 0,8 ng/mL). Cada valor da triplicata usado para calcular a média será analisado separadamente. O valor que repousa mais distante da média cairá, a curva re-calculada e os valores exemplificativos re-analisados. Se é mostrado que a média dos dois valores restantes ainda não vai de encontro aos valores exemplificativos, então, o ponto único é eliminado e a curva é re-calculada.

Valores exemplificativos para amostras de QC. A amostra de QC é definida como um conjunto de três cavidades na concentração estabelecida, portanto, para as três concentrações nominais estabelecidas nesse método, há um total de seis amostras de QC. As concentrações recalculadas de pelo menos duas das três cavidades para uma amostra de QC devem estar dentro de 20% da concentração alvo previamente determinada (veja COA) para que a amostra de QC seja aceitável. Pelo menos quatro das seis amostras de QC devem ser aceitáveis; duas das seis amostras de QC (não duas na mesma concentração) podem ser inaceitáveis e não mais do que 6 das 18 cavidades com amostra de QC podem se desviar mais de 20% das respectivas concentrações alvo. Se esses valores exemplificativos não são obtidos, o ensaio deve ser repetido.

Valores exemplificativos para amostras de teste. A concentração média calculada de MCP-1 deve ser menor do que a concentração da maior QC. Se a concentração média calculada de MCP-1 é $\leq 0,8$ ng/mL (o QL), a CV% das determinações em triplicata deve ser $\leq 20\%$. Se essa condição não é obtida, o resultado da amostra não é válido e deve ser repetido. Se esse critério é obtido, a concentração média calculada de MCP-1 é usada para calcular o resultado final. Se a concentração calculada de MCP-1 é $< 0,8$ ng/mL (QL), a amostra é reportada como $< QL$ e o valor " $< 0,8$ ng/mL" é usado no cálculo do resultado final.

10 **Exemplo 55 – DETECÇÃO DE DNA DE CHO EM CTLA4^{A29YL104E}-Ig e CTLA4-Ig ATRAVÉS DE REACÃO EM CADEIA DE POLIMERASE QUANTITATIVA**

Esse procedimento foi desenvolvido para detectar DNA de CHO residual nas amostras de Substância de Fármaco usando um ensaio de reação em cadeia de polimerase quantitativa em tempo real (qPCR). PCR é a replicação de uma mistura de DNA. Esse ensaio usa uma sonda fluorogênica para detectar um produto de PCR de CHO específico à medida que ele se acumula durante o ensaio. A taxa de amplificação do produto de PCR é diretamente proporcional à quantidade DNA de iniciação presente na amostra.

20 **Conversão do valor de DNA para picograma / miligrama.** O valor de pg/mL é dividido pela concentração da amostra, determinada através da absorbância a 280 nm. Cálculo exemplificativo para a amostra tendo uma concentração de proteína de 50 mg/mL e um valor reportado a partir da Bio-confiança = 0,67 fg/ μ L.

Etapa 1: Conversão para pg/mL = 0,67 pg/mL.

Etapa 2: Conversão para pg/mg = (0,67 pg/mL / 50,0 mg/mL) = 0,013 pg/mg.

30 **Exemplo 56: ANÁLISE DE CTLA4^{A29YL104E}-Ig ATRAVÉS DE SDS-PAGE**

Esse exemplo descreve a análise de CTLA4^{A29YL104E}-Ig para a avaliação da pureza de Substância de Fármaco e produto de fármaco de CTLA4^{A29YL104E}-Ig. CTLA4^{A29YL104E}-Ig é uma proteína de fusão manipulada

consistindo de um domínio de ligação a ligante modificado do antígeno 4 de linfócito T citotóxico (CTLA4) e a região Fc γ 1 de IgG humana. CTLA4^{A29YL104E}-Ig tem um peso molecular de ~92 kDáltons e um peso molecular evidente de 97 kDáltons (não-reduzida) ou 55 kDalton (reduzida). Eletroforese de CTLA4^{A29YL104E}-Ig sobre géis de SDS-poliacrilamida em gradiente de 4-20% separa as espécies monoméricas principais de espécies de maior peso molecular (agregados, dímeros e multímeros de maior ordem), bem como quaisquer espécies de baixo peso molecular (fragmentos de degradação). Exploração densitométrica e quantificação por ImageQuantTLTM de géis corados com Azul Coomassie proporciona uma medida da pureza de proteína. Os resultados são reportados como pureza percentual de CTLA4^{A29YL104E}-Ig sob condições reduzidas e não-reduzidas.

REAGENTES

NOTA: Todos os reagentes podem ser substituídos por alternativas equivalentes. 1X tampão de operação de Tris-Glicina-SDS. Adicionar 100 mL de 10X tampão de operação de Tris-Glicina-SDS a um cilindro graduado de 1 litro. Q.S. para 1 litro com água Milli-Q ou com grau para HPLC. Cobrir, inverter várias vezes para misturar. Esse reagente deverá ser preparado no dia de ensaio.

NOTA: Preparar um volume adicional se necessário.

Reagente de Coloração Azul Coomassie. Misturar a solução de Reagente GelCode Blue Stain imediatamente antes de uso invertendo gentilmente ou entornando e girando a garrafa várias vezes. Tal mistura é especialmente importante quando usando o recipiente GelCode de 3,5 L com uma bomba manual (Catálogo No. 24592). Não agitar a garrafa para misturar a solução. **NOTA:** É importante misturar o reagente de coloração antes de distribuição para assegurar que a solução é homogêneo.

Solução de Fixação: Metanol a 50% /Ácido acético a 7% em Água. Combinar 500 mL de metanol e 70 mL de ácido acético em um cilindro graduado de 1 litro. Q.S. com água Milli-Q para 1 litro e Misturar. A solução de fixação solução é estável em temperatura ambiente durante até seis meses. **NOTA:** A solução de fixação deverá ser preparada em uma coifa

química.

Preparo de Controle de Coloração. Reconstituir o inibidor de tripsina para fazer uma solução a 2 mg/mL de estoque usando água Milli-Q. Preparar alíquotas de 50 μ L e congelar a $-30 \pm 10^{\circ}\text{C}$ durante até 6 meses.

- 5 Usar o seguinte plano de diluição para diluir uma solução de proteína de estoque para uma concentração de trabalho:

25 μ L de solução de estoque + 75 μ L de água Milli-Q = 0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$

40 μ L de 0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ + 160 μ L de água Milli-Q = 100 ng/ μ L

- 10 Usar a tabela diretamente abaixo para preparar a solução de carregamento de Controle de Coloração.

Preparo de amostra para controle de coloração

Preparado de controle de coloração	Não-reduzido (μL)
Inibidor de Tripsina (100 ng/ μ L)	10
Tampão de amostra de Tris-Glicina- SDS (2X)	50
Água Milli-Q	40
Volume total	100

- 15 Carregamento de 10 μ L do Preparado de Controle de Coloração proporcionará uma carga de proteína de 100 ng.

PREPARO DE PADRÃO E AMOSTRA

Carregamento de Padrão para Processo Fixo, Substância de Fármaco GLP/GMP, Produto de Fármaco ou Amostras de Estabilidade.

- 20 **Diluição para Géis Corados com Azul Coomassie.** Diluir os artigos de teste e material de referência para a concentração de trabalho de 1,0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ e carregar reduzido e não-reduzido com marcadores de peso molecular com peso molecular conforme descrito na Tabela diretamente abaixo.

Diluição de amostra e carregamento de gel para gel corado com azul Coomassie

Fileira	Descrição	(NR/R) Condição	Concentração de trabalho ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	Volume de carga (μL)	Carga de Proteína (μg)
1	Amostra 1	NR	1,0	10	10
2	Material de referência	NR	1,0	10	10
3	Placebo ¹	NR	0,0	10	0
4	Amostra 1	R	1,0	10	10
5	Material de referência	R	1,0	10	10
6	Padrões de peso molecular	R	-	10	-
7	Material de referência	R	1,0	10	10
8	Amostra 2	R	1,0	10	10
9	Placebo ¹	NR	0,0	10	0
10	Material de referência	NR	1,0	10	10
11	Amostra 2	NR	1,0	10	10
12	Controle de coloração	NR	0,01	10	0,1

¹ Placebo = Carga de 10 μL de 1 X Tampão de amostra NR

NOTA: A banda de controle de coloração é incluída sobre a imagem de gel explorada para inspeção visual a fim de avaliar a Adequabilidade de sistema.

5 A banda de controle de coloração está ausente na imagem de gel derivada para manter a consistência do relatório de gel.

Preparo de amostra e Eletroforese. Diluição de amostra para uma carga de proteína de 10 μg /Fileira. Seguir o método abaixo para preparar amostras para uma carga de 10 μg /10 μL . Usando água Milli-Q como o diluente, diluir as amostras de teste e material de referência para 10 mg/mL de CTLA4A29YL104E-Ig. Concentrações aproximadas podem ser usadas para os cálculos. Por exemplo: se a amostra de Substância de Fármaco de CTLA4A29YL104E-Ig tem uma concentração de 25 mg/mL, preparar uma diluição a 1: 2,5 (adicionar 40 μL de amostra a 60 μL de água Milli-Q). Seguir a tabela diretamente abaixo para preparar a amostra final para eletroforese. Usar tubos para microcentrífuga para essas diluições.

Diluição de Amostras de teste

Reagente	Reduzida (μL)	Não-Reduzida (μL)
Artigo de teste a 10 mg/mL	10	10
Tampão de amostra de Tris-Glicina-SDS (2X)	50	50
Agente de redução NuPAGE (10X)	10	NA
Água Milli-Q	30	40
Volume total	100	100

NOTA: Ajustar o volume da solução de proteína e água Milli-Q conforme necessário para obter um volume final de 100 μL .

NOTA: Se a concentração de amostra é < 10 mg/mL, preparar a amostra final de acordo com a tabela acima. Ajustar o volume da solução de proteína e água para maximizar a carga de proteína sobre o gel.

Aquecimento de Amostra. Após preparo de diluições de amostra, fechar os tubos para microcentrífuga e submeter o tubo a turbilhonamento para misturar a solução. Aquecer a(s) amostra(s) em um banho de água a 80 \pm 5°C durante 2,0 \pm 0,5 minutos (usar um cronômetro calibrado). Remover a(s) amostra (s) do calor e deixar que a(s) mesma(s) esfrie para a temperatura ambiente. Inverter os tubos várias vezes para remover a condensação de cima e dos lados dos tubos.

Aparelho e Preparo de Gel. Remover o gel de sua embalagem e remover cuidadosamente o pente, certificando-se de que as paredes das cavidades estejam retificadas. As cavidades pode ser retificadas com uma ponteira de carregamento de gel, se necessário. Inserir o gel na unidade de eletroforese de modo que a lâmina de vidro curta faceie a câmara interna. Se apenas um único gel tem de ser operado, inserir um espaçador de Plexiglass sobre o lado oposto. Cunhar o(s) gel(eis) hermeticamente para vedar a câmara interna da câmara externa. Encher completamente a câmara interna com 1X tampão de operação de Tris-Glicina-SDS. Verificar quanto a vazamentos, então, encher a câmara externa do fundo das cavidades com 1X tampão de operação de Tris-Glicina-SDS. Enxaguar gentilmente as cavidades usando uma pipeta com 1X tampão de operação de Tris-Glicina-SDS para remover qualquer acrilamida residual. Repetir o enxágüe da cavidade até que as cavidades estejam completamente limpas e definidas.

Carregamento de Amostra. Usando ponteiras de carregamento de gel, carregar cada cavidade com 10 μ L de amostra. Encher todas as fileiras com placebo com 10 μ L de 1X Tampão de Amostra de Não-Redução. Isso ajudará a prevenir a redução da amostra em virtude de carregamento do agente de redução e manter uma concentração de sal por todo o gel.

Eletroforese. Fixar a caixa de gel, cobrir e conectar os eletrodos ao suprimento de energia. Ajustar a corrente para 25 mAmps/gel (mA) e ajustar a tensão (v) e energia (w) para o máximo. NOTA: O ajuste do suprimento de energia pode variar de vendedor para vendedor. Ajustar para obter 25 mA/gel. Submeter o gel à eletroforese durante 60 minutos ou até que o corante do tampão de amostra atinja apenas o fundo do gel. Desligar o suprimento de energia, desconectar os condutores e remover o(s) gel(eis) do dispositivo. Separar cuidadosamente as lâminas plásticas. Manter a lâmina plástica com o gel preso sobre a solução de fixação apropriada para a técnica de coloração. Submergir o gel na solução até que o gel se desloque da lâmina plástica.

Fixação em Gel. NOTA: Todas as etapas são realizadas em temperatura ambiente com ligeira rotação sobre o agitador orbital. NOTA: Realizar coloração em um recipiente hermeticamente vedado para impedir evaporação de reagente. NOTA: Embora o volume citado possa ser usado, é imperativo que o gel seja completamente coberto em todas as etapas. O tamanho do gel e bandeja de coloração devem ser levados em conta na determinação dos volumes necessários. Após eletroforese, adicionar 50 mL de solução de fixação (solução de metanol a 50%/ácido acético a 7%) durante 15 minutos. Enxaguar o gel 3 vezes durante 5 minutos cada com ~100 mL de água Milli-Q. Misturar a solução de Reagente de Coloração Coomassie antes de uso e adicionar 50 mL para um mini gel de 8 x 10 cm. Reagente adicional pode ser requerido se uma bandeja maior é usada. Agitar gentilmente a bandeja usando um Agitador Orbital durante 20 \pm 1 hora. Para consistência, corar todos os géis no mesmo operador durante o mesmo tempo. Descorar através de substituição do Reagente de Coloração Coomassie com 100 mL de água Milli-Q. Após 1 hora de descoloração, o gel está pronto para

exploração.

EXPLORAÇÃO DE GEL E ANÁLISE

Após eletroforese e coloração, todos os géis são explorados usando um densitômetro e analisados usando o software ImageQuantTL™.

- 5 Os arquivos de imagem são armazenados sobre o disco rígido local do computador e arquivados via a network de área local. Os parâmetros de exploração e análise são listados na tabela diretamente abaixo.

Exploração de gel e parâmetros de análise

Parâmetros de Exploração	Ajuste
Tamanho de pixel de exploração	100
Resolução digital de exploração	12 bits
Parâmetros de Detecção de Banda	
Correção de base	Raio ajustado a 200
Declínio mínimo	Inicial 500
Redução de interferência	Inicial 5
Pico % Máximo	Inicial 0
Largura % de fileira	Ajustar a 75%

- 10 **NOTA:** Os Parâmetros de Exploração nessa Tabela não devem ser alterados durante exploração. Os Parâmetros de Detecção de Banda, Largura % de fileira (ajustado a 75%) e Correção de Base (ajustado em um raio de 200), são recomendados para todas as análises de imagem de gel exploradas (quaisquer alterações precisam ser documentadas). Ajuste dos
- 15 parâmetros Declínio Mínimo, Redução de Interferência e Pico Máxima % pode ser necessário para identificar precisamente bandas em virtude de diferenças nas propriedades físicas do gel, tal como encolhimento do gel após coloração/descoloração ou diferenças no formato da banda de gel. Corrigir quaisquer bandas que faltam ou erroneamente identificadas. Refira-se ao
- 20 manual do ImageQuantTL (v2003.03) e instruções na tela para informação adicional para parâmetros de detecção de banda.

Explorar o gel usando os parâmetros listados na Tabela acima. Todas as análises e avaliações do gel deverão ser feitas na imagem explo-

rada. Abrir um arquivo de imagem de gel (imagem explorada) do <1D Gel Analysis> no software ImageQuantTL. Ir para <Contrast> na barra de ferramentas e ajustar o parâmetro <Image Histogram - High> para 0,3 para intensificar a imagem de gel para visualização clara de todas as bandas.

- 5 **NOTA:** Essa etapa é para fácil visualização da imagem de gel para permitir a análise e não tem impacto sobre o resultado quantitativo. Não usar a imagem de gel quantificada para fins de avaliação visual de bandas de gel ou reportagem de gel.

- Selecionar <Lane Creation> e escolher <Manual> para ajustar
- 10 <Number of Lanes> a ser analisado. Ajustar <Lane % Widht> para 75%. Alinhar apropriadamente as fileiras únicas se necessário. Usar o método <Rolling Ball> para subtrair a base. Para somar precisamente a base, ajustar <Radius> a 200. Detectar bandas usando os ajustes iniciais <Minimum Slope>, <Noise Reduction> e <%Maximum Peak> listados na Tabela 4. Ajuste
- 15 desses valores podem ser necessários para identificar precisamente as bandas. Avaliar manualmente quaisquer bandas que faltam ou erroneamente identificadas. Determinar o peso molecular de banda através de uso do marcador de peso molecular listado abaixo. Pular as etapas de calibração e normalização. Exportar os resultados, incluindo pesos moleculares, volume
- 20 de banda e % de banda em uma planilha no Excel para documentação e relatório adicional. Onze dos doze padrões de peso molecular listados na Tabela 5 deverão ser facilmente distinguidos da base (Figura 79).

- Nota:** A cadeia B de insulina (3,500 Da) e cadeia A de insulina (2,500 Da) podem aparecer como uma única banda ampla ou a cadeia A de
- 25 insulina pode não ser visualmente identificada sobre o gel.

Padrões de peso molecular Mark 12

Marcador de proteína	Peso molecular (Dáltons)
Miosina (músculo de coelho)	200,000
□-galactosidase (E. coli)	116,300
Fosforilase B (músculo de coelho)	97,400
Albumina de soro bovino	66,300
Dehidrogenase glutâmica (fígado bovino)	55,400
Dehidrogenase de lactato (músculo suíno)	36,500
Anidrase carbônica (eritrócito bovino)	31,000
Inibidor de tripsina (soja)	21,500
Lisozima (clara de ovo de galinha)	14,400
Aprotinina (pulmão bovino)	6,000
Cadeia B de insulina (pâncreas bovino)	3,500
Cadeia A de insulina (pâncreas bovino)	2,500

Nesse exemplo, as bandas principais do artigo de teste, para não-reduzidos (monômero) e reduzidos (cadeia simples), têm de ter as mesmas posições relativas sobre o gel que o material de referência C-TLA4A29YL104E-Ig. Veja Figura 79. O controle de coloração do padrão inibidor de tripsina de soja (21,500 Da) a 100 ng/carga deve ser visível sobre a imagem de gel explorada (Figura 79, fileira 12). Com a exceção de uma banda mínima sob condição de não-redução que é comumente observada (cadeia simples) proximal ao marcador molecular com peso de 55,400 Da, a intensidade relativa percentual de qualquer banda adicional no gel corado com azul Coomassie deverá ser $\leq 2\%$ para o material de referência.

NOTA: Uma estimativa de peso molecular da banda principal não pode ser precisamente determinada em virtude sua distribuição não-gaussiana. Inspeção visual do material de referência reduzido proporciona uma única banda ampla que migra para uma posição proximal ao marcador de peso molecular de 55,400 Da (veja Figura 79). A pureza percentual para a principal banda reduzida deve ser $\square 97\%$. Inspeção visual da banda prin-

5 cipal do material de referência não reduzido proporciona uma única banda ampla que migra para uma posição proximal aos marcadores de peso molecular de 97,400 Da e 116,300 Da (Figura 79, fileira 2). A pureza percentual da principal banda de material de referência deve ser \geq 97%. Inspeção visual da principal banda de material de referência não-reduzido proporciona uma única banda ampla major que migra para uma posição proximal aos marcadores de peso molecular de 97,400 Da e 116,300 Da (Figura 79, fileira 2). A pureza percentual da principal banda de material de referência deve ser \geq 97%.

10 **Exemplo 57 - UM MÉTODO DE HPLC PARA A DETERMINAÇÃO QUANTITATIVA DE TRITON X-100 EM CTLA4^{A29YL104E}-Ig**

15 Triton X-100 é determinado em um baixo nível de partes por milhão (ppm) (<10 ppm) em amostras de proteína de CTLA4^{A29YL104E}-Ig através de HPLC. O método envolve extração de Triton X-100 sobre meios de extração em fase sólida, seguido por lavagem com água para remover a proteína residual e eluição do Triton X-100 com acetonitrilo. O eluato de acetonitrilo é cromatografado usando uma coluna Phenomenex Hypersil C1 e uma fase móvel consistindo de acetonitrilo: água (80: 20). Detecção é através de UV a 225 nm. O método é linear entre 1-22 ppm com o limite de detecção sendo de 0,25 ppm. CTLA4^{A29YL104E}-Ig, um agente imunossupressor em potencial, é uma proteína de fusão de segunda geração, consistindo do domínio de ligação a ligante do antígeno 4 de linfócito T citotóxico e da região constante de cadeia pesada de IgG1 humana. Triton X-100, um tensoativo não-iônico, é usado para inativação viral na purificação de CTLA4^{A29YL104E}-Ig. Mesmo embora o Triton X-100 seja removido, níveis residuais ou ausência do tensoativo da proteína precisa ser estabelecida para fins de qualidade do produto e regulatórios. Para essa finalidade, um método capaz de detecção e quantificação de níveis residuais de Triton X-100 foi desenvolvido. Triton X-100 é extraído da proteína sobre um meio de SPE e eluído com acetonitrilo para análise através de HPLC.

30 **Preparo de padrão**

Placebo. Qualquer amostra ou Padrão de Referência previa-

mente analisado através desse método e verificado como não contendo níveis detectáveis de Triton X-100 pode ser usado como o placebo. A concentração de proteína no placebo e amostra deverá ser similar. O placebo deverá ser operado junto com a(s) amostra(s).

- 5 **Solução de Padrão de Estoque.** Pesar precisamente 10,0 ± 1,0 mg de Triton X-100 em um frasco volumétrico de 100 mL e diluir to volume com água e misturar.

NOTA: Triton X-100 dissolve lentamente em água. Examinar a solução com relação à dissolução completa (tipicamente após 15 minutos) antes de uso.

- 10 Triton X-100 é mais viscoso do que a água, de modo que quantidades não dissolvidas são visíveis na presença de água.

- Solução de Padrão de Trabalho.** Colocar 25 µL da solução padrão de estoque de Triton X-100 em 0,5 mL do placebo de CTLA4^{A29YL104E} Ig. Misturar totalmente através de sujeição a turbilhamento ou outro meio apropriado. Solução de padrão de trabalho contém aproximadamente 5 ppm (ou 5 µg/mL em peso/vol.) de Triton X-100.
- 15

NOTA: As soluções de padrão deverão ser preparadas frescas diariamente.

Preparo de amostra. A amostra é usada como está. O placebo deverá ser operado junto com a(s) amostra(s).

- 20 **Extração de Triton X-100 de Soluções de Padrão e Amostra.** As etapas de extração descritas abaixo são realizadas sob um vácuo de 3-5 polegadas de Hg.

- Ativação do Meio de Extração de Fase Sólida (SPE).** Levantar a tampa do manifold de vácuo e colocar tubos de ensaio na prateleira dentro do manifold. Esses são tubos de ensaio de "resíduo". Recolocar a tampa e colocar tubos de SPE sobre o manifold de vácuo, certificando-se de que há um tubo de ensaio de "resíduo" por baixo de cada tubo de SPE. Adicionar um mL de acetonitrilo a cada tubo e aplicar vácuo aos tubos até que todo o acetonitrilo tenha passado através do leito de meio. Repetir etapa. Concentrar o Triton X-100 sobre o Meio SPE a partir da Matriz de Padrão/Amostra.
- 25
- 30 Em tubos de SPE ativados separados, pipetear 0,50 mL de cada da solução de padrão de trabalho, amostras e placebo. Aplicar vácuo aos tubos de SPE

até a solução ter passado completamente através do leito de meio. Remover a proteína residual do Leito de SPE. Adicionar um mL de água a cada tubo de SPE e aplicar vácuo aos tubos até que a água tenha passado através do leito de meio. Repetir etapa. Eluir o Triton X-100 do Leito de SPE. Desligar o vácuo para o manifold para levar a unidade para a pressão normal. Levantar gentilmente a tampa do manifold, com os tubos de SPE de padrão e amostra ainda presos. Substituir os tubos de ensaio de "resíduo" por um conjunto de tubos de ensaio pré-rotulados (para padrão, placebo e amostras) para coletar qualquer Triton X-100 que possa ter eluído dos Leitos de SPE nas etapas seguintes. Esses são os tubos de ensaio de eluato. Recolocar a tampa do manifold, certificando-se de que cada Leito de SPE de amostra, placebo e padrão tem o respectivo tubo de ensaio de eluato por baixo. Adicionar 0,50 mL acetonitrilo a cada tubo de SPE e aplicar vácuo aos tubos até que todo o acetonitrilo tenha passado através do leito de meio. Desligar o vácuo para o manifold e levantar a tampa para recuperar os tubos de ensaio de eluato. Colocar os eluatos de acetonitrilo do padrão, amostras e placebo em frascos para amostrador automático para injeção no sistema cromatográfico.

ADEQUABILIDADE DE SISTEMA

Equilibrar a coluna/sistema com a fase móvel durante cerca de uma hora antes de iniciar as injeções. Obter o cromatograma da solução de padrão. O tempo de retenção para Triton X-100 deverá ser 5 ± 1 minutos. A eficiência da coluna para Triton X-100, avaliada como o número de placas teóricas, N , deve ser > 2000 lâminas/coluna quando calculada de acordo com a seguinte equação:

$$N = 16 \left(\frac{t}{w} \right)^2$$

onde:

t é o tempo de retenção do pico de Triton X-100 e w é a largura na linha de base do pico de Triton X-100 obtida através de extrapolação dos lados do pico para a linha de base. Fazer pelo menos três injeções da solução de padrão. O RSD percentual das contagens de área das últimas três injeções não deverá ser mais de 3,0%.

Subtrair o cromatograma de placebo dos cromatogramas de pa-

drão e amostra e proceder os seguintes cálculos:

Concentração de Triton X-100 (ppm) =

Área de amostra

X peso de Triton X100 (mg) X 0,5 ppm

5 *Área de padrão*

onde:

1000 µg 1 25 microlitros 1 mL

0,5 = X X X

1 mg 100 mL 0,5 mL 1000 microlitros

10 **Exemplo 58 – Ensaio para determinação de Teor de DNA celular de CHO em composição de CTLA4-Ig**

Esse procedimento foi desenvolvido para detectar DNA de CHO residual nas amostras de Substância de Fármaco de CTLA4-Ig usando um ensaio de reação em cadeia de polimerase quantitativa em tempo real (qP-
15 CR). PCR é a replicação de uma mistura de DNA. Esse ensaio usou uma sonda fluorogênica para detectar um produto de PCR de CHO específico à medida que ele se acumula durante o ensaio. A taxa de amplificação do produto de PCR é diretamente proporcional à quantidade de DNA de iniciação presente na amostra. O objetivo é detectar a quantidade DNA genômico de
20 CHO nas amostras de Composições de CTLA4-Ig.

A amostra é analisada através de detecção de DNA de CHO em amostras biológicas através de Análise por Reação em Cadeia de Polimerase Quantitativa. Cálculos são realizadas e os resultados são reportados para duas situações representativas nas unidades de pg/mg. Se os resultados
25 são menores do que o limite de quantificação do ensaio, os resultados são reportados como < Q.L. e o Q.L. do ensaio é registrado. Há uma conversão do valor de DNA para picograma / miligrama. O valor de pg/mL é dividido pela concentração da amostra, determinada através da absorbância a 280 nm.

30 Cálculo exemplificativo para a amostra tendo uma concentração de proteína de 50 mg/mL e um valor reportado a partir da Bio-confiança = 0,67 fg/µL.

Etapa 1: Conversão para pg/mL = 0,67 pg/mL

Etapa 2: Conversão para pg/mg = (0,67 pg/mL / 50,0 mg/mL) = 0,013 pg/mg.

Exemplo 59 – Determinação de proteína MCP-1 em Amostras biológicas

5 e em Composições de CTLA4-Ig

O exemplo apresenta métodos usados para quantificar proteína semelhante à MCP-1 residual em amostras biológicas e amostras de CTLA4-Ig.

Materiais:

Anticorpo de neutralização anti-MCP-1 de camundongo de cabra (JE anti-murino [MCP-1])	R&D Systems, (Catálogo No. AB-479-NA), Armazenar a -20°C
---	--

Anti-MCP-1 de rato de coelho	Pepro Tech, (Catálogo No. 500-P76), Armazenar a -20°C
------------------------------	---

Conjugado de HRP/ IgG anti-coelho de cabra (H+L)	Southern Biotech (Catálogo No. 4050-05). Armazenar a 2-8°C
--	--

10 Reagentes

Solução salina tamponada com fosfato (PBS, Tampão de Fosfato a 10 mM, NaCl a 137 mM, KCl a 2,7 mM, pH de 7,3 a 7,5). Preparar de acordo as orientações do fabricante sobre a garrafa. A um vaso de tamanho suficiente, adicionar água com grau para HPLC, pelotas de PBS e uma barra de agitação. Sobre uma lâmina em agitação, misturar até que as pelotas e sal estejam dissolvidos. Ajustar o pH de 7,3 para 7,5 conforme necessário com Hidróxido de sódio ou Ácido clorídrico. Agitar até bem misturado. Filtrar através de uma unidade de filtro descartável de 0,22 µm. Armazenar a solução a 2-8°C durante até 30 dias a partir da data de preparo.

20 MCP-1 (Proteína-1 quimiotática de monócitos) é uma proteína humana a qual exerce um papel no recrutamento de monócitos a locais de

lesão e infecção. Uma proteína pode ser considerada semelhante à MCP-1 baseado na homologia e reatividade cruzada com anticorpos contra a MCP-1. Uma vez que os anticorpos usados no ELISA reconhecem apenas uma porção da proteína alvo, formas truncadas de MCP-1 podem reagir no ensaio mesmo embora elas possam não ser tecnicamente ativas. Assim, qualquer variante de MCP-1 de hêmster a qual reage no ensaio será quantificada de modo que o ensaio detecta MCP-1 de comprimento total e quaisquer variantes de MCP-1 as quais contenham os epítomos corretos. Note que, usando uma mistura de anticorpo policlonal, é mais provável que uma série de epítomos sejam representados.

Solução de Lavagem (Tampão de Fosfato a 1,0 mM, NaCl a 137 mM, KCl a 0,27 mM, pH de 7,3 a 7,5 contendo Tween 20 a 0,01% v/v). A 4,0 L de água destilada ou com grau para HPLC, adicionar uma barra de agitação, 2 tabletes de PBS, 28,8 g de NaCl e 0,4 mL de Tween 20. Misturar gentilmente até que todos os conteúdos estejam dissolvidos. Ajustar o pH de 7,3 para 7,5 conforme necessário com Hidróxido de sódio ou Ácido clorídrico. Armazenar a 2-8°C durante até 30 dias a partir da data de preparo.

Diluyente (PBS, pH de 7,3 a 7,5 contendo BSA a 1% peso/v e Tween 20 a 0,05% v/v). (Por favor, note que isso é uma alternativa ao uso de diluyente comercialmente disponível). A 4 L de solução salina tamponada com fosfato, adicionar uma barra de agitação, 40 g de BSA e 2 mL de Tween 20. Misturar gentilmente até que todos os conteúdos estejam dissolvidos. Filtrar através de um filtro de 0,22 μ m. Armazenar a 2-8°C durante até 30 dias a partir da data de preparo quando armazenado sem abrir ou 7 dias após abrir.

Reagente de revestimento de lâmina. Reconstituir vários frascos de anticorpo anti-MCP-1 de camundongo de cabra conforme as instruções do fabricante, misturar invertendo gentilmente várias vezes e combinar. Preparar alíquotas e armazenar a -20°C durante até um ano (não exceder a data de expiração do fabricante). Evitar congelamento e descongelamento repetidos. Alternativamente, os frascos com amostra liofilizada podem ser

armazenados a -20°C durante mais de seis meses. Quando de reconstituição, o anticorpo pode ser armazenado a $2-4^{\circ}\text{C}$ durante um mês.

5 **Reagente secundário.** Reconstituir um frasco de anticorpo anti-MCP-1 de rato de coelho conforme as instruções do fabricante, misturar invertendo gentilmente várias vezes. A solução é armazenada a $2-8^{\circ}\text{C}$ durante até quatro semanas. Alternativamente, os frascos com amostra liofilizada são estáveis a -20°C durante mais de um ano.

10 **Reagente terciário.** Empoçar vários frascos de IgG anti-coelho de cabra (H+L) HRP e misturar invertendo gentilmente várias vezes. Preparar alíquotas e armazenar a -20°C durante até 2 anos (não exceder a data de expiração do fabricante). Evitar congelamento e descongelamento repetidos. Uma vez descongelado, o frasco pode ser armazenado a 2 a 8°C durante até 30 dias.

15 **Preparo de Padrões.** A partir do estoque de Proteína semelhante à MCP-1, preparar uma solução a $25,6$ ng/mL em diluente e diluir a partir daí em etapas de diluição serial (2 vezes) para $12,8$, $6,4$, $3,2$, $1,6$, $0,8$ e $0,4$. 0 ng/mL de padrão é diluente não diluído.

20 Exemplo para o preparo de Padrões usando Material de referência MCP-1 com uma concentração de estoque de $0,97$ mg/mL:

a) (Solução A) Preparar $2,5$ mL de 5200 ng/mL em diluente:

$13,4$ uL de estoque + $2,487$ mL de Diluente

b) (Solução B) Preparar $3,9$ mL de $25,6$ ng/mL em diluente:

$19,2$ uL de estoque a + $3,881$ mL de Diluente

25 Preparar os padrões restantes usando os volumes definidos abaixo:

Solução de Trabalho	Volume (mL)	Dilute Concentração	
		Final (mL)	(ng/mL)
25,6 ng/mL	1 mL	0	25,6 ng/mL
5 25,6 ng/mL	1 mL	1 mL	12,8 ng/mL
12,8 ng/mL	1 mL	1 mL	6,4 ng/mL
6,4 ng/mL	1 mL	1 mL	3,2 ng/mL
3,2 ng/mL	1 mL	1 mL	1,6 ng/mL
1,6 ng/mL	1 mL	1 mL	0,8 ng/mL
10 0,8 ng/mL	1 mL	1 mL	0,4 ng/mL

Misturar cada solução através de turbilhamento em ajuste médio durante aproximadamente 2 - 3 segundos e, então, gentilmente invertendo 2 - 3 vezes.

Preparo de Amostras de controle de qualidade. Preparar amostras de Controle de Qualidade (QC) a partir de um frasco de Proteína semelhante à MCP-1 em diluente. Preparar uma concentração de estoque de solução a 520 ng/mL a partir da qual as seguintes amostras de controle de qualidade para congelamento são feitas: 11,0 ng/mL, 5,3 ng/mL e 1,2 ng/mL. Diluir conforme descrito na tabela abaixo.

20 Exemplo para o preparo de QCs usando Material de referência MCP-1 com uma concentração de estoque de 0,97 mg/mL:

- a) (Solução A) Preparar 2,5 mL de 5200 ng/mL em diluente:
13,4 μ L de estoque + 2,487 mL de Diluente
- b) (Solução B) Preparar 5,0 mL de 520 ng/mL em diluente:
25 500 μ L de estoque a + 4,500 mL de Diluente
- c) Preparar diluição final de amostras de QC de proteína semelhante à MCP-1 como segue:

Identificação de QC	Concentração d MCP-1 (ng/mL)	Solução de QC B a adicionar (μ L)	Quantidade de Diluente a adicionar (mL)	Volume total (mL)
QC 1	11,0	106	4,894	5,0
QC 2	5,3	53	5,147	5,2
QC 3	1,2	12	5,188	5,2

Misturar cada solução através de turbilhamento em ajuste médio durante aproximadamente 2 - 3 segundos e, então, gentilmente invertendo 2 - 3 vezes.

5 **Preparo de Amostras de teste.** Cada amostra de teste consiste de artigo de teste diluído. Amostras de teste são preparadas através da adição de 200 μ L da amostra de teste a 200 μ L de diluente. Misturar cada solução através de turbilhamento em velocidade média durante aproximadamente 2 - 3 segundos e, então, gentilmente invertendo 2 - 3 vezes.

10 **Procedimento.** Revestir a lâmina. Diluir anticorpo anti-MCP-1 de camundongo de cabra para 5 μ g/mL com PBS. Misturar o anticorpo e solução de PBS através de turbilhamento em ajuste médio durante aproximadamente 2 - 3 segundos e, então, gentilmente invertendo 2 - 3 vezes. Usando uma pipeta com múltiplos canais, adicionar 100 μ L dessa solução a cada cavidade. Cobrir as lâminas com vedantes para lâmina e incubar em temperatura ambiente durante 12 a 18 horas. Lavar a lâmina. Lavar as lâminas três
15 vezes com Solução de Lavagem usando um lavador de lâminas. Ajustar o lavador em três lavagens, 300 μ L/cavidade com um tempo de embebibimento zero. Alternativamente, as lâminas podem ser lavadas manualmente. Adicionar 300 μ L de Solução de Lavagem a cada cavidade de cada lâmina usando
20 uma pipeta com múltiplos canais. Esvaziar as cavidades sacudindo em uma pia e blot gentilmente sobre papéis toalha. Repetir três vezes.

Bloqueio de lâmina. Adicionar 300 μ L de CSBB a cada cavidade usando uma pipeta com múltiplos canais. Incubar as lâminas durante aproximadamente 60 \pm 10 minutos em temperatura ambiente.

25 **Adição de Amostras.** Adicionar padrões de referência, controles de qualidade (dois conjuntos de cada concentração) e amostras de teste à lâmina, em triplicata, 100 μ L/cavidade e incubar durante aproximadamente 60 \pm 10 minutos em temperatura ambiente. Não usar as cavidades externas. Preparar anticorpo secundário anti-MCP-1 de rato de coelho. Diluir estoque
30 de anticorpo anti-MCP-1 de rato de coelho para 2 μ g/mL ou diluição apropriada (conforme testagem de equivalência de lote ou COA) em diluente em um volume suficiente para as lâminas usadas no ensaio. Submeter a turbi-

lhonamento a solução aproximadamente 2-4 segundos em velocidade média. Repetir a lavagem de lâmina, mas lavar cinco vezes. Usando uma pipeta com múltiplos canais, adicionar 100 μ L da solução de anticorpo secundário a cada cavidade e incubar durante 60 \pm 10 minutos em temperatura ambiente. Preparar solução de anti-conjugado de HRP terciário de coelho de cabra (0,5 μ g/mL ou diluição apropriada) usando diluente. Misturar conjugado de HRP através de turbilhamento em ajuste médio durante aproximadamente 2 - 3 segundos e, então, gentilmente invertendo 2 - 3 vezes. Diluir para a concentração estabelecida conforme o SOP do departamento para qualificação de reagentes. Repetir a lavagem de lâmina cinco vezes. Usando uma pipeta com múltiplos canais, adicionar 100 μ L de conjugado de HRP a cada cavidade e incubar em temperatura ambiente no escuro durante aproximadamente 30 \pm 5 minutos. Repetir a lavagem de lâmina cinco vezes. Usando uma pipeta com múltiplos canais, adicionar 100 μ L de TMB a cada cavidade e incubar em temperatura ambiente no escuro durante aproximadamente 2,5 - 4 minutos. Usando uma pipeta com múltiplos canais, parar a reação de TMB através da adição de 100 μ L de H₂SO₄ a 1,0N na mesma ordem conforme a adição de TMB foi feita. Ler as densidades ópticas a 450 nm com um comprimento de onda de referência de 630 nm sobre um leitor para lâminas com 96 cavidades.

Valores exemplificativos. Os valores exemplificativos para os padrões se aplicam àqueles valores em ou acima do limite quantitativo (QL) (0,8 ng/mL), uma vez que valores abaixo do QL são usados apenas para ajudar a estabelecer os extremos da curva. A média, usando o cálculo abaixo, base (o zero ng/mL de padrão) devem ser \pm 0,1 unidades de absorção.

$$\frac{X_1 + X_2 + X_3 \dots X_n}{N}$$

onde:

$X_{1,2,3}$ = um valor específico em um conjunto de dados

N = número de valores em um conjunto de dados

Cada concentração de padrão usada para determinar a curva padrão, excluindo o zero, 0,4 e o QL (0,8 ng/mL) devem estar dentro de 15%

do valor alvo (nominal). O coeficiente de variância (CV%) dos valores AB_{450} em triplicata em cada concentração de padrão usada para determinar a curva padrão, com exceção do zero, 0,4 e o QL (0,8 ng/mL), devem ser $\leq 15\%$. A concentração média calculada de MCP-1 para a amostra de teste de composição de CTLA4-Ig deverá ser $\leq 11,0$ ng/mL. Se a concentração média calculada de MCP-1 é $\leq 0,8$ ng/mL (o QL de ensaio) calcular a CV% das determinações em triplicata e os valores exemplificativos devem ser $\leq 20\%$. Se os valores exemplificativos são reunidos, a concentração média de MCP-1 é usada para computar ppm. Se a concentração calculada de MCP-1 é $\leq 0,8$ ng/mL (QL de ensaio), a amostra é reportada como $< QL$ e o valor " $< 0,8$ ng/mL" é usado na computação de ppm. A CV% da determinação em triplicata não é considerada.

A amostra de QC é definida como um conjunto de três cavidades na concentração estabelecida, portanto, para as três concentrações nominais estabelecidas nesse método, há um total de seis amostras de QC. As concentrações de pelo menos duas das três cavidades para uma amostra de QC devem estar de 20% da concentração nominal estabelecida para que a amostra de QC seja aceitável. Pelo menos doze das dezoito determinações de amostra de QC devem estar dentro de 20% de seus respectivos valores alvo. Seis das dezoito amostras de QC (não três na mesma concentração) podem se desviar mais de 20% do respectivo valor nominal. Pelo menos quatro das seis amostras de QC devem ser aceitáveis. Duas são permitidas como sendo inaceitáveis, contanto que elas não estejam ambas na mesma concentração.

25 Avaliação de dados. Usar o Software Softmax[®] com o arquivo de protocolo MCP-1.ppr para construir uma curva padrão usando uma regressão com quatro parâmetros ponderada da forma.

onde:

30 A = valor de absorvância₄₅₀ correspondendo ao assíntota mínimo
 D = valor de Absorvância₄₅₀ correspondendo ao assíntota máximo

c = Concentração correspondendo à metade da diferença absoluta entre os valores assintóticos máximo e mínimo

b = o declínio aproximado da porção linear da curva

x = concentração de padrão de referência

5 **Cálculos para a concentração de Proteína semelhante à**

MCP-1. A quantidade de Proteína semelhante à MCP-1 na amostra de teste pode ser calculada usando o Software Softmax lâmina Reader. O exemplo abaixo ilustra como os resultados finais podem ser reportados. Uma diluição de duas vezes de cada amostra é ensaiada. A concentração calculada é multiplicada pelo fator de diluição apropriado (2) a fim de proporcionar a concentração no artigo de teste não diluído.

Exemplos:

1) Amostra de teste diluída é 10,0 ng/mL.

15 Concentração de proteína semelhante à MCP-1 em um artigo de teste não diluído é:

$10 \text{ ng/mL} \times 2 = 20 \text{ ng/ml de MCP-1}$

2) Resultado da amostra diluída é "<0,8 ng/mL".

20 Concentração de proteína semelhante à MCP-1 em um artigo de teste não diluído é:

"<0,8 ng/mL" $\times 2 =$ "<1,6 ng/mL" de MCP-1

Para reportar o resultado final em ng de proteína semelhante à MCP-1 por mg de amostra (ppm), dividir o resultado obtido acima pela concentração não diluída de amostra.

25 Exemplos:

1) Concentração de teste de amostra de proteína = 50 mg/mL

Concentração de proteína semelhante à MCP-1 = 200 ng/mL:

$200 \text{ ng/ml de MCP-1} / 50 \text{ mg/mL} = 4 \text{ ng/mg}$

A amostra é reportada como 4 ppm (partes por milhão)

30 2) Concentração de teste de amostra de proteína = 50 mg/mL

Concentração de proteína semelhante à MCP-1 = "<1,6 ng/mL":

"<1,6 ng/mL" MCP-1 / 50 mg/mL = "<0,032 ng/mg"

A amostra é reportada como "<QL,(<0,032 ppm)".

Exemplo 60: Ensaio para determinação de níveis residuais de proteína CD-CHO1 através de ELISA para testagem de liberação de material de Substância de Fármaco de CTLA4-Ig

5 **Tampão de Carbonato.** A um vaso adequado contendo uma barra de agitação, adicionar: 200 mL com água com grau para HPLC, para fazer 2 cápsulas de Tampão de Carbonato. Usando uma placa de agitação, misturar até o material estar em solução. Usando um medidor de pH, ajustar o pH para 9,6 conforme necessário com NaOH a 1N ou H₂SO₄. Usando uma
10 - placa de agitação, misturar a solução durante um mínimo de 5 minutos. Filtrar a solução através de um filtro de 0,22 µm. Armazenar a solução a 2 - 8°C durante até 30 dias e rotular conforme os procedimentos do departamento.

Tampão de Lavagem (PBS contendo Tween 20 a 0,05% v/v, pH de 7,4). A uma garrafa de 4 L de água com grau para HPLC com uma
15 barra de agitação, adicionar 20 tabletes de PBS. Adicionar 2 mL de Tween 20. Usando uma placa de agitação, misturar até o material estar em solução. Usando um medidor de pH, ajustar o pH para 7,4 conforme necessário com NaOH a 1N ou HCl a 1N. Usando uma placa de agitação, misturar a solução
20 durante um mínimo de 5 minutos. Armazenar a solução a 2 - 8°C durante até 30 dias e rotular conforme os procedimentos do departamento.

Estreptavidina-HRP. Adicionar 0,5 mL de água com grau para HPLC a um frasco de Estreptavidina-HRP. Para misturar, tampar o frasco e submeter a turbilhonamento gentilmente durante aproximadamente 10 se-
25 gundos. Adicionar 0,5 mL de glicerol ao frasco de Estreptavidina-HRP. Misturar. Verificar a clareza da solução extraíndo a solução em uma pipeta de Pasteur limpa. Se a solução não está clara, misturar conforme 3.3.2 e repetir 3.3.5 até que a solução esteja clara. Determinar o esquema de diluição apropriado a ser usado para o lote de Estreptavidina HRP de acordo com os
30 procedimentos do departamento. Transformar em alíquotas volumes de 20 µL em tubos com tampa de rosca de 0,5 mL. Tampar e colocar em uma caixa de armazenamento de células. Armazenar a solução a - 20° C durante

até 365 dias e rotular conforme os procedimentos do departamento.

Solução de Término (H₂SO₄ a 1 N). Em uma coifa, colocar um recipiente adequado sobre uma placa de agitação. Adicionar uma barra de agitação. Adicionar 485,6 mL de água com grau para HPLC. Ligar a placa de agitação para iniciar a agitação de água. Adicionar lentamente 14,4 mL de H₂SO₄ concentrado. A solução é estável durante 90 dias quando armazenada em temperatura ambiente. Rotular a solução conforme os procedimentos do departamento.

Procedimento. Revestir a lâmina. Preparar uma solução a 8 µg/mL de anticorpo anti-CD CHO1 de coelho purificado em Tampão de Carbonato a ser usado para revestimento de lâminas de microtitulação (10 mL de solução são requeridos por lâmina de microtitulação). Adicionar 100 µL dessa solução a cada cavidade de uma lâmina de microtitulação Immulon 4 usando uma pipeta com múltiplos canais. Cobrir a lâmina de microtitulação com parafilme e incubar a 2-8°C durante 18 □ 2 horas.

Lavagem de lâmina. Lavar a lâmina três vezes com 300 µL de tampão de lavagem usando um instrumento para lavagem de lâminas. (Alternativamente, a lâmina pode ser lavada manualmente usando uma pipeta com múltiplos canais.) Após a última lavagem, a lâmina deverá ser virada para baixo e seca sobre uma toalha de papel colocada sobre uma superfície rígida.

Bloqueio de lâmina. Usando uma pipeta com múltiplos canais, adicionar 300 µL de SeaBlock a cada cavidade. Incubar a lâmina no escuro durante 1 hora (□ 6 minutos) em temperatura ambiente. As lâminas devem ser enroladas com folha de alumínio ou colocadas em uma câmara ou secador. Preparar amostras de Curva Padrão usando Diluente Teknova em tubos de polipropileno estéreis graduados de 15 mL de acordo com o esquema de diluição abaixo.

Nota: O esquema de diluição abaixo é para 5 lâminas. Ajustar os volumes conforme necessário para o número de lâminas no ensaio.

Obter a concentração de proteína do Padrão de Referência de proteína CD-CHO1 (Padrão de Referência) do Certificado de Análise (COA).

Preparar uma solução a 30 µg/mL de Padrão de Referência de proteína CD-CHO1. Calcular o volume requerido de Padrão de Referência de proteína CD-CHO1 para obter uma solução a 30 µg/mL. O volume mínimo de transferência para o Padrão de Referência de proteína CD-CHO1 deverá ser de 10 µL.

5

Concentração desejada x volume desejado

Fórmula: Volume =

Concentração de material de referência

Nota: Assegurar que as unidades são compatíveis.

$$\frac{30 \mu\text{g/mL} \times 10 \text{ mL}}{25 \text{ mg/mL}} = 12 \mu\text{L}$$

10 **Exemplo:**

Calcular o volume de Diluente subtraindo o volume requerido de Padrão de Referência de proteína CD-CHO1 do volume desejado.

Fórmula: (Volume desejado) - (volume do Padrão de Referência) = (Volume de diluente)

15 **Exemplo:** 10,0 mL – 0,012 mL = 9,988 mL de Diluente

Adicionar o volume calculado de Padrão de Referência de proteína CD-CHO1 a um tubo estéril de 15 mL o qual contém um volume calculado de diluente. Tampar o tubo e submeter a turbilhonamento em um ajuste entre durante 2 – 4 segundos. Preparar os padrões restantes. A tabela abaixo é mostrada como um exemplo:

20

Concentração de trabalho (ng/mL)	Volume (mL)	Diluente (mL)	Volume total (mL)	Concentração (ng/mL)
30,000	0,6	5,4	6,0	3,000
3,000	2,0	4,0	6,0	1,000
1,000	2,0	4,0	6,0	333,3
333,3	2,0	4,0	6,0	111,1
111,1	2,0	4,0	6,0	37,0
37,0	2,0	4,0	6,0	12,3
12,3	4,0	2,0	6,0	8,2
NA	NA	4,0	4,0	0

Tampar o tubo após cada etapa de diluição e submeter a turbilhonamento gentilmente durante 2 – 4 segundos antes de prosseguir para a próxima etapa de diluição.

- Preparar Soluções de Controle de Qualidade (QC) usando Diluente Teknova em tubos de polipropileno estéreis graduados de 15 mL de acordo com o esquema de diluição abaixo. Obter a concentração de proteína do Material de referência de proteína CD-CHO1 (Mat ref) do Certificado de Análise (COA). Preparar uma solução a 30 µg/mL de Padrão de Referência de proteína CD-CHO1 (Mat ref). Tampar o tubo e submeter a turbilhonamento em um ajuste entre durante 2 – 4 segundos. Preparar soluções de QC nas concentrações de 700, 100 e 25 ng/mL. Um esquema de diluição exemplificativo é mostrado abaixo:

	Concentração de trabalho (ng/mL)	Volume (mL)	Diluente (mL)	Volume total (mL)	Concentração (ng/mL)
QC 1	30,00	0,233	9,767	10,0	700
QC 2	700	1,430	8,570	10,0	100
QC 3	100	2,500	7,500	10,0	25

- Tampar o tubo para cada solução de QC e submeter a turbilhonamento gentilmente durante 2 – 4 segundos. Soluções de Controle de Qualidade podem ser preparadas frescas no dia do ensaio ou elas podem ser transformadas em alíquotas e congeladas. Determinar a concentração real das três soluções de QC em três experimentos independentes. Calcular a média dos resultados dos três experimentos para cada solução de QC e emitir um COA para cada uma das três soluções de QC. Essas concentrações de QC experimentalmente determinadas têm de ser usadas como valores alvo quando se realiza análise sobre amostras de CTLA4-Ig. Armazenar as soluções de QC em alíquotas prontas para uso a -70°C. Soluções de QC expiram 6 meses após preparo. Remover as soluções de QC do armazenamento no dia de ensaio e descongelar em temperatura ambiente. Submeter a turbilhonamento as soluções de QC descongeladas em velocidade média durante 2-4 segundos antes de uso.

- Preparo de amostra.** Preparar aproximadamente a 12,5 mg/mL de solução para cada amostra de CTLA4-Ig a ser analisada em diluente através da adição de 250 µL de amostra de Substância de Fármaco a 750 µL de diluente. Tampar o tubo e submeter a turbilhonamento gentilmente duran-

te 2 – 4 segundos. Preparar uma solução a 6,25 mg/mL para cada amostra de CTLA4-Ig a ser analisada através da adição de 400 da solução a 12,5 mg/mL a um tubo contendo 400 μ L de diluente. Tampar o tubo e submeter a turbilhamento gentilmente durante 2 – 4 segundos. Preparar uma solução a 3,125 mg/mL para cada amostra de CTLA4-Ig a ser analisada através da adição de 400 da solução a 6,25 mg/mL a um tubo contendo 400 μ L de diluente. Tampar o tubo e submeter a turbilhamento gentilmente durante 2 – 4 segundos. Lavar a lâmina repetindo a etapa de lavagem. Adicionar 100 μ L por cavidade de cada concentração de soluções de padrão, amostras e QC em triplicata à lâmina bloqueada e lavada. Cada solução de QC é adicionada duas vezes a um total de seis cavidades por lâmina. Incubar durante 1 hora no escuro (\square 6 minutos) em temperatura ambiente. Repetir a lavagem 5 vezes. Remover a Estreptavidina-HRP do congelador e deixar ir para a temperatura ambiente. Diluir anticorpo anti-CD CHO1-Biotina de coelho para 2 μ g/mL em Tampão Teknova. Submeter a turbilhamento a solução aproximadamente 2-4 segundos em velocidade média. Usando uma pipeta com múltiplos canais, adicionar 100 μ L por cavidade. Incubar durante 1 hora (\square 6 minutos) no escuro em temperatura ambiente. Diluir a Estreptavidina-HRP para a concentração estabelecida para uso no ensaio baseado na qualificação do lote de reagente conforme o procedimento do departamento. Tampar e submeter a turbilhamento a solução aproximadamente 2-4 segundos em velocidade média. Usando uma pipeta com múltiplos canais, adicionar 100 μ L de diluição de Estreptavidina-HRP a cada cavidade. Incubar em temperatura ambiente no escuro durante 1 hora (\square 6 minutos). Repetir. Usando uma pipeta com múltiplos canais, adicionar 100 μ L de cromogênio TMB a cada cavidade. Incubar em temperatura ambiente durante 2 minutos (\square 12 segundos). Usando uma pipeta com múltiplos canais, adicionar 100 μ L/cavidade de Solução de Término (H_2SO_4 a 1 N). Adicionar Solução de Término às lâminas e cavidades na mesma ordem em que o cromogênio foi adicionado para assegurar os mesmos tempos de reação de cromogênio com a enzima em cada cavidade. Usando um leitor para lâmina SpectraMax Plus, medir a absorbância a 450 nm com um comprimento de onda de referência de 630

nm sobre um leitor para lâmina com 96 cavidades apropriado.

Avaliação de dados. Refira-se ao *template* do programa Soft-Max, uma vez que ele gera a média, desvios padrões e CVs %, etc. Determinar cada um dos valores exemplificativos usando os valores de absorvância em triplicata obtidos para cada referência, QC e diluições de amostra ensaiada. Gerar a Curva Padrão. Modelar os dados de Padrão de Referência usando uma regressão com quatro parâmetros da forma.

$$AB = \frac{\text{min} - \text{max}}{1 + \left(\frac{C}{ED_{50}} \right)^B}$$

onde:

- 10 AB = Absorvância a 450 nanômetros
 A = Valor de absorvância correspondendo ao assíntota mínimo
 D = Valor de absorvância correspondendo ao assíntota máximo
 15 c = Concentração correspondendo à metade da diferença absoluta entre os valores assintóticos máximo e mínimo
 B = o declínio aproximado da porção linear da curva
 x = Concentração de material de referência CD-CHO1

Determinar o coeficiente de determinação (R^2) da linha de regressão para os padrões usando a média calculada usando a fórmula acima. Calcular a concentração de CD-CHO1 nas amostras. Multiplicar os resultados médios da amostra pelo fator de diluição apropriado (isto é, 4, 8 e 16) para obter a concentração de CD-CHO1 na amostra original em ng/ml. Dividir o resultado pela concentração de proteína de CTLA4-Ig reportada (mg/ml) para obter a concentração de CD-CHO1 em ng/mg de CTLA4-Ig. Determinar a média de todos os resultados, a qual cai dentro da faixa da curva padrão. Calcular a concentração de proteína CD-CHO1 na amostra não diluída aplicando o fator de diluição. Para determinar a concentração de proteína CD-CHO1 com relação à concentração de amostra de CTLA4-Ig, dividir pela concentração não diluída.

20
25
30

Cálculo exemplificativo:

Resultado médio da amostra 235 ng de CD CHOP/mL

= 4,7 ng/mg

BMS – concentração de 188667 50 mg/mL

- 5 **Nota:** ng de CD/mg de produto de CHO1 (ng/mg) é equivalente a partes por milhão (ppm).

Valores exemplificativos. Valores exemplificativos para os padrões. O coeficiente de determinação (R^2) para a Curva Padrão deverá ser $\geq 0,99$. A base média para o padrão de zero ng/mL deverá ser $\leq 0,10$ unidades de absorção. A média dos valores calculados (ng/mL) em cada concentração de padrão usada para determinar a curva padrão, excluindo zero e concentrações abaixo QL (12,3 ng/mL), deve estar dentro de 20% do valor alvo (nominal), conforme determinado pelo software. O coeficiente de variação (% CV) dos valores de absorbância em triplicata em cada concentração de padrão usada para determinar a curva padrão, excluindo zero e concentrações abaixo QL (12,3 ng/mL), devem ser menos de 20%, conforme determinado pelo software. Para assegurar que pelo menos dois pontos de dados congruentes estão disponíveis para cálculo, os padrões, controles de qualidade e amostras são carregados em cavidades em triplicata. Analisar cada valor em triplicata separadamente. Reduzir o valor que repousa mais distante do alvo.

Exemplo:

	<u>Valor alvo (ng/mL)</u>	<u>Valor real (ng/mL)</u>
	50	25
25		48
		49

O único valor que está mais distante do valor alvo de 50 ng/mL é 25 ng/mL. eliminando o valor de 25 ng/mL da triplicata, a média dos valores restantes irá de encontro aos valores exemplificativos.

30 Se é mostrado que a média dos dois valores restantes ainda não vão de encontro aos valores exemplificativos, então, o ponto único é elimi-

nado e a curva é recalculada.

Exemplo:

<u>Valor alvo (ng/mL)</u>	<u>Valor real (ng/mL)</u>
50	10
	10,5
	25

O valor médio é >20% do alvo, a despeito de qual valor é eliminado, portanto, o ponto único cai da curva e a curva será recalculada. Apenas 2 pontos sobre a curva padrão podem ser eliminados.

Valores exemplificativos para amostras de QC. A amostra de QC é definida como um conjunto de três cavidades na concentração estabelecida, portanto, para as três concentrações nominais estabelecidas nesse método, há um total de seis amostras de QC. Pelo menos duas das três cavidades para uma amostra de QC devem estar dentro de 20% do nominal para que a amostra de QC seja aceitável. Pelo menos quatro das seis amostras de QC devem estar dentro de 20% de suas respectivas concentrações alvo; duas das seis amostras de QC (não duas na mesma concentração) podem exceder o desvio de 20% do nominal, conforme calculado pelo software. Não mais do que 6 das 18 cavidades com amostra de QC podem se desviar mais de 20% das respectivas concentrações alvo.

Valores exemplificativos para amostras de teste. A absorbância média para a amostra de teste ensaiada deve ser menor do que o maior ponto sobre a curva padrão. Se a absorbância média da amostra excede a absorbância média de 3000 ng/mL de padrão, a amostra de teste deve ser diluída suficientemente de modo a obter uma absorbância média entre 3000 e 12,3 ng/mL. A absorbância média de pelo menos uma de três diluições de amostra (12,5, 6,25 e 3,125 mg/ml) deve cair dentro da faixa da curva padrão para um resultado reportável, a menos que a absorbância média para todas as diluições esteja abaixo a absorbância média da QL (12,3 ng/mL de padrão). Nesse caso, as amostras de teste são reportadas como < QL. A média dos valores de absorbância em triplicata da diluições de amos-

tra que é maior do que a QL e cai dentro da faixa da curva padrão deve exibir uma CV de menos de 20%, conforme determinado pelo software. Se, quando de eliminação de uma das absorbâncias em triplicata e recálculo da CV ainda é > 20% ou se duas diluições de amostra têm CV's para a absorbância maior do que 20% e cai dentro da faixa da curva padrão, a análise
5 dessa amostra deve ser repetida.

Exemplo 61 – Ensaio para quantidade residual de Triton X-100 na composição de CTLA4-Ig

Materiais

Frascos para HPLC

Waters, Kit Total Recovery Vial, Tampa de rosca com septo de silicone/PTFE pré-dividido ligado (Catálogo 186000385)

Tubos de extração em fase sólida

Nota: Frascos de vidro são requeridos

Waters OASIS HLB, 30 mg/1 cc, (Catálogo No. WAT094225)

Coluna

Thermo Electron Corp. SAS Hypersil, 5 μ , 4,6 x 250 mm (Número de parte 30505-254630)

10

Instrumentação

Cromatografia de líquido
Detector

Módulo de Separação Waters 2695
Detector de UV com Comprimento de Onda Duplo Waters 2487

Processador de Coluna de SPE
Balança Analítica

Manifold a Vácuo JT Baker, Modelo Spe-21
Qualquer balança capaz de pesar precisamente 0,01 mg

Integração

Waters Empower Data System

Preparo de Reagentes

Preparo de Fase móvel: Acetonitrilo: Água (80: 20). Para 1L, misturar completamente com uma barra de agitação, 800 mL de acetonitrilo e 200 mL de água purificada ou com grau para HPLC. Filtrar através de um
15 filtro de náilon de 0,2 μ m. Desgaseificar a fase móvel usando um desgaseificador *in-line*, tal como um Alliance System ou usando purgação com hélio. Preparar fresca diariamente.

NaOH a 2N. Pesar e quantitativamente transferir 80 \square 1 g de NaOH sólido para um frasco de 1 L. Compor o volume com água purificada ou com grau para HPLC. Misturar bem com uma barra de agitação e filtrar
20 através de um aparelho com filtro de 0,22 μ m. Alternativamente, diluir seriamente o NaOH em uma solução a 10N. Armazenar até 6 meses em tempe-

ratura ambiente.

Tampão de Substância de Fármaco. Pesar e transferir quantitativamente 3,45 g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ e 2,92 g de NaCl para um frasco de 1 L. Adicionar aproximadamente 800 mL de água purificada ou com grau para HPLC. Misturar bem com uma barra de agitação e compor o volume com água purificada ou com grau para HPLC. Ajustar o pH para 7,5 com NaOH a 2N. Filtrar a solução através de uma unidade de filtro de 0,22 μm . Armazenar até 4 meses a 4°C.

Preparo de Padrão de placebo de amostra. Qualquer amostra ou material de referência de CTLA4-Ig previamente analisado e verificado como não contendo níveis detectáveis de Triton X-100 pode ser usado como o Placebo de Amostra. A proteína de Placebo de Amostra deverá ser operada junto com a(s) amostras(s). Triton X-100 dissolve lentamente em água. Examinar a solução com relação à dissolução completa (tipicamente após 15 minutos) antes de uso. Triton X-100 é mais viscoso do que a água, de modo que quantidades não dissolvidas são visíveis na presença de água.

Preparo de Padrão de Estoque de Triton X-100 a 10,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ #1. Pesar precisamente 10,0 \pm 1,0 mg de Triton X-100 em um frasco volumétrico de 100 mL e diluir até o volume com água; e misturar gentilmente com uma barra de agitação. Rotular como Padrão de Estoque de TX100 A. Tomar 10 mL de Padrão de Estoque de TX100 A em um frasco volumétrico de 100 mL. Diluir até o volume com água. Rotular como Padrão de Estoque de TX100 #1. Preparar fresca diariamente.

Preparo de Padrão de Estoque de Triton X-100 a 10,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ #2. Pesar precisamente 10,0 \pm 1,0 mg de Triton X-100 em um frasco volumétrico de 100 mL e diluir até o volume com água; e misturar gentilmente com uma barra de agitação. Rotular como Padrão de Estoque de TX100 B. Tomar 10 mL de Padrão de Estoque de TX100 em um frasco volumétrico de 100 mL. Diluir até o volume com água. Rotular como Padrão de Estoque de TX100 #2. Preparar fresca diariamente.

Preparo de Solução de Avaliação de Adequabilidade de sistema de TX100#1 (SS#1). A partir do Padrão de Estoque de TX100 #1, pre-

parar uma Solução de Avaliação de Adequabilidade de sistema de TX100 a 5,0 µg/mL através de diluição de 300 µL de Padrão de Estoque de TX100 #1 com 300 µL de acetonitrilo. Misturar bem através de pipeteamento e centrifugação.

- 5 **Preparo de Solução de Avaliação de Adequabilidade de sistema de TX100 #2 (SS#2).** A partir do Padrão de Estoque de TX100 #2, preparar a 5,0 µg/mL de Solução de Avaliação de Adequabilidade de sistema de TX100 através de diluição de 300 µL de Padrão de Estoque de TX100 #1 com 300 µL de acetonitrilo. Misturar bem através de pipeteamento e centrifugação.

10 **Preparo de Controle de passe de TX100, Padrão de Limite, Controle de falha.** A partir do Padrão de Estoque de TX #1, preparar a solução identificada na Tabela abaixo.

	Identificação de solução	Procedimentos de diluição
15	Controle de passe (0,4 µg/mL)	Diluir 20 µL com 480 µL de CTLA4-Ig DS
	Padrão de Limite (0,5 µg/mL)	Diluir 25 µL com 475 µL de CTLA4-Ig DS
	Controle de falha (0,6 µg/mL)	Diluir 30 µL com 470 µL de CTLA4-Ig DS

Preparo de Amostra. A amostra é usada sem concentração ou diluição.

- 20 **Procedimento:** Extração de Triton X-100 do Padrão e Solução de amostra. **CUIDADO:** As etapas de extração descritas abaixo são realizadas sob um vácuo de 3-3,5 polegadas de Hg.

- 25 **Ativação do meio de Extração em Fase Sólida (SPE).** Levantar a tampa do manifold de vácuo e colocar tubos de ensaio de 12 x 75 mm vazios na prateleira dentro do manifold. Esses são tubos de ensaio "residuais". Recolocar a tampa e colocar os cartuchos de SPE sobre o manifold de vácuo, certificando-se de que haja um tubo de ensaio "residual" por baixo de cada tubo de SPE. Adicionar 1000 µL de acetonitrilo a cada cartucho de SPE e aplicar vácuo até que todo o acetonitrilo tenha passado através do
- 30 leito de meio. Repetir com mais 1000 µL de acetonitrilo. Adicionar 500 µL de água purificada ou com grau para HPLC a cada cartucho de SPE e aplicar vácuo até que toda a água tenha passado através do leito de meio. Repetir

com mais 500 μ L de água purificada ou com grau para HPLC.

Concentração de Triton X-100 sobre o Meio de SPE Media para o Padrão de Limite e Controles. Pipetear 500 μ L de cada do Padrão de Limite, Controle de Passe, Placebo de Controle de Falha e amostras separadamente sobre cartuchos de SPE ativados. Aplicar vácuo aos tubos de SPE até que cada solução tenha passado completamente através do leito de meio.

Remoção de Proteína residual do glóbulo de SPE. Adicionar 1000 μ L de água a cada cartucho de SPE e aplicar vácuo aos tubos até a água tenha passado através de do leito de meio. Repetir etapa com mais 1000 μ L de água.

Eluição de Triton X-100 do glóbulo de SPE. Desligar o vácuo para o manifold para liberar a pressão da unidade para zero. Levantar gentilmente a tampa do manifold, com os cartuchos de SPE ainda presos. Substituir os tubos de ensaio "residuais" por um conjunto de tubos de ensaio de "eluato" pré-rotulado ou frascos para amostrador automático (Padrão de Limite, controle de passe, controle de falha, placebo e amostras pré-rotuladas) para coletar qualquer Triton X-100 que elui dos glóbulos de SPE. Recolocar a tampa do manifold, certificando-se de que cada Padrão de Limite, controle de passe, controle de falha, placebo e amostras de cartucho de SPE tenha um respectivo tubo de eluato ou frasco para amostrador automático por baixo. Adicionar 500 μ L de acetonitrilo a cada cartucho de SPE e aplicar vácuo aos tubos até que todo acetonitrilo tenha passado através do leito de meio. Desligar o vácuo para o manifold e levantar a tampa para recuperar os tubos de ensaio de eluato ou frascos para amostrador automático. Se usando tubos de ensaio de eluato, colocar os eluatos de acetonitrilo, Padrão de Limite, controle de passe, controle de falha, placebo e amostras em frascos para amostrador automático para injeção no sistema cromatográfico. Se usando frascos para amostrador automático para coletar o eluato, colocar os frascos diretamente no sistema cromatográfico.

Condições de operação

Comprimento de onda	225 nm
Sensibilidade	0,1 AUFS
Fase móvel	Acetonitrilo: água (80: 20)
Taxa de fluxo	0,8 mL/min
Volume de injeção	25 μ L
Temperatura da coluna	Ambiente (20-25°C)
Tempo de retenção aproximado	Triton X-100: 5,0 \pm 1 minuto
Tempo total de operação	10 minutos
Temperatura do amostrador automático	10 \pm 4°C

Adequabilidade de sistema. Ajustar o sistema cromatográfico; deixar a lâmpada aquecer e equilibrar o sistema com fase móvel durante pelo menos uma hora antes de análise. Injetar SS #1 um mínimo de quatro vezes. Usar a segunda injeção SS #1 para todas as análises de Adequabilidade de sistema, a menos que de outro modo especificado. O tempo de retenção para Triton X-100 deverá ser de 5,0 \pm 1 minutos. A eficiência da coluna para Triton X-100, avaliada como o número de placas teóricas (N), deve ser \geq 2000 lâminas/ coluna quando calculada de acordo com a seguinte equação:

$$AB = \frac{\text{min} - \text{max}}{1 + \left(\frac{C}{ED_{50}} \right)^B}$$

onde:

t = tempo de retenção do pico de Triton X-100 medido a partir do momento de injeção até o momento de eluição do pico máximo.

w = largura do pico de Triton X-100 medido extrapolando os lados do pico para a linha de base.

A resolução entre o pico de Triton X-100 e o pico adjacente mais próximo (se presente) deve ser \geq 1.

onde:

t = tempos de retenção do pico de Triton X-100 e do pico adjacen-

te no padrão

$W =$ larguras correspondentes das bases dos picos obtidos através de extrapolação dos lados dos picos para a linha de base.

- 5 Calcular os fatores de resposta das últimas três injeções SS#1 usando a seguinte equação:

$$R F = \frac{A}{W}$$

onde:

- 10 $A =$ Área de pico de Triton X-100
 $W =$ Peso de Triton X-100 (em mg) usado no preparo da solução padrão de estoque de TX100 correspondente

Os fatores de resposta das últimas três injeções de SS#1 deve ter um desvio padrão relativo (RSD) de $\leq 10\%$. Calcular o RSD% usando a seguinte equação:

- 15 Desvio padrão

$$RSD \% = X 100$$

Média

$$\text{Desvio padrão} = \sqrt{\frac{n\sum x^2 - (\sum x)^2}{n(n-1)}}$$

$$\text{Desvio padrão} = \sqrt{\frac{n\sum x^2 - (\sum x)^2}{n(n-1)}}$$

onde:

- 20 $n =$ número de medições na amostra
 $x =$ medições individuais

- 25 Comparar o fator de resposta da única injeção de SS#2 com o fator de resposta médio das últimas três injeções de SS#1. A diferença percentual entre o fator de resposta de SS#2 e o fator de resposta médio das três injeções SS#1 deve ser $\square 10\%$. Calcular a diferença percentual usando a seguinte equação.

onde:

RF1 = Fator de resposta médio das três injeções SS#1

RF2 = Fator de resposta de SS#2

- Fazer uma única injeção de Amostra Placebo pós-SPE. Se os níveis de Triton X-100 são encontrados, fazer mais duas injeções da amostra de Placebo. Se Triton X-100 está presente, 1 descartar a Substância de fármaco de CTLA4-Ig e fazer novo Padrão de Limite e Controles com um novo lote de Substância de fármaco de CTLA4-Ig previamente analisado e verificar se não contém níveis detectáveis de Triton X-100. Se os valores exemplificativos acima não são obtidos, estender o equilíbrio da coluna durante mais uma hora e re-injetar a solução de padrão. Se os valores exemplificativos ainda não são obtidos, executar as seguintes etapas. Verificar vazamentos certificando-se de que todas as conexões de tubulação estão firmes. Se equilíbrio estendido não funciona, ajustar o teor orgânico da fase móvel e/ou fazer um novo lote da fase móvel e re-preparar a SS#1 e SS#2.
- 10 Trocar a coluna se equilíbrio estendido e/ou ajuste da fase móvel não resultam nos valores exemplificativos requeridos. Antes de repetir, equilibrar durante pelo menos uma hora.

- Seqüência de Injeção.** equilibrar preliminarmente o sistema de HPLC e operar com sucesso o acima. Fazer uma única injeção de tampão para substância de fármaco pós-SPE, referi-se à seção acima, como um placebo de calibração. Observar se não há resposta de Triton X-100. Se um pico está presente no tempo de retenção do pico de Triton X-100, continuar a injetar o placebo até que não haja nenhuma resposta. Fazer uma única injeção de substância de fármaco de CTLA4-Ig pós-SPE, referi-se à seção
- 25 acima, como uma amostra de placebo. Observar se não há resposta de Triton X-100. Esse cromatograma deverá ser subtraído dos cromatogramas de padrão, controle e amostra antes que processamento de dados seja realizado. Fazer injeções em duplicata do Controle de Passe, Padrão de Limite e Controle de Falha. Fazer uma única injeção do tampão para substância de
- 30 fármaco e nenhuma resposta de Triton X-100 deve ser notada. Fazer injeções em duplicata das amostras. As injeções de amostra são colocadas em faixas através de injeções em duplicata de Padrão de Limite e uma injeção

do tampão para substância de fármaco, de modo que não hajam mais de 10 injeções de amostra entre as faixas de Padrão de Limite e injeções de substância de fármaco. O final da operação deve ser terminado com injeções em duplicata do Padrão de Limite e uma injeção do placebo de tampão para substância de fármaco.

5
10
15
20
25

Processamento de dados. Subtrair o cromatograma da injeção de Amostra de Placebo de todos os cromatogramas de padrão, controle e amostra antes de prosseguir com o processamento de dados. Assegurar que os picos de Triton X-100 nos cromatogramas de Padrão de Limite, Controle e amostra são apropriadamente integrados. O pico de Triton X-100 na amostra, se presente, deve estar dentro da mesma janela de tempo de retenção que o Padrão de Limite. Calcular a média da área de pico de cada conjunto de injeções em duplicata. Injeções em duplicata devem ter uma diferença % na área de pico de $\leq 10\%$. Se a injeção em duplicata do Padrão de Limite, Controle de Passe ou Controle de Falha não vão de encontro a esse critério, toda a operação é considerada inválida e precisará ser repetida. Se as injeções em duplicata da amostra falham em ir de encontro a esse critério, a amostra é considerada inválida e precisa ser repetidas. Todas as outras amostras, controle e padrões são considerados validos na medida em que eles vão de encontro ao critério de $\leq 10\%$. A área média de pico para o pico de Triton X-100 em todas as faixas de Padrões de Limite, incluindo as injeções finais, deve estar dentro de 10% da área média de pico do Padrão de Limite. Se qualquer Padrão de Limite intermediário falha em ir de encontro ao requisito de comparação de 10%, todas as amostras analisadas após passar o último Padrão de Limite são consideradas inválidas e devem ser re-analisadas.

30

Avaliação de Padrão de Limite, Controle de Passe, Falha de Amostras de Controle. Comparar as áreas médias de pico de Triton X-100 para o Padrão de Limite, Controle de Passe e Controle de Falha. A área de pico da Amostra de Controle de Falha deve ser maior do que aquela do Padrão de Limite. A área de pico da Amostra de Controle de Passe deve ser menor do que aquela do Padrão de Limite. Se ambas as condições não são

reunidas, continuar a avaliação das amostras.

Avaliação de Amostras. A área média de pico de Triton X-100 do Padrão de Limite devem ser corrigida para levar em conta a quantidade de material pesado no preparado de Padrão de Estoque de Triton X-100 #1, como segue:

$$A_L = A_{LS} \times (10,00 \text{ mg/peso})$$

onde:

A_L = Área de pico corrigida para o limite de 0,5 µg/mL

A_{LS} = Área de pico média de Triton X-100 das faixas de Padrões

10 de Limite

Nota: A_L é a área corrigida no limite de 0,5 µg/mL e será usada para comparação de amostras.

Comparar a área média de pico de Triton X-100 da amostra com A_L . Se a área de pico $\leq A_L$, a amostra passa na especificação. Se a área de pico $> A_L$, a amostra falha na especificação. Reportar os resultados que passaram na especificação como "<0,50 ppm" ou que falharam na especificação como ">0,50 ppm" ou conforme de outro modo requerido pela convenção de relato de dado

20 **Exemplo 62 – Ensaio para quantificar a quantidade proteína A residual em material de substância de fármaco de CTLA4-Ig**

Materiais

Anticorpo anti-Proteína A de coelho Sigma, (Catálogo No. P3775)

Anticorpo monoclonal anti-Proteína A biotilado Sigma, (Catálogo No. B3150)

Reagentes

25 **Tampão de Revestimento de carbonato.** A um vaso adequado, adicionar: uma barra de agitação. Adicionar 500 mL de água com grau para HPLC ou Millipore. Adicionar os conteúdos de 5 cápsulas de carbonato. Agitar até bem misturado. Verificar e ajustar o pH para 9,6 \pm 0,1. Usar NaOH (1,16) ou HCl (1,23). Entornar a solução em um sistema de esterilização com filtro de 500 mL. Aplicar um vácuo para esterilizar em filtro a solução. Sob condições assépticas, remover a unidade de filtro e tampar a garrafa. A

solução é estável durante 30 dias quando armazenada a 2 - 8°C. Rotular a solução como "Tampão de Revestimento de carbonato".

5 **Tampão de Lavagem: (PBS + Tween 20 a 0,05%):** A uma garrafa de 4 L de água com grau para HPLC ou Millipore, adicionar: uma barra de agitação. Adicionar 20 tabletes de PBS. Adicionar 2,0 mL de Tween 20. Verificar e ajustar o pH para 7,4 \pm 0,1. Usar NaOH ou HCl. Usando uma placa de agitação, agitar até bem misturado. A solução é estável durante 30 dias quando armazenado a 2 - 8°C. Rotular a solução como "Tampão de Lavagem".

10 **Solução de Término (H₂SO₄ a 1 N)** ou usar ácido sulfúrico a 1.000 Normal de VWR sem diluição. Em uma coifa, colocar um recipiente adequado sobre uma placa de agitação. Adicionar uma barra de agitação. Adicionar 485,6 mL de água com grau para HPLC ou Millipore. Ligar a placa de agitação para iniciar a agitação de água. Adicionar lentamente 14,4 mL
15 de H₂SO₄ concentrado. A solução é estável durante 30 dias quando armazenada em temperatura ambiente. Rotular o recipiente como "Solução de Término".

Tampão de acetato (ácido acético a 0,5M, cloreto de sódio a 0,1M, Tween 20 a 0,1%, pH de 3,5). Em uma coifa, colocar um recipiente
20 adequado sobre uma placa de agitação. Adicionar uma barra de agitação. Adicionar 400 mL de água com grau para HPLC ou Millipore. Ligar a placa de agitação para iniciar a agitação de água. Adicionar lentamente 14,8 mL de ácido acético glacial concentrado. Agitar até bem misturado. Adicionar 2,9 g de cloreto de sódio. Agitar até bem misturado. Verificar e ajustar o pH para
25 3,5 \pm 0,1. Usar NaOH ou HCl. Adicionar 0,5 mL de Tween 20. Agitar até bem misturado. Ajustar para um volume final de 500 mL com água com grau para HPLC ou Millipore. Agitar até bem misturado. A solução é estável durante 30 dias quando armazenada a 2 - 8°C. Rotular o recipiente como "Tampão de acetato".

30 **Anticorpo anti-Proteína A de coelho.** Remover o frasco do refrigerador e deixar ir para a temperatura ambiente. Adicionar 2,0 mL de água com grau para HPLC ou Millipore. Transformar em alíquotas volumes de 20

μL em tubos com tampa de rosca de 0,5 mL. Tampar e colocar em uma caixa de armazenamento de células. A solução é estável durante 365 dias quando armazenada a -20°C .

5 **Anticorpo anti-Proteína A biotilado.** Remover o frasco do refrigerador e deixar ir para a temperatura ambiente. Adicionar 1,0 mL de água com grau para HPLC ou Millipore. Transformar em alíquotas volumes de 60 μL em tubos com tampa de rosca de 2,0 mL. Tampar e colocar em uma caixa de armazenamento de células. A solução é estável durante 365 dias quando armazenada a -20°C .

10 **Estreptavidina-HRP.** Adicionar 0,5 mL de água com grau para HPLC ou Millipore a um frasco de Estreptavidina-HRP. Para misturar, tampar o frasco e submeter a turbilhonamento gentilmente durante aproximadamente 10 segundos. Adicionar 0,5 mL de glicerol ao frasco de Estreptavidina-HRP. Tampar o frasco e inverter gentilmente o frasco várias vezes. Verificar a clareza da solução extraindo a solução em uma pipeta de Pasteur limpa.

15 Transformar em alíquota volumes de 20 μL em tubos com tampa de rosca de 0,5 mL. Tampar e colocar em uma caixa de armazenamento de células. A solução é estável durante 365 dias quando armazenada a -20°C .

20 **Preparo de Padrão.** Obter a concentração de proteína do material de referência Proteína A (mat ref) do Certificado de Análise (COA). Preparar uma solução a 11,500 ng/mL de material de referência Proteína A descongelando a solução de estoque de Proteína A em temperatura ambiente. Calcular o volume requerido de material de referência Proteína A para obter uma solução a 11,500 ng/mL. Volume mínimo de transferência deverá ser 10

25 μL .

$$\text{Fórmula: Volume} = \frac{\text{concentração desejada} \times \text{Volume desejado}}{\text{concentração de material de referência}}$$

Nota: Assegurar que as unidades são compatíveis.

$$\text{Exemplo: } \frac{2.3 \mu\text{g/mL} \times 10 \text{ mL}}{0.25 \text{ mg/mL}} = 92 \mu\text{L}$$

Calcular o volume de Tampão de acetato (3,4) subtraindo o volume requerido de material de referência Proteína A do volume desejado.

Fórmula: (Volume desejado) - (volume do Padrão de Referência) = (Volume de diluente)

Exemplo: 10,0 mL – 0,920 mL = 9,180 mL de Diluente

- Adicionar o volume calculado de material de referência Proteína
- 5 A a um tubo estéril de 15 mL o qual contém um volume calculado de tampão de acetato. Tampar o tubo. Submeter a turbilhonamento gentilmente (ajuste 4 no Aparelho de turbilhonamento Genie 2) durante 2 – 4 segundos. Preparar os padrões restantes usando os volumes definidos abaixo:

Concentração de trabalho (ng/mL)	Conc. de trabalho Volume (mL)	Tampão de acetato (mL)	Volume total (mL)	Concentração final (ng/mL)
2,300,000 (2,3 mg/mL)	0,010	1,990	2,0	11,500
11,500	0,010	4,780	4,790	24,0
24,0	2,0	2,0	4,0	12,0
12,0	2,0	2,0	4,0	6,00
6,00	2,0	2,0	4,0	3,00
3,00	2,0	2,0	4,0	1,50
1,50	2,0	2,0	4,0	0,75
0,75	2,0	2,0	4,0	0,375
0,375	2,0	2,0	4,0	0,188
N/A	N/A	2,0	2,0	0

- 10 Tampar o tubo após cada etapa de diluição e submeter a turbilhonamento gentilmente durante 2 – 4 segundos antes de prosseguir para a próxima etapa de diluição. Incubar Padrão de Referência e Amostras de controle de qualidade durante 10 minutos em temperatura ambiente antes de adição à lâmina de microtitulação. Cada concentração de padrão é analisada
- 15 em cavidades em triplicata.

- Preparo de Amostras de teste.** Preparar concentrações de 5 mg/mL, 2,5 mg/mL e 1,25 mg/mL das amostras de teste de CTLA4-Ig em tubos de polipropileno usando tampão de acetato. Descongelar a amostra de CTLA4-Ig em temperatura ambiente antes de uso para preparar diluições.
- 20 Calcular o volume requerido de amostra de teste para obter uma solução a 5,0 mg/mL. Volume mínimo de transferência deverá ser de 10 µL.

Fórmula:
$$\text{Volume} = \frac{\text{Concentração desejada} \times \text{Volume desejado}}{\text{Concentração de amostra de teste}}$$

Exemplo:
$$\frac{5.0 \text{ mg/mL} \times 1.0 \text{ mL}}{25 \text{ mg/mL}} = 200 \mu\text{L}$$

5.1.3 Calcular o volume de Tampão de acetato subtraindo o volume requerido de amostra de teste do volume desejado.

Fórmula: (Volume desejado) - (amostra de teste volume) = (Volume de diluente)

Exemplo: 1,0 mL - 0,200 mL = 0,800 mL de Diluente

Adicionar o volume calculado de amostra de teste a um tubo estéril de 15 mL o qual contém um volume calculado de tampão de acetato. Tampar o tubo e submeter a turbilhonamento gentilmente (ajuste 4 no Aparelho de turbilhonamento Genie 2) durante 2 - 4 segundos. As amostras são incubadas durante 10 minutos em temperatura ambiente antes de adição à lâmina de microtitulação.

Preparo de Amostras de controle de qualidade. Obter a concentração de proteína do material de referência Proteína A do COA. Preparar uma solução a 11,500 ng/mL de material de referência Proteína A. Preparar amostras de Controle de Qualidade (QC) conforme descrito em a tabela abaixo.

Concentração de trabalho (ng/mL)	Conc. de trabalho Volume (mL)	Tampão de acetato (mL)	Volume total (mL)	Concentração final (ng/mL)
2,300,000 (2,3 mg/mL)	0,010	1,990	2,0	11,500
11,500	0,010	4,780	4,790	24,0
24,0	0,8333	3,166	4,0	5,0 (QC1)
5,0	1,6	2,4	4,0	2,0 (QC1)
2,0	1,0	3,0	4,0	0,5 (QC1)

Transformar em alíquotas volumes de 700 μL em tubos com tampa de rosca de 2,0 mL. Tampar e colocar em uma caixa de armazenamento de células. A solução é estável durante 180 dias quando armazenada a - 70°C ou abaixo. As concentrações de Proteína A nas amostras de QC têm de ser predeterminadas através de: Realização de 3 ensaios ELISA de

Proteína A independentes usando esse método. A media dos 18 resultados (3 ensaios independentes vezes 6 cavidades por ensaio) deverá ser calculada. A concentração de Proteína A para cada amostra de QC será atribuída a cada preparadô. No dia de um experimento, descongelar um frasco de cada amostra de QC em temperatura ambiente ou fazer amostras de QC frescas a partir do frasco de estoque de Proteína A. Submeter a turbilhonamento gentilmente (ajuste 4 no Aparelho de turbilhonamento Genie 2) durante 2 - 4 segundos.

Procedimento. Revestir a lâmina com Anticorpo de captura. Obter a concentração de proteína do Anticorpo anti-Proteína A de coelho dos fabricantes COA. Calcular o volume requerido de Anticorpo anti-Proteína A de coelho para obter 10 mL de uma solução a 100 µg/mL. Volume mínimo de transferência deverá ser de 10 µL.

15 **Fórmula:**
$$\text{Volume} = \frac{\text{Concentração desejada} \times \text{Volume desejado}}{\text{Concentração de anticorpo}}$$

Nota: *Assegurar que as unidades são compatíveis.*

Exemplo:
$$\frac{100 \mu\text{g/mL} \times 3 \text{ mL}}{25 \text{ mg/mL}} = 12 \mu\text{L}$$

20 Calcular o volume de Diluente subtraindo o volume requerido de Anticorpo anti-Proteína A de coelho do volume desejado.

Fórmula: $(\text{Volume desejado}) - (\text{Volume de anticorpo}) = (\text{Volume de diluente})$

Exemplo: 3,0 mL – 0,012 mL = 2,988 mL de Diluente

25 Adicionar o volume calculado de Anticorpo anti-Proteína A de coelho a um tubo estéril de 15 mL, o qual contém um volume calculado de diluente. Tampar o tubo e submeter a turbilhonamento gentilmente durante 2 – 4 segundos. Preparar uma solução a 1 µg/mL de anticorpo anti-Proteína A de coelho em Tampão de Revestimento, usando as fórmulas. Adicionar 100
30 µl da solução a cada cavidade de uma lâmina de microtitulação Immulon IV. Incubar a 2-8°C durante 18 □ 2 horas. Lavar as lâminas três vezes com Solução de Lavagem usando o lavador de lâminas com 300 µL de tampão de lavagem e tempo de embebiamento zero. As lâminas podem, alternativamen-

te, ser lavadas usando uma pipeta com múltiplos canais. Usando uma pipeta com múltiplos canais, adicionar 200 μL de SuperBlock a cada cavidade. Incubar a lâmina de microtitulação no escuro durante 60 minutos em temperatura ambiente. Repetir a lavagem. Adicionar 100 μL de cada de Padrão de

5 Referência, Controle de Qualidade e amostras de teste à lâmina de ensaio. Incubar a lâmina de microtitulação no escuro durante 60 minutos, \square 10 minutos, em temperatura ambiente. Repetir a lavagem. Obter a concentração de proteína do Anticorpo anti-Proteína A de Biotina dos fabricantes COA. Preparar 1,0 mL de uma solução a 1,0 mg/mL de Anticorpo anti-Proteína A de

10 Biotina em diluente. Submeter a turbilhonamento em velocidade média. Adicionar 50 μL de solução a 1 mg/mL (7,9,1) a 0,950 mL de diluente. Submeter a turbilhonamento em velocidade média. Adicionar 150 μL de solução a 50 $\square\text{g/mL}$ (7,9,3) a 14,850 mL de diluente. Adicionar 100 μL a cada cavidade usando uma pipeta com múltiplos canais. Incubar em temperatura ambiente

15 durante 60 minutos \square 10 minutos. Repetir a lavagem. Diluir Estreptavidina-HRP como segue: Adicionar 10 μL de Estreptavidina-HRP a 0,990 μL de Diluente para proporcionar 0,01 mg/mL de Estreptavidina-HRP. Submeter a turbilhonamento em velocidade média. Adicionar 80 μL de 0,01 mg/mL de Estreptavidina-HRP a 39,920 mL de Diluente. Submeter a turbilhonamento

20 em velocidade média. Adicionar 100 μL a cada cavidade usando uma pipeta com múltiplos canais. Incubar durante 30 minutos, \square 5 minutos, em temperatura ambiente. Remover o TMB do refrigerador e decantar um mínimo de 10 mL por lâmina de TMB em um recipiente adequado. Colocar em um local escuro e deixar ir para a temperatura ambiente. Repetir a lavagem, mas lavar cinco vezes. Adicionar 100 $\square\text{L}$ de cromogênio TMB a cada cavidade.

25 Incubar em temperatura ambiente durante aproximadamente 2 minutos, \square 1 minuto. Cessar a reação com cromogênio através da adição de 100 μL /cavidade de Solução de Término. Adicionar Solução de Término às lâminas e cavidades na mesma ordem em que o cromogênio foi adicionado para

30 assegurar os mesmos tempos de reação de cromogênio com a enzima em cada cavidade. Medir a absorvância(AB) a 450 nm com um comprimento de onda de referência de 630 nm.

Valores exemplificativos.

Valores exemplificativos para a Curva Padrão. Os valores exemplificativos para os padrões se aplicam àqueles valores em ou acima do limite quantitativo (QL), uma vez que valores abaixo do QL são usados apenas para ajudar a estabelecer os extremos da curva. O coeficiente de determinação (R^2) para a Curva Padrão deverá ser $\geq 0,99$, conforme determinado pelo software SoftMax PRO. A base média para o padrão de zero ng/mL deverá ser $\leq 0,08$ unidades de absorção. A média dos valores calculados (ng/mL) em cada concentração de padrão usada para determinar a curva padrão exceto zero e o QL deve estar dentro de 15% do valor alvo (nominal), conforme determinado pelo software. O coeficiente de variação (CV%) dos valores AB_{450} em triplicata em cada concentração de padrão usada para determinar a curva padrão, excluindo zero e QL, deve ser $\leq 15\%$, conforme determinado pelo software. A média dos valores de absorbância em triplicata do QL da curva padrão deve exibir um CV% de menos de 20% e estar dentro de 20% do alvo, conforme determinado pelo software. Para assegurar que pelo menos dois pontos de dados congruentes estão disponíveis para cálculo, os padrões, controles e amostras são carregados em cavidades em triplicata. Cada valor da triplicata usado para calcular a média será analisado separadamente.

Por exemplo:

	<u>Valor alvo (ng/mL)</u>	<u>Valor real (ng/mL)</u>
	2,5	1,2
	2,3	
25	2,5	

O único valor que está mais distante do valor alvo de 2,5 ng/mL é 1,2 ng/mL. Eliminando o valor de 1,2 ng/mL da triplicata, a média dos valores restantes irá de encontro aos valores exemplificativos. Se, quando de recálculo, outro ponto não vai de encontro aos valores exemplificativos, então, o ensaio não é válido e deve ser refeito. Se é mostrado que a média dos dois valores restantes ainda não vão de encontro aos valores exemplificativos, então, o ponto único (todas as 3 cavidades) é eliminado e a curva é re-

calculada.

Valores exemplificativos para amostras de QC. A QC amostra é definida como um conjunto de três cavidades na concentração estabelecida, portanto, para as três concentrações nominais estabelecidas nesse método, há um total de seis amostras de QC (para um total de 18 cavidades).
 5 Pelo menos duas das três cavidades para uma amostra de QC devem estar dentro de 20% do nominal para que a amostra de QC seja aceitável. Pelo menos quatro das seis amostras de QC devem ser aceitáveis; duas das seis amostras de QC (não duas na mesma concentração) e não mais do que 6
 10 das 18 cavidades com amostra de QC podem se desviar mais de 20% das respectivas concentrações alvo.

Valores exemplificativos para amostras de teste. Cada um dos valores das amostras de teste em triplicata ensaiadas deve estar dentro de 20% do valor médio nessa concentração, conforme determinado pelo
 15 software. Se dois ou mais valores AB_{450} médios não podem ser calculados porque eles estão acima do maior ponto sobre a curva padrão, então, a amostra devem ser re-ensaiada em diluições maiores até pelo menos dois dos três valores caíam sobre a curva padrão. A CV% das observações em triplicata obtidas para cada concentração alvo de amostra de teste deve ser
 20 $\leq 20\%$, conforme determinado pelo software.

Cálculos. Refira-se ao template do programa SoftMax para um ELISA de Proteína A uma vez que ele gera a média, desvios padrões e CV%. Calcular a média dos valores de Absorbância (AB) em triplicata obtidos para cada concentração de referência e amostra ensaiada. Calcular um
 25 modelo de dados para um padrão de Proteína A usando uma regressão com quatro parâmetros ponderada da forma:

$$AB = \frac{\min - \max}{1 + \left(\frac{C}{ED_{50}} \right)^B}$$

onde:

min = valor AB correspondendo ao assíntota mínimo
 max = valor AB correspondendo ao assíntota máximo
 30 ED_{50} = AB correspondendo à metade da diferença abso-

luta entre os valores assintóticos máximo e mínimo

B= o declínio aproximado da porção linear da curva

C = Concentração de Proteína A

Cálculo de Concentração de Proteína A nas amostras. Multi-

5 plicar os resultados médios da amostra pelo fator de diluição apropriado (isto é 2, 4 e 8), para obter a concentração de Proteína A na amostra original em ng/mL. Dividir o resultado pela concentração de proteína de CTLA4-Ig reportada (mg/mL) para obter a concentração de Proteína A, em ng/mg, em C-TLA4-Ig.

10 **Cálculo exemplificativo:**

Resultado médio da amostra 235 ng de Proteína A/mL

= 4,7 ng/mg

Concentração de Abatacept 50 mg/mL

Nota: ng de Proteína A/mg de CTLA4-Ig (ng/mg) é equivalente a partes por

15 *milhão (ppm).*

Cálculos para a concentração de Proteína A em Ng/mL de

Amostras. A quantidade Proteína A nas amostras de teste é calculada usando o presente software SoftMax usando a equação de regressão. Três diluições de cada amostra são ensaiadas. A concentração calculada é multi-

20 plicada pelo fator de diluição apropriado a fim de proporcionar a concentração na amostra de teste inicial.

Exemplo:

A concentração da amostra de teste é 50 mg/mL.

Diluição de amostra

Fator de diluição

25

5 mg/mL

10

2,5 mg/mL 20

1,25 mg/mL 40

5 mg/mL de amostra - Dados por ELISA que determinam a concentração de Proteína A é 10 ng/mL

30

10 ng/mL x 10 (fator de diluição) = 100 ng/mL de Proteína A na amostra de teste

2,5 mg/mL de amostra - Dados por ELISA que determinam a

concentração de Proteína A é 5,0 ng/mL

5 ng/mL x 20 (fator de diluição) = 100 ng/mL de Proteína A na amostra de teste

5 1,25 mg/mL de amostra - Dados por ELISA que determinam a concentração de Proteína A é 2,5 ng/mL

2,5 ng/mL x 40 (fator de diluição) = 100 ng/mL de Proteína A na amostra de teste

Calcular a concentração média a partir dos três valores.

10 **Reportagem de resultados.** Os resultados podem ser reportados em termos de % peso/peso de proteína total, ng de Proteína A/mg de proteína total", de outro modo referido como "ppm" (peso/peso).

Exemplo:

0,0001% peso/peso = 1 ng/mg = 1 ppm (peso/peso)

Cálculo exemplificativo:

$$15 \frac{0,0001 \text{ mg/mL de Proteína A}}{50 \text{ mg/mL de amostra de teste}} \times 100\% = 2 \text{ ng/mg} = 2 \text{ ppm}$$

Amostras as quais resultam em um valor de AB_{450} menor do que o AB_{450} de QL (0,188 ng/mL) deverão ser reportadas como "menos de QL". Amostras as quais resultam em um valor de AB_{450} maior do que o AB_{450} de QL (0,188 ng/mL) deverão ser reportadas ao número inteiro mais próximo como partes por milhão (ppm).

20

Exemplo:

A concentração de amostra é 50 mg/mL. A maior concentração de amostra analisada é 5 mg/mL (diluição a 1/10). O AB_{450} da amostra é menor do que QL.

25 QL = 0,188 ng/mL

□ 0,188 ng/5 mg

□ 0,04 ng/mg

Reportar como "□, QL = 0,04 ppm"

30 **Exemplo 63: Métodos para obter proporções molares de amino monossacarídeos (N-acetil galactosamina, N-acetil glicosamina) para proteína em amostras de substância de fármaco de CTLA4-Ig.**

Reagentes

Solução de hidrólise (solução aquosa de HCl a 4 N). Adicionar 160 mL de HCl a 6 N e 80 mL de água com grau para HPLC a uma garrafa de vidro de 250 mL. Agitar para misturar bem. Armazenar a 2-8° C durante até 6 meses.

Solução de Derivatização I (solução aquosa de APTS a 0,1 M). Adicionar 192 µL de água com grau para HPLC a 10 mg de pó de APTS em um frasco de vidro. Submeter o frasco a turbilhamento 5-10 segundos para dissolver completamente o APTS. Armazenar a -20 °C durante até um ano.

Solução de Derivatização II (ácido acético a 1 M e NaBH₃CN a 0,25 M). Diluir 20 µL de ácido acético com 320 µL de água com grau para HPLC (diluição de 17 vezes) em um tubo para centrífuga a 0,4 mL para fazer uma solução de ácido acético a 1 M. Pesar 2,0±0,5 mg de NaBH₃CN em um frasco criogênico. Usando a seguinte fórmula, adicionar um volume apropriado da solução de ácido acético a 1 M para fazer NaBH₃CN a 0,25 M:

$$\text{Volume } (\mu\text{L}) = 10^3 \times (\text{peso de NaBH}_3\text{CN em mg}) / (62,84 \text{ g/mol} \times 0,25 \text{ mol/L})$$

Nota: Preparar imediatamente antes de uso. Cianoborohidreto de sódio (NaBH₃CN) deverá ser armazenado no escuro em um secador. Sub-divisão do reagente em uma série de criofrascos de 2,0 mL para armazenamento é recomendada para evitar abertura repetida da garrafa de reagente original como segue:

Pesar 1,0 g ± 0,2 mg de cianoborohidreto de sódio em um criofrasco de 2,0 mL. Transformar em alíquota os conteúdos todos de cianoborohidreto de sódio da garrafa original dessa maneira. Tampar hermeticamente e rotular os criofrascos seqüencialmente (1,2,3, etc.) junto com o nome do reagente, número de lote e uma data de expiração de 6 meses. Os frascos deverão ser vedados com parafilme para evitar umidade. Pesar cianoborohidreto de sódio para a Solução de Derivatização II não mais do que três vezes a partir do mesmo criofrasco. Anotar isso e do número de seqüência do criofrasco na folha de dados do laboratório. Um pico de reagente observado no perfil de CE ou pobre rotulação pode ocorrer após abertura repetida do crio-

frasco ou com esse lote de cianoborohidreto de sódio em particular. Se isso afeta os resultados, descartar o criofrasco que está sendo usado e pesar reagente de um criofrasco com o próximo número de seqüência ou de um novo lote de cianoborohidreto de sódio.

5 **Tampão de re-acetilação (bicarbonato de sódio a 25 mM, pH de 9,5).** Pesar 0,210 \pm 0,02 g de bicarbonato de sódio em um béquer de vidro limpo de 100 mL. Adicionar 90 mL de água com grau para HPLC e misturar sobre uma placa de agitação até os sais estarem completamente dissolvidos. Ajustar o pH para 9,5 \pm 0,1 com NaOH a 10 N. Adicionar água com grau para HPLC para levar o volume final para 100 mL. Filtrar a solução e armazenar em temperatura ambiente durante até 3 meses.

15 **Tampão de Operação (tetraborato de sódio a 60 \pm 5 mM, pH de 9,25).** Pesar 1,21 \pm 0,02 g de tetraborato de sódio em um béquer de vidro limpo de 100 mL. Adicionar 90 mL de água com grau para HPLC e misturar sobre uma placa de agitação até os sais estarem completamente dissolvidos. Ajustar o pH para 9,25 \pm 0,10 com NaOH a 10 N. Adicionar água com grau para HPLC para levar o volume final para 100 mL para uma concentração final de 60 \pm 5 mM. Para uma solução a 55 mM, pesar 1,11 g (\pm 0,02) de tetraborato de sódio e seguir as instruções acima para dissolução e titulação. Para uma solução a 65 mM, pesar 1,31 g (\pm 0,02) de tetraborato de sódio e seguir as instruções acima para dissolução e titulação. Armazenar em temperatura ambiente durante até 3 meses. Preparar tampão fresco se a resolução de pico (conforme definido na seção adequabilidade de sistema) é afetada (valor R < 1,0).

25 Opcional: Diluir solução de tampão de tetraborato (MicroSolv) através da adição de 120 mL de água ultra pura a 80 mL de tampão de tetraborato de sódio a 150 mM para uma concentração final de 60 mM (\pm 5 mM). Titular com NaOH a 10N para levar o pH da solução para 9,25 (\pm 0,1). Para uma solução de tetraborato a 55 mM, diluir 66 mL de tampão de tetraborato de sódio a 150 mM em 114 mL de água ultra pura. Titular conforme
30 acima. Para uma solução de tetraborato a 65 mM, diluir 78 mL de tampão de tetraborato de sódio a 150 mM em 102 mL de água ultra pura. Titular con-

forme acima. Armazenar a solução em temperatura ambiente durante um máximo de 3 meses. Preparar tampão fresco se a resolução de pico (conforme definido na seção adequabilidade de sistema) é afetada (valor $R < 1,0$).

5 Soluções de enxágüe de capilar

Solução de NaOH a 1 N: Adicionar 1 mL de solução de NaOH a 10 N em um tubo de plástico graduado de 15 mL contendo 9 mL de água com grau para HPLC. Misturar bem através de turbilhamento 5-10 seg. Armazenar a solução em temperatura ambiente durante até 6 meses.

10 Solução de HCl a 1 N: Adicionar 1 mL de solução de HCl a 6 N em um tubo de plástico graduado de 15 mL contendo 5 mL de água com grau para HPLC. Misturar bem através de turbilhamento 5-10 seg. Armazenar a solução em temperatura ambiente durante até 6 meses.

15 Solução de metanol a 80%: Adicionar 8 mL de metanol com grau para HPLC em um tubo de plástico graduado de 15 mL contendo 2 mL de água com grau para HPLC. Misturar bem através de turbilhamento 5-10 seg. Armazenar a solução em temperatura ambiente durante até 6 meses.

Soluções de estoque de Padrão de Monossacarídeo:

20 N-Acetil Glicosamina (GalNAc): Pesar precisamente 5 ± 1 mg de GalNAc em um frasco criogênico de 2,0 mL. Adicionar 1 mL de água com grau para HPLC e misturar bem através de turbilhamento até dissolvida. Registrar a concentração precisa da solução (mg/mL).

25 N-Acetil Galactosamina (GlcNAc): Pesar precisamente 5 ± 1 mg de GlcNAc em um frasco criogênico de 2,0 mL. Adicionar 1 mL de água com grau para HPLC e misturar bem através de turbilhamento até dissolvida. Registrar a concentração precisa da solução (mg/mL).

30 N-Acetil Manosamina (ManNAc): Pesar precisamente 5 ± 1 mg de ManNAc em um frasco criogênico de 2,0 mL. Adicionar 1 mL de água com grau para HPLC e misturar bem através de turbilhamento até dissolvida. Registrar a concentração precisa da solução (mg/mL).

Armazenar soluções de estoque de Padrão de Monossacarídeo

a -20°C durante até 1 ano:

Solução de trabalho de monossacarídeo I: Solução de trabalho de padrão interno. Diluir solução de estoque de ManNAc 100 vezes com água com grau para HPLC através da adição de 20 µL de solução de estoque de ManNAc em um frasco criogênico de 2 mL, o qual já contém 1980 µL de água com grau para HPLC. Submeter a turbilhamento aproximadamente 5 a 10 segundos. Armazenar a solução de trabalho de padrão interno a 2-8°C durante até 6 meses.

Solução de trabalho de monossacarídeo II: Solução de Trabalho Padrão de Mistura Amino. Em um frasco criogênico de 2,0 mL contendo 1960 µL de água com grau para HPLC, adicionar 20 µL de soluções de estoque de GalNAc e GlcNAc, respectivamente. Submeter a turbilhamento aproximadamente 5 a 10 segundos. Armazenar a Solução de Trabalho Padrão de Mistura Amino a 2-8°C durante até 6 meses.

Soluções de amostra e material de referência. Descongelar a amostra de proteínas a 2-8°C e misturar ligeiramente através de inversão. Diluir as amostras e material de referência com água com grau para HPLC para cerca de 1,0 mg/mL. Anotar a concentração para três situações representativas.

20 **Condições de operação CE.**

Tampão de Operação (etapa 2.5)	tetraborato de sódio a 60 mM, pH de 9,25
Temperatura de cartucho do capilar	25°C
Tensão	25-30 kV, modo positivo
Condição do detector	Detector LIF, Excitação: 488 nm, Emissão: 520 nm.
Injeção de amostra	Modo de injeção sob pressão, 20 s a 0,5 PSI
Tempo de operação	10 minutos
Armazenamento de amostra	10°C

Procedimento

Hidrólise. Em um tubo para centrífuga de 0,65 mL, adicionar 10 µL de solução de trabalho de ManNAc e 200 µL de Solução de Hidrólise a 4 N. Isso serve como uma corrente de sistema. Em um tubo para centrífuga de 0,65 mL, adicionar 10 µL de solução de trabalho de ManNAc e 10 µL de Solução Padrão de Mistura Amino. Adicionar ainda 200 µL de Solução de Hidrólise a 4N. Isso serve como padrão de monossacarídeo para quantificação

e Adequabilidade de sistema. Preparar em duplicata. Em um tubo para centrífuga de 0,65 mL, adicionar 10 μ L de solução de trabalho de ManNAc e 10 μ L de solução de material de referência de CTLA4-Ig (aproximadamente 1 mg/mL). Adicionar ainda 200 μ L de solução de HCl a 4N. Preparar em duplicata. Em um tubo para centrífuga de 0,65 mL, adicionar 10 μ L de solução de trabalho de ManNAc e 10 μ L de solução de amostra (aproximadamente 1 mg/mL). Adicionar ainda 200 μ L de solução de HCl a 4N. Preparar em duplicata. Submeter a turbilhamento as amostras durante aproximadamente 10 segundos e centrifugar durante aproximadamente 5-10 segundos. Colocar as amostras em uma prateleira para frasco com 96 posições e incubar em um forno a 95° C durante 6 horas. Após hidrólise, colocar as amostras hidrolisadas a -20° C durante 10 minutos para esfriar. Centrifugar rapidamente as amostras hidrolisadas até que qualquer condensado seja forçado para o fundo do tubo (5-10 segundos em alta velocidade). Evaporar as amostras até secagem em um SpeedVac. Reconstituir cada amostra com 100 μ L de água com grau para HPLC e submeter a turbilhamento 10-15 seg. Evaporar as amostras até secagem em um SpeedVac.

Re-acetilação. Reconstituir cada amostra com 10 μ L de tampão de re-acetilação M6 e submeter a turbilhamento 5-10 seg. para misturar bem. Adicionar 4 μ L de reagente de re-acetilação M3 em cada tubo. Submeter a turbilhamento durante aproximadamente 5-10 segundos. Incubar sobre gelo durante 30 minutos. Evaporar as amostras até secagem em um SpeedVac. Reconstituir cada amostra com 100 μ L de água com grau para HPLC e submeter a turbilhamento 10-15 seg. Evaporar as amostras até secagem em um SpeedVac.

Derivatização. Colocar a micro centrífuga no forno para equilibrar para a temperatura do forno de 55° C. Reconstituir cada amostra com 10 μ L de Solução de Derivatização I (solução de APTS a 0,1 M). Submeter a turbilhamento aproximadamente 5-10 segundos. Adicionar 5 μ L da Solução de Derivatização II (HAc a 1M e NaBH₃CN a 0,25 M). Submeter a turbilhamento aproximadamente 5-10 segundos e centrifugar. Carregar rapidamente os frascos de amostra na centrífuga pré-aquecida e colocar a cen-

trífuga de volta no forno a 55 °C. Incubar durante 3 horas enquanto centrifuga a 2000 rpm. Isso impede a condensação de solvente sobre a superfície do frasco.

Preparo de instrumentação

- 5 5.4.1 Instalar um novo capilar, enxaguar no modo de alta pressão (80 PSI) usando as seguintes etapas: NaOH a 1 N durante 20 minutos; água com grau para HPLC durante 10 minutos; tampão de tetraborato de sódio a 60 mM durante 10 minutos.

Operação diária

- 10 Antes de cada operação do dia, operar as seqüências de lavagem/enxágüe para enxaguar o capilar.

Então, operar o Padrão de Adequabilidade de sistema (padrão de monossacarídeo) para assegurar que o sistema é adequado.

- 15 Uso de NaOH a 1N pode causticar o interior de capilares de diferentes vendedores e causa um desvio nos tempos de migração por toda a operação. Se isso faz com que o tempo de migração do último pico (G1cNAc) seja mais de 10,0 minutos, pode ser necessário substituir NaOH a 1N por NaOH a 0,1N ou água com grau para HPLC para o enxágüe da etapa 2.

- 20 Quando uso de um capilar equivalente e do procedimento de lavagem acima não é adequado, uso de metanol a 80% e/ou HCl a 1N pode ser necessário para que o último pico (G1cNAc) esteja dentro dos valores exemplificativos de 10,0 minutos.

Preparo para injeção:

- 25 Após derivatização, deixar as amostras esfriar para a temperatura ambiente. Centrifugar aproximadamente 10 segundos em temperatura ambiente, até o condensado ser forçado para o fundo do tubo.

- 30 Adicionar 85 µL de água com grau para HPLC a cada tubo para levar o volume final de cada amostra para 100 µL. Submeter a turbilhona-mento durante 5-10 segundos.

Transferir 10 µL de amostra de cada tubo para um micro frasco para CE e adicionar 190 µL de água com grau para HPLC a cada tubo.

Submeter a turbilhonamento durante 5-10 segundos.

Etapas de enxágüe e seqüência de injeção:

Nota: Para cada quatro injeções, trocar o Tampão de Operação de CE por Tampão de Operação de CE recentemente preparado (em virtude do efeito de depleção iônica). Realizar enxágüe do capilar a 40 psi.

5

Etapa	Descrição	Tempo de Operação (min)
1 (Enxágüe)	Água com grau para HPLC	1
2 (Enxágüe)	NaOH a 1N ou NaOH a 0,1N	3
	OR	
	Água com grau para HPLC <i>Nota: Quando usando água para HPLC para o enxágüe da etapa 2, as etapas 1,2 e 3 podem ser combinadas em uma única operação de 3 minutos.</i>	1
3 (Enxágüe)	Água com grau para HPLC	1
4 (Enxágüe)	Tampão de operação de tetraborato de sódio a 60 mM	5
5 (Enxágüe)	Placebo (Marcador de Padrão Interno)	10
6 (Enxágüe)	Repetir 1-4	10
7 (Enxágüe)	Adequabilidade de sistema (Prep 1 de padrão de mono)	10
8 (Enxágüe)	Repetir 1-4	10
9	Adequabilidade de sistema (Prep 1 de padrão de mono)	10
10 (Enxágüe)	Repetir 1-4	10
11	Adequabilidade de sistema (Prep 2 de padrão de mono)	10
12 (Enxágüe)	Repetir 1-4	10
13	Adequabilidade de sistema (Prep 2 de padrão de mono)	10
14 (Enxágüe)	Repetir 1-4	10
15	Prep 1 de material de referência de CTLA4-Ig	10
16 (Enxágüe)	Repetir 1-4	10
17	Prep 2 de material de referência de CTLA4-Ig	10
18 (Enxágüe)	Repetir 1-4	10
19	Prep 1 de amostra 1	10
20 (Enxágüe)	Repetir 1-4	10
21	Prep 1 de amostra 1	10
22 (Enxágüe)	Repetir 1-4	10
23	Prep 2 de amostra 1	10
24 (Enxágüe)	Repetir 1-4	10
25	Amostra1 prep 2	10
26 (Enxágüe)	Repetir 1-4	18
27	Prep 1 de amostra 2	10
28 (Enxágüe)	Repetir 1-4	10
29	Prep 1 de amostra 2	10

30 (Enxágüe)	Repetir 1-4	10
31	Prep 2 de amostra 2	10
32 (Enxágüe)	Repetir 1-4	10
33	Prep 2 de amostra 2	10
34 (Enxágüe)	Repetir 1-4	10
35	Prep 1 de amostra 3	15
36 (Enxágüe)	Repetir 1-4	10
37	Prep 1 de amostra 3	10
38 (Enxágüe)	Repetir 1-4	10
39	Prep 2 de amostra 3	10
40 (Enxágüe)	Repetir 1-4	10
41	Prep 2 de amostra 3	10
42 (Enxágüe)	Repetir 1-4	10
43	Prep 1 de material de referência de CTLA4-Ig	10
44 (Enxágüe)	Repetir 1-4	10
45	Prep 2 de material de referência de CTLA4-Ig	10
46 (Enxágüe)	Repetir 1-4	10
47	Adequabilidade de sistema (Prep. 1 de padrão de mono)	10
48 (Enxágüe)	Repetir 1-4	10
49	Adequabilidade de sistema (Prep 1 de padrão de mono)	10
50	Repetir 1-4	10
51	Adequabilidade de sistema (Prep 2 de padrão de mono)	10
52	Repetir 1-4	10
53	Adequabilidade de sistema (Prep 2 de padrão de mono)	10

***Nota:** Repetir a seqüência para até três amostras em duplicata e agrupar com 2 injeções de cada preparado de Padrão de monossacarídeo. Usar todas as oito injeções de Padrões de Adequabilidade de sistema para amostras colocadas em grupos de três. Se operando com mais de três amostras, operar as amostras adicionais conforme mostrado na seqüência acima começando com a linha 19. Completar a seqüência operando a adequabilidade de sistema (Padrão de mono) conforme mostrado nas linhas 47 a 53 na Tabela.

****Faixas de amostra com duas injeções de cada preparado de material de referência de CTLA4-Ig.**

Adequabilidade de sistema

Nota: Valores de Adequabilidade de sistema são determinados usando as primeiras injeções de Padrão de Adequabilidade de sistema, a menos que de outro modo especificado. O eletroferograma do primeira adequabilidade de sistema deverá ser similar àquele mostrado na Figura 1, onde o pico 1 é GalNAc; o pico 2 é ManNAc; o pico 3 é GlcNAc.

Nota: Quando outros instrumentos de CE que não Beckman PACE MDO têm de ser usados, o comprimento do capilar poderia ser diferente daquele especificado nesse método em virtude de várias configurações de cartuchos contendo o capilar de separação. Isso causaria variações no tempo de migração de analito, bem como intensidade de pico.

A resolução entre dois picos vizinhos é calculada para os primeiros Padrões de Adequabilidade de sistema pelo instrumento de acordo com a seguinte equação:

$$\frac{0,0001 \text{ mg/mL de Proteína A}}{50 \text{ mg/mL de amostra de teste}} \times 100\%$$

onde:

10 R = resolução
 t_2, t_1 = tempos de migração dos dois picos vizinhos respectivamente
 W_1, W_2 = larguras de pico na linha de base dos dois picos vizinhos respectivamente

15 O valor R deve ser $\geq 1,0$. Se $R < 1,0$, enxaguar o capilar com as seqüências de lavagem/enxágüe; se o problema persiste, substituir o tampão antigo por Tampão de Operação recentemente preparado ou substituir o capilar.

20 Para a última injeção de Adequabilidade de sistema, o último pico (GlcNAc) deve ter um fator de configuração $< 1,4$ usando a seguinte fórmula:

$$T = W_{0,05} / 2f$$

onde:

25 T = fator de configuração
 $W_{0,05}$ = largura de pico a 5% de altura
 f = largura da frente de pico em pico máximo

Se $T \geq 1,4$, enxaguar o capilar com as seqüências de lavagem/enxágüe; se o problema persiste, substituir o tampão antigo por tampão de operação recentemente preparado ou substituir o capilar.

6.1 As injeções repetidas de Padrões de Adequabilidade de sistema deverão ir de encontro aos seguintes valores exemplificativos:

- Proporção de área de pico de GlcNAc vs. MaNAc: RSD \leq 10% (calculada na etapa 7,1)

5

- Tempo de migração de GlcNAc deverá ser \leq 10,0 minutos
- O perfil deverá ser equivalente à Figura 1 onde os três picos são observados e o padrão interno (ManNAc) é o pico de número 2.

Se qualquer um dos valores exemplificativos acima não é obtido antes de testagem das amostras, primeiro aumentar a tensão se o tempo de migração de GlcNAc é mais de 10,0 minutos. Em seguida, se a proporção de área de pico é $>$ 10%, preparar tampão de CE fresco tendo certeza de seu pH ou substituir o capilar. Após ajuste do instrumento, repetir as injeções de Adequabilidade de sistema. Quando de análise do perfil de pico, se uma diminuição significativa na altura de pico de ManNAc ocorre, verificar se determinados cabos de fibra óptica no módulo de LIF não estão mal alinhados.

Determinar o RSD percentual para o padrão monossacarídico através de comparação da proporção de componentes de áreas de pico do padrão interno e padrão de monossacarídeo. Dividir a área de pico para cada componente monossacarídico pela área de pico do padrão interno para cada injeção de padrão de monossacarídeo. Calcular o RSD percentual para Ga1NAc e G1cNAc para as faixas dos dois padrões. O RSD deverá ser \leq 10%. Se esse valor médio exemplificativo não é obtido, então, o capilar deverá ser enxaguado ou substituído conforme acima.

Cálculos

25

Cálculo de Proporção de área de pico de GalNAc e GlcNAc com relação ao padrão interno (ManNAc). Usado sobre injeções repetidas dos primeiros quatro Padrões de Adequabilidade de Sistema de modo a ir de encontro aos valores exemplificativos e realizar os mesmos cálculos sobre todas as faixas de Padrões de Adequabilidade de Sistema injetados antes e após amostra(s).

30

Proporção de área de pico = Dividir a área de pico para cada componente monossacarídico (GlcNAc, GalNAc) pela área de pico do pa-

drão interno (ManNAc) para cada injeção de Padrão de Adequabilidade de sistema.

$$\text{Proporção de área de pico} = \frac{\text{área de pico de monossacarídeo}}{\text{Área de pico de MaNAc}}$$

- 5 Calcular uma média das proporções de área de pico para GlcNAc e GalNAc nos Padrões de Adequabilidade de Sistema. Também calcular um desvio padrão (S.D.) e desvio padrão relativo percentual (%RSD)

- Valores exemplificativos:** RSD para a proporção de área de pico de GlcNAc \square 10%. Faixas de dois Padrões de Adequabilidade de Sistema injetados antes e após amostra(s): RSD percentual para a proporção de área de pico de GlcNAc e GalNAc \square 10%.

- 15 Se esse valor exemplificativo médio não é obtido (RSD > 10%), então, o capilar precisa ser re-enxaguado com os procedimentos de enxágue e aquelas faixas de amostras e padrões de monossacarídeo precisam ser operadas novamente. Se o valor exemplificativo médio ainda não é obtido, substituir o capilar e enxaguar conforme estabelecido. operar as faixas de amostras e padrões de monossacarídeo novamente.

$$\text{Desvio padrão} = \sqrt{\frac{n\sum x^2 - (\sum x)^2}{n(n-1)}}$$

onde:

n = número de medições na amostra

20 x = medições individuais

$$\% \text{RSD} = \frac{\text{Desvio padrão}}{\text{Área média de pico medida}} \times 100 \%$$

Calcular a proporção molar de GalNAc/Proteína:

$$R_{\text{GalNAc}} = \frac{A_{\text{GalNAc}} \times A_{\text{ManNAc0}} \times V_{\text{GalNAc0}} \times C_{\text{GalNAc0}} \times MW_{\text{CTLA4-Ig}}}{A_{\text{ManNAc}} \times A_{\text{GalNAc0}} \times V_p \times C_p \times MW_{\text{GlcNAc}}}$$

onde:

R_{GalNAc} = proporção molar de GalNAc vs. proteína

A_{GalNAc} = área de pico ($\mu\text{V}\cdot\text{seg}$) de GalNAc na amostra

A_{ManNAc} = área de pico ($\mu\text{V}\cdot\text{seg}$) de ManNAc na amostra

A_{ManNAc0} = área média de pico ($\mu\text{V}\cdot\text{seg}$) de ManNAc no padrão de monossacarídeo

A_{GalNAc0} = área média de pico ($\mu\text{V}\cdot\text{seg}$) de GalNAc no padrão de monossacarídeo

5 V_{GalNAc0} = volume de GalNAc contido na solução de trabalho de monossacarídeo usada para hidrólise (em μL)

C_{GalNAc0} = concentração de GalNAc contido na solução de trabalho de monossacarídeo usada para hidrólise (em mg/mL)

10 V_p = volume de amostra de proteína usada para hidrólise (em μL)

C_p = concentração de amostra de proteína usada para hidrólise (em mg/mL)

$MW_{\text{CTLA4-Ig}}$ = Peso molecular de material de referência de CTLA4-Ig

15 MW_{GlcNAc} = Peso molecular de GalNAc (221,2 dátons)

Agrupamento de padrões. Quando de cálculo das proporções molares de material de referência de CTLA4-Ig e amostras, usar todas as oito faixas de Padrões de Adequabilidade de Sistema. Calcular as médias das áreas de pico para inclusão nessa equação. Essa deve ser usada para 20 as primeiras três amostras. Para todas as outras amostras, sempre usar a área média de pico das próximas quatro faixas de padrões de monossacarídeo e as quatro faixas de padrões anteriores de monossacarídeo para cálculos da proporção molar.

Calcular a proporção molar de GlcNAc/Proteína

$$R_{\text{GalNAc}} = \frac{A_{\text{GlcNAc}} \times A_{\text{ManNAc0}} \times V_{\text{GlcNAc0}} \times C_{\text{GlcNAc0}} \times MW_{\text{CTLA4-Ig}}}{A_{\text{ManNAc}} \times A_{\text{GlcNAc0}} \times V_p \times C_p \times MW_{\text{GlcNAc}}}$$

25 onde:

R_{GlcNAc} = proporção molar de GlcNAc vs. proteína

A_{GlcNAc} = área de pico ($\mu\text{V}\cdot\text{seg}$) de GlcNAc na amostra

A_{ManNAc} = área de pico ($\mu\text{V}\cdot\text{seg}$) de ManNAc na amostra

30 A_{ManNAc0} = área média de pico ($\mu\text{V}\cdot\text{seg}$) de ManNAc no padrão de monossacarídeo

A_{GlcNAc0} = área média de pico ($\mu\text{V}\cdot\text{seg}$) de GlcNAc no padrão de monossacarídeo

V_{GlcNAc0} = volume de GlcNAc contido na solução de trabalho de monossacarídeo usada para hidrólise (em μL)

5 C_{GlcNAc0} = concentração de GlcNAc contido na solução de trabalho de monossacarídeo usada para hidrólise (em mg/mL)

V_p = volume de amostra de proteína usada para hidrólise (em μL)

10 C_p = concentração de amostra de proteína usada para hidrólise (em mg/mL)

$MW_{\text{CTLA4-Ig}}$ = Peso molecular de material de referência de CTLA4-Ig as per COA

MW_{GlcNAc} = Peso molecular de GlcNAc (221,2 dáltons)

15 **Valores exemplificativos.** O RSD percentual para as proporções de área de pico das duas faixas de Padrão Amino de Adequabilidade de Sistema não deverá exceder a 10%. A proporção molar média para amino monossacarídeos no material de referência deve estar dentro da faixas especificadas. Para cada componente, o RSD % para os quatro resultados (injeção em duplicata de preparados em duplicada) devem ser $\leq 25\%$.

20 **Faixa de proporção molar de material de referência de CTLA4-Ig**

Monossacarídeo	Faixa
GalNAc	2,0-3,2
GlcNAc	18-32

25 **Reportagem de resultados.** Reportar o resultado médio como o número de moléculas de GalNAc por molécula de CTLA4-Ig e número de moléculas de GlcNAc por molécula de CTLA4-Ig. Reportar os resultados de proporção molar para duas situações representativas. Para cada componente, o RSD % para os quatro resultados (injeção em duplicata de preparados em duplicada) devem ser $\leq 25\%$.

Exemplo 64: Métodos para obter proporções molares de monossacarídeos neutros (manose, fucose, galactose) para proteína em amostras de substância de fármaco de CTLA4-Ig.

Reagentes

Solução de hidrólise (solução aquosa de TFA a 2 M). Adicionar 148 μL de TFA e 852 μL de água com grau para HPLC a um tubo para microcentrífuga de 1,7 mL. Submeter a turbilhamento durante 5-10 segundos. Escalonar conforme necessário. Preparar a solução imediatamente antes de uso.

Solução de Derivatização I (solução aquosa de APTS a 0,1 M). Adicionar 192 μL de água com grau para HPLC a 10 mg de pó de APTS em um frasco de vidro. Submeter a garrafa a turbilhamento 5-10 segundos para dissolver completamente o APTS. Armazenar a $-20\text{ }^\circ\text{C}$ durante até um ano.

Solução de Derivatização II (ácido acético a 1 M e NaBH_3CN a 0,25 M). Diluir 20 μL ácido acético com 320 μL água com grau para HPLC (diluição de 17 vezes) em um tubo para centrífuga a 0,4 mL para fazer uma solução de ácido acético a 1 M. Pesar $2,0 \pm 0,5$ mg de NaBH_3CN em um frasco criogênico. Usando a seguinte fórmula, adicionar um volume apropriado da solução de ácido acético a 1 M para fazer NaBH_3CN a 0,25 M.

Volume (μL) = $10^3 \times (\text{peso de } \text{NaBH}_3\text{CN em mg}) / 62,84 \text{ g/mol} \times 0,25 \text{ moles/L}$

• Cianoborohidreto de sódio (NaBH_3CN) deverá ser armazenado no escuro em um secador.

• Sub-divisão do reagente em uma série de criofrascos de 2,0 mL para armazenamento é recomendado para evitar abertura repetida da garrafa de reagente original como segue:

• Pesar 1 g \pm 0,2 mg de cianoborohidreto de sódio em um criofrasco de 2,0 mL. Transformar em alíquota os conteúdos todos de cianoborohidreto de sódio da garrafa original dessa maneira.

• Tampar hermeticamente e rotular os criofrascos seqüencialmente (1,2,3, etc.) junto com o nome do reagente, número de lote e uma data de expiração de 6 meses.

• Os frascos deverão ser vedados com parafilme para evitar umidade.

- Pesar cianoborohidreto de sódio para a Solução de Derivatização II não mais do que três vezes a partir do mesmo criofrasco. Anotar isso e o número de seqüência do criofrasco na folha de dados do laboratório.

- Um pico de reagente observado no perfil de CE ou pobre rotulação pode ocorrer após abertura repetida do criofrasco ou com esse lote de cianoborohidreto de sódio em particular. Se isso afeta os resultados, descartar o criofrasco que está sendo usado e pesar reagente de um criofrasco com o próximo número de seqüência ou de um novo lote de cianoborohidreto de sódio.

5

10 **Tampão de Operação (tetraborato de sódio a 60 \pm 5 mM, pH de 9,25)**

Pesar 1,21 \pm 0,02 g de tetraborato de sódio em uma garrafa de vidro de 100 mL limpa.

Adicionar 90 mL de água com grau para HPLC e misturar sobre uma placa de agitação até os sais estarem completamente dissolvidos.

15 Ajustar o pH para 9,25 \pm 0,10 com NaOH a 10 N.

Adicionar água com grau para HPLC para levar o volume final para 100 mL para uma concentração final de 60 mM (\pm 5 mM).

Para uma solução a 55 mM, pesar 1,11 g (\pm 0,02) de tetraborato de sódio e seguir as instruções acima para dissolução e titulação.

20 Para uma solução a 65 mM, pesar 1,31 g (\pm 0,02 g) de tetraborato de sódio e seguir as instruções acima para dissolução e titulação.

Armazenar em temperatura ambiente durante até 3 meses. Preparar tampão fresco se a resolução de pico (conforme definido na seção adequabilidade de Sistema) é afetada (valor R < 1,0).

25 Opcional: Diluir solução de tampão de tetraborato (MicroSolv) através da adição de 120 mL de água ultra pura a 80 mL de tampão de tetraborato de sódio a 150 mM para uma concentração final de 60 mM (\pm 5 mM). Titular com NaOH a 10N para levar o pH da solução para 9,25 (\pm 0,1).

30 Para uma solução de tetraborato a 55 mM, diluir 66 mL de tampão de tetraborato de sódio a 150 mM em 114 mL de água ultra pura. Titular conforme acima.

Para uma solução de tetraborato a 65 mM, diluir 78 mL de tam-

pão de tetraborato de sódio a 150 mM em 102 mL de água ultra pura. Titular conforme acima.

5 Armazenar a solução em temperatura ambiente durante um máximo de 3 meses. Preparar tampão fresco se a resolução de pico (conforme definido na seção adequabilidade de Sistema) é afetada (valor $R < 1,0$).

Soluções de enxágüe de capilar

Solução de NaOH a 1 N

10 Adicionar 1 mL de solução de NaOH a 10 N em um tubo de plástico graduado de 14 mL contendo 9 mL de água com grau para HPLC. Misturar bem através de turbilhonamento 5-10 seg.

Armazenar a solução em temperatura ambiente durante até 6 meses.

Solução de HCl a 1 N:

15 Adicionar 1 mL de solução de HCl a 6 N em um tubo de plástico graduado de 15 mL contendo 5 mL de água com grau para HPLC. Misturar bem através de turbilhonamento 5-10 seg.

Armazenar a solução em temperatura ambiente durante até 6 meses.

Solução de metanol a 80%:

20 Adicionar 8 mL de metanol com grau para HPLC em um tubo de plástico graduado de 15 mL contendo 2 mL de água com grau para HPLC. Misturar bem através de turbilhonamento 5-10 seg.

Armazenar a solução em temperatura ambiente durante até 6 meses.

25 Soluções de estoque de Padrão de Monossacarídeo

Manose (Man)

Pesar precisamente 5 \pm 1 mg de manose em um frasco criogênico de 2,0 mL.

30 Adicionar 1 mL de água com grau para HPLC e misturar bem através de turbilhonamento 5-10 seg.

Registrar a concentração precisa da solução (mg/mL).

Fucose (Fuc)

Pesar precisamente 5 ± 1 mg de fucose em um frasco criogênico de 2,0 mL.

Adicionar 1 mL de água com grau para HPLC e misturar bem através de turbilhonamento 5-10 seg.

5 Registrar a concentração precisa da solução (mg/mL).

Galactose (Gal)

Pesar precisamente 5 ± 1 mg de galactose em um frasco criogênico de 2,0 mL.

10 Adicionar 1 mL de água com grau para HPLC e misturar bem através de turbilhonamento 5-10 seg.

Registrar a concentração precisa da solução (mg/mL).

Xilose (Xyl)

Pesar precisamente 5 ± 1 mg de xilose em um frasco criogênico de 2,0 mL.

15 Adicionar 1 mL de água com grau para HPLC e misturar bem através de turbilhonamento 5-10 seg.

Registrar a concentração precisa da solução (mg/mL).

Armazenar as soluções de estoque de Padrão de Monossacarídeo a -20 °C durante até 1 ano.

20 **Solução de trabalho de monossacarídeo I:** Solução de trabalho de padrão interno. Para fazer a solução de trabalho de padrão interno, diluir solução de estoque de xilose 100 vezes com água com grau para HPLC através da adição de 20 µL de solução de estoque de xilose (3.6.4) em um frasco criogênico de 2 mL, o qual já contém 1980 µL de água com grau para HPLC. Submeter a turbilhonamento durante aproximadamente 5 a 10 segundos. Armazenar essa solução de trabalho de padrão interno a 2-8°C durante até 6 meses.

30 **Solução de trabalho de monossacarídeo II:** Solução de trabalho padrão de mistura neutra. Em um frasco criogênico de 2,0 mL contendo 1940 µL de água com grau para HPLC, adicionar 20 µL de soluções de estoque de manose, fucose e galactose, respectivamente. Submeter a turbilhonamento durante aproximadamente 5 a 10 segundos. Armazenar essa

solução de trabalho de padrão interno a 2-8°C durante até 6 meses.

Soluções de amostra e material de referência: Descongelar a amostra de proteínas a 2-8°C e misturar ligeiramente através de inversão. Diluir as amostras e material de referência com grau para HPLC para cerca de 1,0 mg/mL.

5

Condições de operação CE

Tampão de Operação	tetraborato de sódio a 60 mM, pH de 9,25
Temperatura de cartucho do capilar	25 °C
Tensão	25-30 kV, modo positivo
Condição do detector	Excitação do detector LIF: 488 nm, Emissão: 520 nm
Injeção de amostra	Modo de injeção sob pressão, 20 s a 0,5 PSI
Tempo de operação	15 minutos
Armazenamento de amostra	10°C

Procedimento

- Hidrólise:** Em um tubo para centrífuga de 0,65 mL, adicionar 10 µL de solução de trabalho de xilose e 200 µL de solução de TFA a 2M. Isso serve como uma corrente de sistema. Em um tubo para centrífuga de 0,65 mL, adicionar 10 µL de solução de trabalho de xilose e 10 µL de solução de trabalho padrão de mistura neutra. Adicionar ainda 200 µL de solução de TFA a 2M e submeter a turbilhonamento durante 3-4 seg. Isso serve como padrão de monossacarídeo para quantificação e Adequabilidade de Sistema.
- 10
- 15 Preparar em duplicata. Em um tubo para centrífuga de 0,65 mL, adicionar 10 µL de solução de trabalho de xilose e 10 µL de solução de material de referência de CTLA4-Ig (aproximadamente 1 mg/mL). Adicionar ainda 200 µL de solução de TFA a 2M e submeter a turbilhonamento durante 3-4 seg. Preparar em duplicata. Em um tubo para centrífuga de 0,65 mL, adicionar 10 µL de
- 20 solução de trabalho de xilose e 10 µL de solução de amostra (aproximadamente 1 mg/mL). Adicionar ainda 200 µL de solução de TFA a 2M e submeter a turbilhonamento durante 3-4 seg. Preparar em duplicata. Submeter a turbilhonamento as amostras durante aproximadamente 20 segundos e cen-

- trifugar durante aproximadamente 5 a 10 segundos. Colocar as amostras em uma prateleira para frasco com 96 posições e incubar em um forno a 95 °C durante 6 horas. Após hidrólise, colocar as amostras a -20 °C durante 10 minutos para esfriar. Centrifugar rapidamente as amostras hidrolisadas até
- 5 que qualquer condensado seja forçado para o fundo do tubo (5 a 10 segundos em alta velocidade). Evaporar as amostras até secagem em um SpeedVac. Reconstituir cada amostra com 100 µL de água com grau para HPLC e submeter a turbilhonamento 10-15 seg. Evaporar as amostras até secagem em um SpeedVac.
- 10 **Derivatização:** Colocar a micro centrífuga no forno para equilibrar para a temperatura do forno de 55° C. Reconstituir cada amostra com 10 µL de Solução de Derivatização I (solução de APTS a 0,1 M). Submeter a turbilhonamento aproximadamente 5-10 segundos. Adicionar 5 µL da Solução de Derivatização II (HAc a 1M e NaBH₃CN 0,25 M). Submeter a turbi-
- 15 lhonamento aproximadamente 5-10 segundos e centrifugar. Carregar rapidamente os frascos de amostra na centrífuga pré-aquecida e colocar a centrífuga de volta no forno a 55 °C. Incubar durante 3 horas enquanto centrifuga a 2000 rpm. Isso impede a condensação de solvente sobre a superfície do frasco.
- 20 **Preparo de instrumentação:** Instalar um novo capilar, enxaguar em no modo de alta pressão (80 PSI) usando as seguintes etapas:
- NaOH a 1 N durante 20 minutos.
- Água com grau para HPLC durante 10 minutos.**
- Tampão de tetraborato de sódio a 60 mM durante 10 minutos.
- 25 Operar as seqüências de lavagem/enxágüe para enxaguar o capilar. Então, operar o Padrão de Adequabilidade de sistema (padrão de monossacarídeo) para assegurar que o sistema é adequado. Uso de NaOH a 1N, pode causticar o interior de capilares de diferentes vendedores e causa um desvio nos tempos de migração por toda a operação. Se isso faz com
- 30 que o tempo de migração do último pico (galactose) seja mais de 15,0 minutos, podendo ser necessário substituir NaOH a 1N por NaOH a 0,1N ou água com grau para HPLC para o enxágüe da etapa 2. Quando uso de um capilar

equivalente e do procedimento de lavagem acima não é adequado, uso de metanol a 80% e/ou HCl a 1N pode ser necessário para que o último pico (galactose) esteja dentro dos valores exemplificativos de 15,0 minutos.

- Preparo para injeção:** Após derivatização, deixar as amostras esfriar para a temperatura ambiente. Centrifugar aproximadamente 10 segundos em temperatura ambiente, até o condensado ser forçado para o fundo do tubo. Adicionar 85 µL de água com grau para HPLC a cada tubo para levar o volume final de cada amostra para 100 µL. Submeter a turbilhona-
 5 mento durante 5-10 segundos. Transferir 10 µL de amostra de cada tubo para um micro frasco para CE e adicionar 190 µL de água com grau para
 10 HPLC a cada tubo. Submeter a turbilhona-mento durante 5-10 segundos.

Seqüência de etapas de enxágüe e injeção:

Etapa	Descrição	Tempo de operação (min)
1 (Enxágüe)	Água com grau para HPLC	1
2 (Enxágüe)	NaOH a 1N ou NaOH a 0,1N OR Água com grau para HPLC <i>Nota: Quando usando água para HPLC para o enxágüe da etapa 2, as etapas 1,2 e 3 podem ser combinadas em uma única operação de 3 minutos.</i>	3 1
3 (Enxágüe)	Água com grau para HPLC	1
4 (Enxágüe)	Tampão de operação de tetraborato de sódio a 60 mM	5
5	Placebo (Marcador de Padrão Interno)	15
6 (Enxágüe)	Repetir 1-4	10
7	Adequabilidade de Sistema (Prep 1 de padrão de mono)	15
8 (Enxágüe)	Repetir 1-4	10
9	Adequabilidade de Sistema (Prep 1 de padrão de mono)	15
10 (Enxágüe)	Repetir 1-4	10
11	Adequabilidade de Sistema (Prep 2 de padrão de mono)	15
12 (Enxágüe)	Repetir 1-4	10
13	Adequabilidade de Sistema (Prep 2 de padrão de mono)	15
14 (Enxágüe)	Repetir 1-4	10
15	Prep 1 de material de referência de CTLA4-Ig	15
16 (Enxágüe)	Repetir 1-4	10
17	Prep 2 de material de referência de CTLA4-Ig	15
18 (Enxágüe)	Repetir 1-4	10
19	Prep 1 de amostra 1	15
20 (Enxágüe)	Repetir 1-4	10
21	Prep 1 de amostra 1	15
22 (Enxágüe)	Repetir 1-4	10
23	Prep 2 de amostra 1	15

24 (Enxágüe)	Repetir 1-4	10
25	Prep 2 de amostra 1	15
26 (Enxágüe)	Repetir 1-4	10
27	Prep 1 de amostra 2	15
28 (Enxágüe)	Repetir 1-4	10
29	Prep 1 de amostra 2	15
30	Repetir 1-4	10
31	Prep 2 de amostra 2	15
32 (Enxágüe)	Repetir 1-4	10
33	Prep 2 de amostra 2	15
34 (Enxágüe)	Repetir 1-4	10
35	Prep 1 de amostra 3	15
36 (Enxágüe)	Repetir 1-4	10
37	Prep 1 de amostra 3	15
38 (Enxágüe)	Repetir 1-4	10
39	Prep 2 de amostra 3	15
40 (Enxágüe)	Repetir 1-4	10
41	Prep 2 de amostra 3	15
42 (Enxágüe)	Repetir 1-4	10
43	Prep 1 de material de referência de CTLA4-Ig	15
44 (Enxágüe)	Repetir 1-4	10
45	Prep 2 de material de referência de CTLA4-Ig	15
46 (Enxágüe)	Repetir 1-4	10
47	Adequabilidade de Sistema (Prep 1 de padrão de mono)	15
48 (Enxágüe)	Repetir 1-4	10
49	Adequabilidade de Sistema (Prep 1 de padrão de mono)	15
50	Repetir 1-4	10
51	Adequabilidade de Sistema (Prep 2 de padrão de mono)	15
52	Repetir 1-4	10
53	Adequabilidade de Sistema (Prep 2 de padrão de mono)	15

*Repetir a seqüência para até três amostras em duplicata e agrupar com 2 injeções de cada preparado de Padrão de monossacarídeo. Usar todas as oito injeções de Padrões de Adequabilidade de sistema para amostras colocadas em grupos de três. Se operando com mais de três amostras, operar as amostras adicionais conforme mostrado na seqüência acima começando com a linha 19.

**Faixas de amostra com duas injeções de cada preparado de material de referência de CTLA4-Ig.

Adequabilidade de Sistema. O eletroferograma da primeira Adequabilidade de Sistema deverá ser similar a um onde o pico 1 é manose; o pico 2 é xilose; o pico 3 é fucose; e o pico 4 é galactose.

Nota: Quando outros instrumentos de CE que não o Beckman

PACE MDQ têm de ser usados, em virtude das várias configurações de cartuchos contendo o capilar de separação, o comprimento do capilar poderia ser diferente daquele especificado nesse método. Isso causaria variações no tempo de migração de analito, bem como na intensidade de pico.

- 5 A resolução entre dois picos vizinhos é calculada para os primeiros Padrões de Adequabilidade de sistema pelo instrumento de acordo com a seguinte equação:

$$R = \frac{2(t_2 - t_1)}{W_1 + W_2}$$

onde:

- R = resolução
 10 t_2, t_1 = tempos de migração dos dois picos vizinhos, respectivamente
 W_1, W_2 = larguras de pico na linha de base dos dois picos vizinhos, respectivamente

- O valor de R deve ser $\geq 1,0$. Se $R < 1,0$, enxaguar o capilar com as seqüências de lavagem/enxágüe; se o problema persiste, substituir o tampão antigo por tampão de operação recentemente preparado ou substituir o capilar.

- Para a última injeção de Adequabilidade de Sistema, o último pico (galactose) deve ter um fator de configuração $< 1,4$ usando a seguinte fórmula:

$$T = W_{0,05} / 2f$$

onde:

- T = fator de configuração
 $W_{0,05}$ = largura de pico a 5% de altura
 25 f = largura da frente de pico em pico máximo

Se $T \geq 1,4$, enxaguar o capilar com as seqüências de lavagem/enxágüe; se o problema persiste, substituir o tampão antigo por tampão de operação recentemente preparado ou substituir o capilar.

Injeção repetida dos primeiros quatro Padrões de Adequabilidade

de de Sistema deverá ir de encontro aos seguintes valores exemplificativos:

- Proporção de área de pico de galactose vs. xilose: RSD \leq 10%.

- Tempo de migração de galactose precisa ser \leq 15,0 minutos
- O perfil deverá ser equivalente à Figura 1, onde os quatro picos são observados e o padrão interno (Xilose) é o pico de número 2.

Se qualquer um dos valores exemplificativos acima não são obtidos, primeiro aumentar a tensão se o tempo de migração de galactose é mais de 15,0 minutos. Em seguida, se a proporção de área de pico é $>$ 10%, então, preparar tampão de CE fresco tendo certeza de seu pH ou substituir o capilar.

Após ajustes no instrumento, repetir injeções de adequabilidade de sistema. Quando de análise do perfil de pico, se uma diminuição significativa na altura de pico de Xilose ocorre, verificar se determinados cabos de fibra óptica no módulo de LIF não estão mal alinhados. Determinar o RSD percentual para o padrão monossacarídico através de comparação da proporção de áreas de pico dos componentes de padrão interno e padrão de monossacarídeo. Dividir a área de pico para cada componente monossacarídico pela área de pico do padrão interno para cada injeção de padrão de monossacarídeo. Calcular o RSD percentual para manose, fucose e galactose para as faixas dos dois padrões. O RSD deverá ser \leq 10%. Se esse valor médio exemplificativo não é met, então, o capilar deverá ser enxaguado ou substituído conforme acima. Faixas de amostras e padrões de monossacarídeo precisam ser repetidas.

Cálculos. Cálculo da proporção de área de pico de Man, Fuc e Gal com relação ao padrão interno (Xilose). Usado sobre injeções repetidas dos primeiros quatro Padrões de Adequabilidade de Sistema de modo a ir de encontro aos valores exemplificativos e realizar os mesmos cálculos sobre todas as faixas de Padrões de Adequabilidade de Sistema injetados antes e após amostra(s). Proporção de área de pico = Dividir a área de pico para cada componente monossacarídico (Man, Fuc e Gal) pela área de pico do padrão interno (Xilose) para cada injeção de Padrão de Adequabilidade de

sistema.

$$\text{Proporção de área de pico} = \frac{\text{Área de pico de monossacarídeo}}{\text{Área de pico de xilose}}$$

Calcular uma média das proporções de área de pico para Man, Fuc e Gal nos Padrões de Adequabilidade de Sistema. Também calcular o desvio padrão (S.D.) e desvio padrão relativo percentual (%RSD).

- 5 **Valores exemplificativos:** RSD para a proporção de área de pico de Galactose \square 10%. Faixas de dois Padrões de Adequabilidade de Sistema injetados antes e após amostra(s):

RSD percentual para a proporção de área de pico de Man, Fuc e Gal \square 10%.

- 10 Se esse valor exemplificativo médio não é obtido (RSD > 10%), então, o capilar precisa ser re-enxaguado com os procedimentos de enxágue e aquelas faixas de amostras e padrões de monossacarídeo precisam ser operadas novamente. Se o valor exemplificativo médio é ainda não é obtido, substituir o capilar e enxaguar. Operar as faixas de amostras e padrões de monossacarídeo novamente.
- 15

$$\text{Desvio padrão} = \sqrt{\frac{n\sum x^2 - (\sum x)^2}{n(n-1)}}$$

onde:

n = número de medições na amostra

x = medições individuais

$$\% \text{RSD} = \frac{\text{Desvio padrão}}{\text{Área média de pico medida}} \times 100 \%$$

- 20 Calcular a proporção molar de Manose/Proteína

$$R_{\text{Man}} = \frac{A_{\text{Man}} \times A_{\text{Xyl}10} \times V_{\text{Man}0} \times C_{\text{Man}0} \times MW_{\text{CTLA4-Ig}}}{A_{\text{Xyl}1} \times A_{\text{Man}0} \times V_p \times C_p \times MW_{\text{Man}}}$$

onde:

R_{Man} = proporção molar de Manose (Man) vs. proteína

A_{Man} = área de pico ($\mu\text{V}\cdot\text{seg}$) de Man na amostra

A_{Xyl} = área de pico ($\mu\text{V}\cdot\text{seg}$) de Xilose (Xyl) na amostra

- 25 $A_{\text{Xyl}10}$ = área média de pico ($\mu\text{V}\cdot\text{seg}$) de Xyl no padrão de mo-

nossacarídeo

$A_{\text{Man}0}$ = área média de pico ($\mu\text{V}\cdot\text{seg}$) de Man no padrão de monossacarídeo

5 $V_{\text{Man}0}$ = volume de Man contido na solução de trabalho de monossacarídeo usada para hidrólise (em μL)

$C_{\text{Man}0}$ = concentração de Man contida na solução de trabalho de monossacarídeo usada para hidrólise (em mg/mL)

V_p = volume de amostra de proteína usada para hidrólise (em μL)

10 C_p = concentração de amostra de proteína usada para hidrólise (em mg/mL)

$MW_{\text{CTLA4-Ig}}$ = Peso molecular de material de referência de CTLA4-Ig conforme o Certificado de Análise (COA)

MW_{Man} = Peso molecular de Manose (180,2 dáltons)

15 **Agrupamento de padrão.** Quando de cálculo das proporções molares de material de referência de CTLA4-Ig e amostras, usar todas as oito faixas de Padrões de Adequabilidade de Sistema. Calcular as médias das áreas de pico para inclusão nessa equação. Essa deve ser usada para as primeiras três amostras. Para todas as outras amostras, sempre usar a

20 área média de pico das próximas quatro faixas de padrões de monossacarídeo e as quatro faixas de padrões anteriores de monossacarídeo para cálculos da proporção molar.

Calcular a proporção molar de Fucose/Proteína:

$$R_{\text{Fuc}} = \frac{A_{\text{Fuc}} \times A_{\text{Xyl}0} \times V_{\text{Fuc}0} \times C_{\text{Fuc}0} \times MW_{\text{CTLA4-Ig}}}{A_{\text{Xyl}} \times A_{\text{Fuc}0} \times V_p \times C_p \times MW_{\text{Fuc}}}$$

25 onde:

R_{Fuc} = proporção molar de Fucose (Fuc) vs. proteína

A_{Fuc} = área de pico ($\mu\text{V}\cdot\text{seg}$) de Fuc na amostra

A_{Xyl} = área de pico ($\mu\text{V}\cdot\text{seg}$) de Xilose (Xyl) na amostra

30 $A_{\text{Xyl}0}$ = área média de pico ($\mu\text{V}\cdot\text{seg}$) de Xyl no padrão de monossacarídeo

$A_{\text{Fuc}0}$ = área média de pico ($\mu\text{V}\cdot\text{seg}$) de Fuc no padrão de monossacarídeo

V_{Fuc0} = volume de Fuc contido na solução de trabalho de monossacarídeo usada para hidrólise (em μL)

C_{Fuc0} = concentração de Fuc contida na solução de trabalho de monossacarídeo usada para hidrólise (em mg/mL)

5 V_p = volume de amostra de proteína usada para hidrólise (em μL)

C_p = concentração de amostra de proteína usada para hidrólise (em mg/mL)

10 $MW_{CTLA4-Ig}$ = Peso molecular de material de referência de CTLA4-Ig conforme o Certificado de Análise (COA)

MW_{Fuc} = Peso molecular de Fucose (164,2 dáltons)

Calcular a proporção molar de Galactose/Proteína:

$$R_{Gal} = \frac{A_{Gal} \times A_{Xyl0} \times V_{Gal0} \times C_{Gal0} \times MW_{CTLA4-Ig}}{A_{Xyl} \times A_{Gal0} \times V_p \times C_p \times MW_{Gal}}$$

onde:

15 R_{Gal} = proporção molar de Galactose (Gal) vs. proteína

A_{Gal} = área de pico ($\mu\text{V}\cdot\text{seg}$) de Gal na amostra

A_{Xyl} = área de pico ($\mu\text{V}\cdot\text{seg}$) de Xilose (Xyl) na amostra

A_{Xyl0} = área média de pico ($\mu\text{V}\cdot\text{seg}$) de Xyl no padrão de monossacarídeo

20 A_{Gal0} = área de pico ($\mu\text{V}\cdot\text{seg}$) average de Gal no padrão de monossacarídeo

V_{Gal0} = volume de Gal contido na solução de trabalho de monossacarídeo usada para hidrólise (em μL)

C_{Gal0} = concentração de Gal contido na solução de trabalho de monossacarídeo usada para hidrólise (em mg/mL)

25 V_p = volume de amostra de proteína usada para hidrólise (em μL)

C_p = concentração de amostra de proteína usada para hidrólise (em mg/mL)

30 $MW_{CTLA4-Ig}$ = Peso molecular de material de referência de CTLA4-Ig conforme o Certificado de Análise (COA)

MW_{Gal} = Peso molecular de Gal (180,2 daltos)

Nota: Quando de calculo de proporoes molar de material de referencia de CTLA4-Ig e amostras, usar a faixa do ultimo preparado de Padrao de Adequabilidade de Sistema e do proximo preparado de Padrao de Adequabilidade de Sistema. Calcular a media das reas de pico para inclu-
5 sao nessa equaao. Essa deve ser usada para as primeiras seis amostras. Para todas as outras amostras, sempre usar a rea media de pico das duas faixas de padroes de monossacarideo para calculos da proporao molar.

Valores exemplificativos. O RSD percentual para a proporao
10 de rea de pico para as duas faixas de Padrao de Adequabilidade de Sistema nao deverao exceder a 10%. A proporao molar media para monossacarideos neutros no material de referencia pode estar dentro da faixas especificadas na Tabela abaixo. Para cada componente, o RSD% para os quatro resultados (injeoes em duplicata de preparados em duplicada) devem ser
15 $\leq 25\%$.

Faixa de proporao molar de material de referencia de CTLA4-Ig

Monossacarideo	Faixa
Manose	11-18
Fucose	4,2-7,5
Galactose	9,2-18

Reportagem de resultados. Reportar o resultado medio como numero de moleculas de manose por molecula de CTLA4-Ig, numero de moleculas de fucose por molecula de CTLA4-Ig e numero de moleculas de galactose por molecula de CTLA4-Ig. Reportar os resultados de proporao molar para duas situaoes representativas. Para cada componente, o RSD %
20 para os quatro resultados (injeoes em duplicata de preparados em duplicada) deve ser $\leq 25\%$.

**Exemplo 65 - Quantificaao por mapeamento triptico de CTLA4-Ig Oxi-
25 daao e Deamidaao**

A finalidade do metodo e monitorar a consistencia lote-a-lote de

CTLA4-Ig usando um procedimento de mapeamento peptídico trípico manual com detecção e quantificação específicas de metionina oxidação e asparagina deamidação. Mapeamento peptídico envolve a proteólise ou outra fragmentação de uma proteína para criar um conjunto bem definido de fragmentos peptídicos os quais são, então, analisados, usualmente através de HPLC. O cromatograma ou mapeamento peptídico é muito sensível mesmo à menor alteração na estrutura química da proteína e é, assim, útil para detecção e caracterização de modificações pós-traducionais. A amostra de proteína de CTLA4-Ig é desnaturada em tampão de guanidina a 8 M-HCl e as ligações em ponte de dissulfeto de cisteína reduzidas com ditioneitol e S-alquiladas com iodoacetamida antes de digestão com a enzima proteolítica, tripsina. A mistura resultante de peptídeos trípicos é, então, analisada através de cromatografia de líquido de alto desempenho em fase reversa (RP-HPLC) com detecção por UV a 215 e 280 nm. Algumas abreviações são listadas abaixo:

Asn	Asparagina
Asp	Ácido aspártico
Asu	Amino-succinimida
isoAsp	Ácido isoaspártico
Met(O)	Sulfóxido de metionina
T26	Peptídeo trípico (281-302)
T26deam1	Peptídeo trípico isoAsp294 (281-302)
T26deam2	Peptídeo trípico Asp299 (281-302)
T26deam3	Peptídeo trípico Asp294 (281-302)
T26deam4	Peptídeo trípico Asu294 (281-302)
T6	Peptídeo trípico (84-93)
T6ox	Peptídeo trípico Met(O)85(84-93)

PRODUTOS QUÍMICOS e REAGENTES

Fase móvel A - TFA a 0,1% em água com grau para HPLC

Transferir os conteúdos todos de uma ampola de 1 mL de TFA para 1000 mL de água com grau para HPLC e misturar totalmente para preparar TFA a 0,1% (Fase móvel A). O TFA a 0,1% pode ser armazenado em temperatura ambiente durante até dois meses.

Fase móvel B - TFA a 0,1% em 80% de ACN e 20% de água com grau para HPLC

Transferir os conteúdos todos de uma ampola de 1 mL de TFA para 800 mL de acetonitrilo e 200 mL de água com grau para HPLC e misturar totalmente para preparar TFA a 0,1% em 80% de ACN (Fase móvel B) o qual pode ser armazenado em temperatura ambiente durante até dois meses.

5

Tampão de diluição - TRIS a 100 mM, NaCl a 25 mM, pH de 7,6

Dissolver 14,0 g de Trizma Pre-Set Crystal, pH de 7,6, e 1,46 g de NaCl em 1000 mL de água com grau para HPLC através de agitação da solução sobre uma placa de agitação magnética. Filtrar a solução através de uma unidade de filtro de 0,2 μ m. Armazenar a solução a 2 a 8 °C durante até dois meses.

10

Tampão de desnaturação - guanidina a 8 M, TRIS a 50 mM, pH de 8,0

Dissolver 152,8 g de hidrocloreto de guanidina e 1,4 g de Trizma Pre-Set Crystal, pH de 8, em 90 mL de água com grau para HPLC através de agitação da solução sobre uma placa de agitação magnética. Ajustar o pH para 8,0 com HCl ou NaOH e levar para o volume final de 200 mL com água com grau para HPLC. Filtrar a solução através de um filtro de 0,2 μ m. Armazenar a solução em temperatura ambiente durante até seis meses.

15

Tampão de Digestão - TRIS a 50 mM, CaCl₂ a 10 mM, pH de 7,6

Dissolver 7,0 g de Trizma Pre-Set Crystal, pH de 7,6, e 1,47 g de CaCl₂ em 1000 mL de água com grau para HPLC através de agitação da solução sobre uma placa de agitação magnética. Filtrar a solução através de um filtro de 0,2 μ m. Armazenar a solução a 2 a 8 °C durante até dois meses.

20

Agente de Redução - ditioneitol a 200 mM (DTT)

A 30,8 μ g de DTT, adicionar 1000 μ L de água imediatamente antes de uso e submeter a turbilhamento até dissolvida. A solução expira 24 horas a partir do momento de preparo.

25

Reagente de Alquilação - iodoacetamida a 400 mM (IAM)

A 74,0 μ g de iodoacetamida, adicionar 1000 μ L de água imediatamente antes de uso e submeter a turbilhamento até dissolvida. A solução expira 24 horas a partir do momento de preparo.

30

HCl a 1,0 M

Diluir 8,7 mL de ácido clorídrico concentrado para 100 mL com água com grau para HPLC. Armazenar a solução em temperatura ambiente durante até dois meses.

PADRÕES E CONTROLES

5 Padrão peptídico T6ox, 30 μ M

O padrão sintético de peptídeo triptico T6ox é Ala-Met(O)-Asp-Thr-Gly-Leu-Tyr-Ile-Cys-Lys \square 2TFA, FW 1358,4, ~95% de pureza em peso. Armazenar o sólido hermeticamente vedado a -20 °C e sempre aquecer para a temperatura ambiente em um secador para impedir a absorção de umidade. Pesar 1,0 \square 0,1 mg de T6ox, registrar o peso exato e dissolver em 1,50 mL de Tampão de Digestão. Adicionar 40 μ L de DTT a 200 mM e colocar a 37 °C durante 20 min. Esfriar para a temperatura ambiente, adicionar 48 μ L de iodoacetamida a 400 mM e alquilar em temperatura ambiente no escuro, durante 30 min. Diluir para um volume final de 24,5 mL com Tampão de Digestão a fim de proporcionar uma solução de padrão a 30 \square 3 μ M. Armazenar alíquotas de 1 mL do padrão T6ox a 30 μ M a -70 °C durante até 24 meses.

Padrão peptídico T26deam1, 30 μ M

O padrão sintético de peptídeo triptico T26deam1 é Gly-Phe-Tyr-Pro-Ser-Asp-Ile-Ala-Val-Glu-Trp-Glu-Ser-isoAsp-Gly-Gln-Pro-Glu-Asn-Asn-Tyr-Lys \square 2TFA, FW 2773,7, ~85% de pureza em peso. Armazenar o sólido hermeticamente vedado a -20 °C e sempre aquecer para a temperatura ambiente em um secador para impedir a absorção de umidade. Pesar 1,0 \square 0,1 mg de T26deam1, registrar o peso exato e dissolver em 1 mL de acetonitrilo a 30% v:v em Tampão de Digestão. Diluir para um volume final de 10,7 mL a fim de proporcionar uma solução de padrão a 30 \square 3 μ M. Armazenar alíquotas de 1 mL do padrão T26deam1 a 30 μ M a -70 °C durante até 24 meses.

PREPARO DE PADRÕES E AMOSTRAS

Redução e Alquilação

30 A faixa de concentração de proteína para mapeamento peptídico é de aproximadamente 20 mg/mL. Se a concentração de proteína é >20 mg/mL, diluir a amostra com tampão de diluição para uma concentração final

de aproximadamente 20 mg/mL. Preparar pelo menos 100 μ L de solução diluída. Em um tubo para centrífuga de 1,7 mL, adicionar 100 μ L de solução de CTLA4-Ig a 20 mg/mL (2 mg) (amostra ou material de referência) a 550 μ L de Tampão de desnaturação. Adicionar 35 μ L de Reagente de Redução a 200 mM, submeter o tubo a turbilhonamento durante 3-5 segundos, então, centrifugar durante aproximadamente 3 segundos. Incubar os tubos a 37 °C durante 20 \pm 2 minutos. Adicionar 38,5 μ L de Reagente de Alquilação a 400 mM a cada tubo, submeter a turbilhonamento durante 3-5 segundos, então, centrifugar durante aproximadamente 3 segundos. Incubar as amostras em temperatura ambiente no escuro durante 20 \pm 2 minutos. Colocar as colunas NAP-5 em a stand. Usar uma coluna por amostra. Enquanto as amostras estão em incubação em IAM, equilibrar as colunas NAP-5 com 7,5 mL de Tampão de Digestão. Descartar o efluente por procedimentos locais. Adicionar 500 μ L das misturas reduzidas e alquiladas over as colunas NAP-5, permitindo que o líquido drene através da coluna. Descartar o efluente por procedimentos locais. Adicionar 1,0 mL de Tampão de Digestão às colunas NAP-5 e coletar o efluente em tubos para centrífuga de 1,7 mL e misturar ligeiramente o efluente coletado.

Digestão. Reconstituir um frasco de tripsina (20 μ g) para cada mL de amostra ou material de referência a ser digerido, mais um frasco de tripsina adicional, com 86 μ L cada de tampão de tripsina (fornecido com a enzima) para proporcionar 0,25 μ g/ μ L. Empoçar os conteúdos dos frascos de tripsina juntos em um frasco. Digerir cada amostra com 80 μ L da solução de tripsina empoçada acima por mL de amostra a 37 °C durante 120 \pm 12 minutos. Quando de término da digestão, acidificar as amostras com 40 μ L de HCl a 1,0 M por mL de amostra e submeter a turbilhonamento durante 3-5 segundos. Pipetear 100 μ L de cada das digestões de amostras e do material de referência em frascos para amostrador automático. Preparar um controle de adequabilidade de sistema adicional contendo 95 μ L de material de referência digerido misturado com 5 μ L de padrão peptídico T6ox a 30 μ M e 5 μ L de padrão peptídico T26deam1 a 30 μ M a fim de proporcionar uma digestão reforçada com T6ox a 5% e T26deam1 a 5%. Colocar todos os

frascos no amostrador automático a 5 ± 5 °C para análise por HPLC. Armazenar todas as amostras digeridas restantes a -70 °C.

CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS

5 A tabela abaixo mostra a taxa de fluxo e o gradiente de cromatografia.

Tempo (min)	Fluxo (mL/min)	Fase móvel A	Fase móvel B
0	0,25	100	0
4	0,25	100	0
10	0,25	92	8
72	0,25	72	28
84	0,25	60	40
92	0,25	0	100
94	0,40	0	100
95	0,40	100	0
109	0,40	100	0
110	0,25	100	0

Equilibrar a coluna a 55 °C com 100% de fase móvel A durante pelo menos 25 minutos antes da primeira injeção. Monitorar a absorbância de UV a 215 nm e 280 nm. A tubulação da coluna para o detector deverá ter um diâmetro interno $\approx 0,01$ " de forma a minimizar a difusão de ampliação de banda. Manter a temperatura da coluna a 55 ± 2 °C. Manter a temperatura do amostrador automático a 5 ± 5 °C. A fase móvel A é usada como a injeção de placebo. Faixas de amostra (não mais do que dez a cada vez) são injeções de material de referência. A tabela abaixo mostra a seqüência de injeção para a análise cromatográfica. Note que todos os volumes de injeção são de 25 μ L, exceto quanto à amostra de controle consistindo de material de referência reforçado com padrões peptídicos T6ox a 5% e T26deam1 a 5% para a qual 28 μ L são injetados:

Frasco #	Injeção	Nome da amostra	Volume de injeção (□L)
1	1	Placebo (fase móvel A)	25
2	1	Material de referência	25
3	1	Amostra 1	25
4	1	Amostra 2	25
5	1	Amostra 3	25
6	1	Material de referência reforçado com T6ox a 5% e T26deam1 a 5%	28
2	1	Material de referência	25

VALORES EXEMPLIFICATIVOS

Valores exemplificativos. O perfil por mapeamento peptídico para o material de referência deve ser visualmente comparável ao cromatograma apresentado na Figura 1 com relação ao número, tamanho relativo e ordem de eluição de picos significativos para os traços a 215 nm e 280 nm. As diferenças de tempo de retenção para os picos T4, T25 e T27 no material de referência inicial e nas faixas não deverão exceder a $\pm 0,5$ minutos. O número de placas teóricas (N) deve ser $\square 100.000$. Se $N < 100.000$, re-equilibrar a coluna. Se o problema persiste, substituir a coluna. A resolução (R) deve ser $\square 1,5$ para os picos T2 e T12. Se $R < 1,5$, re-equilibrar a coluna. Se o problema persiste, substituir a coluna. O cromatograma a 280 nm do padrão de referência reforçado com T6ox e T6deam1 a 5% deve mostrar um aumento para o pico de T6ox eluindo a $\sim 33,0$ min, conforme mostrado na Figura 85. O cromatograma a 215 nm do padrão de referência reforçado com T6ox e T6deam1 a 5% deve mostrar um aumento para o pico de T26deam1 eluindo a $\sim 66,5$ min, conforme mostrado na Figura 87.

Valores exemplificativos de amostra. Os cromatogramas de injeção do primeiro material de referência e da amostra deverão ser visualmente equivalentes com relação ao número, tamanho relativo e ordem de eluição de picos significativos para os traços a 215 nm e 280 nm conforme indicado para os picos rotulados na Figura 85, com exceção dos picos oxidados e/ou deamidados para T6ox e T26deam, os quais são reportados se5-368.

paradamente. Os tempos de retenção para os picos T4, T25 e T27 na amostra devem estar dentro de $\pm 0,5$ minutos do tempo de retenção para os picos correspondentes de injeção do primeiro material de referência.

5 **CÁLCULOS. NOTA:** Usar os dados a 215 nm para esses cálculos, a menos que de outro modo especificado. Os tempos de retenção de picos T4, T25 e T27 (Figura 85) nas operações com faixas de material de referência não diferem em mais de 0,5 min (Figura 85).

10 **Número de Placas teóricas.** A eficiência de coluna, avaliada como o número de placas teóricas (N), é calculada usando o tempo de retenção e a largura de pico T27 a partir da operação de material com referência, (Figura 85), de acordo com a seguinte equação:

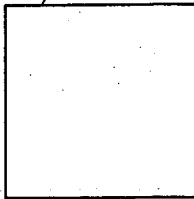
$$R_{Gal} = \frac{A_{Gal} \times A_{Xyl0} \times V_{Gal0} \times C_{Gal0} \times MW_{CTLA4-Ig}}{A_{Xyl} \times A_{Gal0} \times V_P \times C_P \times MW_{Gal}}$$

onde:

w = a largura de pico na linha de base medida através de extrapolação dos lados relativamente retos para a linha de base.

15 t = o tempo de retenção do pico T27 medido a partir do momento de injeção até o momento de eluição do pico máximo.

Resolução. A resolução (R) entre o pico T12 e pico T2 (Figura 85) é calculada usando a seguinte equação:



20 onde:

t_1, t_2 = tempos de retenção do pico T12 e pico T2, respectivamente

w_1, w_2 = largura de pico tangente-definida na linha de base dos picos com tempos de retenção t_1 e t_2 , respectivamente.

25 Para todas as amostras e padrões, calcular a oxidação percentual de Met85 a partir dos dados de área de pico a 280 nm como segue :

$$\text{Oxidação percentual} = 100 * A_{T60x} / (A_{T60x} + A_{T6})$$

onde:

A_{T6} = área de pico para T6, (84-93) no traço a 280 nm

A_{T6ox} = área de pico para T6ox, Met(O)⁸⁵(84-93), no traço a 280

nm

5 Para todas as amostras e padrões, calcular a deamidação percentual de Asn294 para dados da área de pico a 215 nm, conforme mostrado na Figura 87:

$$\text{Deamidação percentual} = 100 * \frac{A_{T26deam1}}{A_{T26} + A_{T26deam1} + A_{T26deam2} + A_{T26deam3} + A_{T26deam4}}$$

onde:

10 A_{T26} = área de pico para T26, (281-302), no traço a 215 nm

$A_{T26deam1}$ = área de pico para T26deam1, isoAsp²⁹⁴(281-302), no traço a 215 nm

$A_{T26deam2}$ = área de pico para T26deam2, Asp²⁹⁹(281-302), no traço a 215 nm

15 $A_{T26deam3}$ = área de pico para T26deam3, Asp²⁹⁴(281-302), no traço a 215 nm

$A_{T26deam4}$ = área de pico para T26deam4, Asu²⁹⁴(281-302), no traço a 215 nm

20 Fragmentos teoricamente esperados de digestões tríplicas de CTLA4-Ig (refira-se à Figura 85)

Fragmento	Resíduo	Seqüência
	T1	1-14MHVAQPAVV LASSR
	T2	15-28GIASFVCEYASPGK
	T3	29-33 ATEVR
25	T4	34-38 VTVLR
	T5*	39-83 QADSQVTEVCAATYMMGNELTFLDDSICTGTS SGNQ
		VNLTIQGLR
	T6	84-93AMDTGLYICK
30	T7*	94-128VELMYPPPYLIGINGTQIYVIDPEPCPDSD- QEPK

	T8**	129-132 SSDK
	T9**	133-158THTSPSPAPPELLGGSSVFLFPPKPK
	T10	159-165 DTLMISR
	T11	166-184TPEVTCVVVDVSHEDPEVK
5	T12	185-198FNWYVDGVEVHNAK
	T13	199-202 TKPR
	T14*	203-211EEQYNSTYR
	T15	212-227VVSVLTVLHQQDWLNGK
	T16	228-230EYK
10	T17	231-232 CK
	T18	233-236VSNK
	T19	237-244ALPAPIEK
	T20	245-248TISK
	T21	249-250 AK
15	T22	251-254GQPR
	T23	255-265EPQVYTLPPSR
	T24	266-270DELTK
	T25	271-280NQVSLTCLVK
	T26	281-302GFYPSDIAVEWESNGQPENNYK
20	T27	303-319TTPPVLDSDGSFFLYSK
	T28	320-324 LTVDK
	T29	325-326 SR
	T30	327-349WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK
	T31	350-356 SLSLSPG

25 * Contém carboidrato N-ligado.

** Contém carboidrato O-ligado.

Exemplo 66 – Estudo com uma única dose em seres humanos saudáveis

30 Um estudo com uma única dose, randomizado, em um único local foi usado para avaliar a farmacocinética de CTLA4-Ig (produzida através do processo com CD-CHO1) em indivíduos saudáveis. Treze (13) indivíduos que preenchem os Valores Exemplificativos de Inclusão e Exclusão

foram admitidos na unidade de estudo clínico e receberam CTLA4-Ig produzida pela CD-CHO1 de processo como uma única infusão intravenosa de 10 mg/kg durante 30 minutos. Cada indivíduo foi observado na unidade de estudo clínico durante 24 horas após a infusão. Amostras de sangue foram coletadas em pontos de tempo especificados após dosagem durante até 71 dias para quantificação de CTLA4-Ig. Os indivíduos foram avaliados quanto à farmacocinética: C_{max}, T_{max}, AUC (INF), T-HALF, CLT e V_{ss} para cada indivíduo foram derivados da concentração no soro versus os dados de tempo. CTLA4-Ig foi fornecida como uma formulação a 200 mg/frasco. A indivíduos saudáveis foi administrada uma infusão IV de 30 minutos de 10 mg/kg de CTLA4-Ig. Determinações de PK, segurança e determinação imunogênica foram avaliados em pontos de tempo específicos no Dia 71 após dosagem.

MÉTODOS ESTATÍSTICOS:

15 Tamanho de amostra: O tamanho de amostra de 13 indivíduos proporcionou 90% de confiança de que a estimativa da proporção de média geométrica estaria dentro de 15% do valor verdadeiro para C_{max} e dentro de 10% do valor verdadeiro para AUC(INF) para CTLA4-Ig.

20 Análise estatística: Dados demográficos do indivíduo, exames físicos, dados de laboratório e sinais vitais foram resumos. A incidência de eventos adversos foi colocada em uma tabela pelo sistema corporal e gravidade. Para C_{max} e AUC(INF) de CTLA4-Ig, intervalos de 90% de confiança para as proporções das médias geométricas de população para a CD-CHO1 de processo foram calculados a partir dos resultados de uma análise de variância sobre log(C_{max}) e log(AUC).

25 **RESULTADOS FARMACOCINÉTICOS:** Os resultados farmacocinéticos foram determinados usando um programa de análise não compartimental validado. Os parâmetros farmacocinéticos foram obtidos de 13 indivíduos dosados com CTLA4-Ig de CD-CHO1 de processo. A tabela a seguir
30 lista os parâmetros farmacocinéticos para CTLA4-Ig em indivíduos saudáveis. A Tabela abaixo mostra uma estatística somatória para os parâmetros farmacocinéticos de CTLA4-Ig.

Parâmetro Farmacocinético	(N = 13)
Cmax (µg/ mL) Média Geométrica (CV%)	284,7 (23%)
AUC(INF) (µg.h/mL) Média geométrica (CV%)	44403,0 (18%)
Tmax (h) mediana (min, max)	0,50 (0,50, 2,00)
T-HALF (Dias) Média (SD)	16,68 (3,24)
CLT (mL/h/kg) Média (SD)	0,23 (0,04)
Vss (L/kg) Média (SD)	0,09 (0,02)

CTLA4-Ig tinha valores médios de T-HALF de aproximadamente 17 dias em indivíduos saudáveis, consistente com meias-vidas obtidas em indivíduos com psoríase (10 - 18 dias) e pacientes com artrite reumatóide (aproximadamente 13 dias). Os valores médios de Vss observados de 0,09 a 0,10 L/kg indicaram que a CTLA4-Ig estava confinada primariamente ao sistema vascular e não distribuída significativamente nos espaços extravasculares.

A tabela a seguir mostra as concentrações no soro (ng/ml) por indivíduo.

INDIVIDUO	TRATAMENTO	DIAS	TEMPO (HORA)	CONCENTRACAO (NG/ML)
	CDCHO1	1	0,00	<LLQ
		1	0,25	138335,6
		1	0,50	251679,1
		1	1,0	266363,1
		1	2,00	286465,6
		1	6,00	243171,3
		1	12,00	252164,9
		2	0,00	170448,6
		4	0,00	120068,1
		8	0,00	67988,11
		15	0,00	41464,24
		22	0,00	22306,20
		29	0,00	17333,61
		43	0,00	10214,14
		57	0,00	4759,26
		71	0,00	2794,16

10

Tratamento	Indivíduo	Cmax (mcg/mL)	AUC (INF) (mcg.h/mL)	Tmax (h)	T-Half (dia)	Clearance (mL/h/Kg)	VSS (L/Kg)
CDCHO1		286,47	49123,2	2,00	15,97	0,20	0,08
		230,41	33477,3	1,00	16,15	0,30	0,11
		247,04	40005,4	2,00	19,80	0,25	0,13
		365,55	43112,7	0,50	17,58	0,23	0,09
		255,18	46276,2	2,00	15,29	0,22	0,09
		309,40	48848,2	1,00	18,95	0,20	0,09
		278,31	35339,3	0,50	14,23	0,28	0,09
		246,33	52238,7	0,50	20,52	0,19	0,10
		174,57	38534,8	0,50	15,61	0,26	0,13
		375,92	50418,0	0,50	13,70	0,20	0,07
		426,97	50761,0	0,50	13,13	0,20	0,06

287,59	61322,4	0,50	23,45	0,16	0,10
300,22	36438,5	0,50	12,42	0,27	0,08

Tratamento	Estatísticas	Cmax (mcg/mL)	AUC (INF) (mcg.h/mL)	Tmax (h)	T-Half (dia)	Clearance (mL/h/Kg)	VSS (L/Kg)
CDCHO1	N	13	13	13	13	13	13
	Média	291,84	45068,89	0,92	16,68	0,23	0,09
	Desvio Padrão	67,29	8085,22	0,64	3,24	0,04	0,02
	Média geométrica	284,71	44403,04	0,77	16,40	0,23	0,09
	C.V.	23	18	69	19	18	23
	Mediana	286,47	46276,20	0,50	15,97	0,22	0,09
	Min	174,57	33477,26	0,50	12,42	0,16	0,06
	Max	426,97	61322,42	2,00	23,45	0,30	0,13

Ensaio no soro para CTLA4-Ig

Amostras de soro foram analisadas com relação à CTLA4-Ig através de um ensaio imunoabsorvente enzima-ligado (ELISA) em um total de 25 operações analíticas. Todos os dados analíticos foram de encontro aos valores exemplificativos estabelecidos antes de análise de amostra, indicando que o método ELISA era preciso e apurado para a quantificação de CTLA4-Ig em amostras de estudo. Um resumo dos parâmetros de curva padrão e dados médios de QC para CTLA4-Ig no soro são apresentados na Tabela 48. A variabilidade entre e dentre as operações das QCs analíticas para CTLA4-Ig foi de 4,5% e 3,5% CV, respectivamente. As concentrações médias observadas das amostras de QC analíticas desviaram em menos de 8,9% dos valores nominais (Tabela 48).

15 Tabela 48: Sumário de dados de controle de qualidade para o ensaio de CTLA4-Ig em soro humano

Concentração Nominal	Baixa (3.000 ng/mL)	Media (12.000 ng/mL)	Alta (24.000 ng/mL)
Concentração Média Observada	2,866	13,608	24,526
Dev %	-4,5	8,9	2,2
Precisão entre operações (%CV)	4,5	2,8	3,0
Precisão dentre operações (%CV)	2,4	3,5	2,9
Varição total (%CV)	5,1	4,5	4,2
n	75	75	75
Número de Operações	25	25	25

Farmacocinética de CTLA4-Ig

A média e desvios padrões para as concentrações de CTLA4-Ig no soro para todos os indivíduos através do processo são apresentados na Tabela diretamente abaixo. As concentrações médias de CTLA4-Ig no soro versus os perfis do tempo durante 71 dias são apresentadas na FIG. 44.

5

Concentração média no soro vs. dados de tempo para CTLA4-Ig (ng/ml)

Dia	Hora	Min	N	Média	SD	%CV
.	.	0	15	0,42	0,87	207,21
.	.	15	15	135475,0	28811,82	21,27
.	.	30	15	273867,9	71406,26	26,07
.	1	0	15	253311,5	43221,58	17,06
.	2	0	15	254479,4	39611,12	15,57
.	6	0	15	219082,5	44894,29	20,49
.	12	0	15	191885,0	45180,00	23,55
1	0	0	15	161732,2	28740,25	17,77
3	0	0	15	101411,4	18615,59	18,36
7	0	0	15	59375,96	13598,10	22,90
14	0	0	15	33676,97	8148,64	24,20
21	0	0	15	21909,72	5226,77	23,86
28	0	0	15	17193,52	5145,61	29,93
42	0	0	15	8828,95	3246,22	36,77
56	0	0	15	5244,51	2621,36	49,98
70	0	0	15	2970,32	1811,64	60,99

Estatística resumida para os parâmetros farmacocinéticos (C_{max}, AUC (INF), CLT, V_{ss}, T_{max} e T-HALF) é apresentada na Tabela 50. Os resultados indicaram que CTLA4-Ig produzida através de um processo da invenção tinha um valor de T-HALF médio de aproximadamente 17 dias (faixa de 7-25 dias). Os valores de V_{ss} observados de 0,09 a 0,10 L/kg indicaram que CTLA4-Ig estava confinada primariamente ao volume de fluido extracelular.

10

Tabela 50: Estatística resumida para parâmetros farmacocinéticos de CTLA4-Ig produzida através do processo da invenção

Formulação	C _{max} (µg/mL) Média geométrica (%CV)	AUC(INF) (µg.h/mL) Média geométrica (CV%)	Clearance (mL/h/kg) Média (SD)	V _{ss} (L/kg) Média (SD)	T _{max} (h) Mediana (min, max)	T-HALF (dias) Média (SD)
Processo E (n = 13)	284,71 (23%)	44403,04 (18%)	0,23 (0,04)	0,09 (0,02)	0,50 (0,50, 2,00)	16,68 (3,24)

Os resultados indicaram que a T-HALF média para CTLA4-Ig produzida através do processo da invenção era de aproximadamente 17 dias. Os valores de *clearance* e volume de distribuição também são apresentados na Tabela 50.

A farmacocinética de CTLA4-Ig em indivíduos adultos saudáveis após uma única infusão intravenosa de 10 mg/kg e em pacientes com RA após múltiplas infusões intravenosas de 10 mg/kg é apresentada na Tabela 47.

Tabela 47

Parâmetro PK	Indivíduos saudáveis (após doses únicas de 10 mg/kg) n = 13	Pacientes com RA (depois de múltiplas doses de 10mg/kg) n = 14
Concentração de Pico (C _{max}) [mcg/mL]	292 (175 – 427)	295 (171 – 398)
Meia-vida terminal (t _{1/2}) [dias]	16,7 (12 – 23)	13,1 (8 – 25)
Clearance sistêmica (CL) [mL/h/kg]	0,23 (0,16 – 0,30)	0,22 (0,13 – 0,47)
Volume de distribuição (V _{ss}) [L/kg]	0,09 (0,06 – 0,13)	0,07 (0,02 – 0,13)

Exemplo 67 – Sequência de DNA do plasmídeo pcSDhuCTLA4lg

BglIII

```

1  GATCTCCCGA TCCCCTATGG TCGACTCTCA GTACAATCTG CTCGATGCC GCATAGTTAA
   CTAGAGGGCT AAGGGATACC AGCTGAGAGT CATGTTAGAC GAGACTACGG CGTATCAATT

61  GCCAGTATCT GCTCCCTGCT TGTGTGTTGG AGGTGCTGA GTAGTGGCGG AGCAAAATTT
   CCGTCATAGA CGAGGGACGA ACACACAACC TCCAGCGACT CATCAAGCGC TCGTTTTAAA

121  AAGCTACAAC AAGGCCAAGGC TTGACCGACA ATTGCATGAA GAATCTGCCT AAGGTTAGGC
   TTCGATGTTG TTCGGTTCG AACTGGGTGT TAACGTACTT CTTAGACGAA TCCCAATCCG

                                     ? ----- promotor de CMV -----
181  GTTTTGCGCT GCITCGCGAT GTACGGGCCA GATATACGGG TTGACATTGA TTATTGACTA
   CAAAACGGCA CGAAGCGCTA CATGCCCGGT CTATATGGGC AACTGTAACT AATAACTGAT

-----
241  GTTATTAATA GTAATCAATT ACGGGGTCAT TAGTTCATAG CCCATATATG GAGTTCGGCG
   CAATAATTAT CATTAGTTAA TGCCCCAGTA ATCAAGTATC GGTATATAC CTCGAAGGCG

-----
301  TTACATAACT TACGGTAAAT GGCCCGCCTG GCTGACCGCC CAACGACCCC CGCCCATTTGA
   AATGTATTGA ATGCCATTTA CCGGGCGGAC CGACTGGCGG GTTGTGGGG GCGGGTAACT

-----
361  CGTCAATAAT GACGTATGTT CCCATAGTAA CGCCAATAAG GACITTCAT TGACGTCAAT
   GCAGTTATTA CTGCATACAA GGGTATCATT GCGGTTATCC CTGAAAGGTA ACTGCAGTTA

-----
421  GGGTGGACTA TTTACGGTAA ACTGCCCACT TGGCAGTACA TCAAGTGTAT CATATGCCAA
   CCCACCTGAT AAATGCCATT TGACGGGTGA ACGTCTATGT AGTTCACATA GTATACGGTT

-----
481  GTACGCCCCC TATTGACGTC AATGACGGTA AATGGCCCGC CTGGCATTTAT GCCCAGTACA
   CATGCGGGGG ATAACGTCAG TTAATGCCAT TTACCGGGCG GACCGTAATA CCGGTCAATG

-----
541  TGACCTTATG GGACITTCCT ACTTGGCAGT ACATCTACGT ATTAGTCATC GCTATTACCA
   ACTGGAATAC CCTGAAAGCA TGAACCGTCA TGTAGATGCA TAATCAGTAG CGATAATGGT

```

NcoI

NcoI

-----CMV Promoter-----

601 TGGTGATGCG GTTTTGGCAG TACATCAATG GCGGTGGATA GCGGTTTGAC TCACGGGGAT
 ACCACTACGC CAAAACCGTC ATGTAGTTAC CCGCACCTAT CGCCAAACTG AGTGCCCCCTA

661 TTCCAAGTCT CCACCCCATG GACGTCAATG GGAGTTTGTT TTGGCAACAA AATCAACGGG
 AAGGTTTACA GGTGGGGTAA CTGCAGTTAC CCTCAAACAA AACCGTGGTT TTAGTTGCC

721 ACTTTCCAAA ATGTGTAAC AACTCCGCC CATTGAAGCA AATGGGCGGT AGGCGTGTAC
 TGAAGGTTT TACAGCATTG TTGAGGCGGG GTACTGCGT TTACCGCCA TCCGCACATG

781 GGTGGGAGGT CTATATAAGC AGAGCTTCT GGCTAACTAG AGAACCCACT GCTTACTGGC
 CCACCCCTCA GATATATTGG TCTCGAGAGA CCGATTGATC TCTTGGGTGA CGAATGACCG

HindIII

BamHI

841 TTATCGAAAT TAATACGACT CACTATAGGG AGACCCAAGC TTGGTACCGA GCTCGGATCC
 AATAGCTTTA ATTATGCTGA GTGATATCCC TCTGGGTTCG AACCATGGCT CGAGCCCTAGG

PstI

EcoRI

?-huCTLA-4 Ig-

M G V L

901 ACTAGTAACG GCGCCAGTG TGCTGGAATT CTGCAGATAG CTTACCAAT GGGTGTACTG
 TGATCATTGC CCGCGGTCAC ACGACCTTAA GACGTCTATC GAAGTGGTTA CCCACATGAC

961 L T Q R T L L S L V L A L L F P S M A S
 CTCACACAGA GGAGGCTGCT CAGTCTGGTC CTTGCACTCC TGTTPCCAAG CATGGCGAGC
 GAGTGTGTCT CCTGCGACGA GTCAGACCAG GAAAGTGAGG ACAAAGGTTT GTACCGCTCG

1021 M A M H V A Q P A V V L A S S R G I A S
 ATGGCAATGC ACGTGGCCCA GCCTGCTGTG GTACTGGCCA GCAGCCGAGG CATCGCCAGC
 TACCGTTACG TGCACCCGGT OGGACGACAC CATGACCGGT CGTCGGCTCC GTAGCGGTGG

1081 F V C E Y A S P G K A T E V R V T V L R
 TTTGTGTGTG AGTATGCATC TCCAGGCAAA GCCACTGAGG TCGGGGTGAC AGTGCTTCGG

AAACACACAC TCATACGTAG AGGTCCGTTT CGGTGACTCC AGGCCCACTG TCACGAAGCC

-----huCTLA-4 Ig-----

Q A D S Q V T E V C A A T Y M M G N E L
 1141 CAGGCTGACA GCCAGGTGAC TGAAGTCTGT GCGGCAACCT ACATGATGGG GAATGAGTTG
 GTCGACTGT CGTCCACTG ACTTCAGACA CCCCCTTGGG TGTACTACCC CTTACTCAAC

T F L D D S I C T G T S S G N Q V N L T
 1201 ACCTTCCTAG ATGATTCCAT CTGCACGGGC ACCTCCAGTG GAAATCAAGT GAACCTCACT
 TGGAAGGATC TACTAAGGTA GAGGTGCCCG TCGAGGTGAC CTTAGTTCA CTTGGAGTGA

NcoI

I Q G L R A M D T G L Y I C K V E L M Y
 1261 ATCCAAGGAC TGAGGGCCAT GGACACGGGA CTCTACATCT GCAAGGTGGA GCTCATGTAC
 TAGGTTCTCG ACTCCCGGTA CCTGTGCCCT GAGATGTAGA CGTCCACCT CGAGTACATG

P P P Y Y L G I G N G T Q I Y V I D P E
 1321 CCACCGCCAT ACTACCTGGG CATAGGCAAC GGAACCCAGA TTTATGTAAT TGATCCAGAA
 GGTGGCGGTA TGATGGACCC GTATCGGTTG CCTTGGGTCT AAATACATTA ACTAGGTCTT

P C P D S D Q E P K S S D K T H T S P P
 1381 CCGTGCCCG ATTCGTGATCA GGAGCCCAA TCTTCTGACA AAATCACAC ATCCCCACCG
 GGCACGGGTC TAAGACTAGT CCTCGGGTTT AGAAGACTGT TTTGAGTGTG TAGGGGTGGC

S P A P E L L G G S S V F L F P P K P K
 1441 TCCCCAGCAC CTGAACTCCT GGGGGGATCG TCAGTCTTCC TCTTCCCCC AAAACCCAAAG
 AGGGGTCTGT GACTTGAGGA CCCCCCTAGC AGTCAGAAGG AGAAGGGGGG TTTTGGGTTT

D T L M I S R T P E V T C V V V D V S H
 1501 GACACCCCTCA TGATCTCCCG GACCCCTGAG GTCACATGCG TGGTGGTGGG CGTGAGCCAC
 CTGTGGGAGT ACTAGAGGGC CTGGGGACTC CAGTGTACGC ACCACCACCT GCACCTGGTG

E D P E V K F N W Y V D G V E V H N A K
 1561 GAAGACCCCTG AAGTCAAGTT CAACTGGTAC GTGGACGGCG TGGAGGTGCA TAATGCCAAG
 CTTCTGGGAC TCCAGTTCAA GTTGACCATG CACCTGCCCG ACCTCCACGT ATTACGGTTC

-----huCTLA-4 Ig-----

1621 T K P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T V
 ACAAAGCCGC GGGAGGAGCA GTACAACAGC ACGTACCGTG TGGTCAGCGT CCTCACCGTC
 TGTTCGGCG CCGTCTCGT CATGTTGTG TGCATGGCAC ACCAGTCGCA GGAGTGGCAG

1681 L H Q D W L N G K E Y K C K V S N K A L
 CTGCACCAGG ACTGGCTGAA TGGCAAGGAG TACAAGTGCA AGGTCTCCAA CAAAGCCCTC
 GACGTGGTCC TGACCGACTT ACCGTTCCCTC ATGTTACCGT TCCAGAGGTT GTTTCGGGAG

1741 P A P I E K T I S K A K G Q P R E P Q V
 CCAGCCCCCA TCGAGAAAC CATCTCCAAA GCCAAAGGGC AGCCCGGAGA ACCACAGGTG
 GGTCCGGGGT AGCTCTTTTG GTAGAGGTTT CCGTTTCCCG TCGGGGCTCT TCGTGTCCAC

SmaI

1801 Y T L P P S R D E L T K N Q V S L T C L
 TACACCCCTGC CCCCATCCCG GGATGAGCTG ACCAAGAACC AGGTCAGCCT GACCTGCCTG
 ATGTGGGAGG GGGGTAGGGC CTTACTCGAC TGTTCTTTGG TCCAGTCGGA CTGGACCGAC

1861 V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E
 GTCAAAGGCT TCTATCCAG CGACATCGCC GTGGAGTGGG AGAGCAATGG GCAGCCGGAG
 CAGTTTCCGA AGATAGGGTC GCTGTAGCGG CACCTCACCC TCTCGTTACC CGTCGGCCTC

1921 N N Y K T T P P V L D S D G S F F L Y S
 AACAACTACA AGACCAAGCC TCCCGTGCTG GACTCCGACG GCTCCTTCTT CCTCTACAGC
 TTDTTGATGT TCTGTTGGG AGGGCAUGAC CTGAGGCTGC CGAGGAAGAA GGAGATGTGG

1981 K L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M
 AAGCTCACCG TGGACAAGAG CAGGTGGCAG CAGGGGAACG TCTTCTCATG CTCCGTGATG
 TTCCAGTGGC ACCTGTTCTC GTCCACCGTC GTCCCGTTGC AGAAGAGTAC GAGGCACTAC

2041 H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G K *
 CATGAGGCTC TGCACAACCA CTACACGCAG AAGAGCCCTT CCTGTCTCC GGGTAAATGA
 GTACTCCGAG ACCTGTTGGT GATGTGCGTC TTCTGGGAGA GGGACAGAGG CCCATTTACT

SmaI

XbaI

2101 GTGCGACGCG CCGCAAGCCC CCGCTCCCGG GGCTCTCGCG GTGCGACGAG GATGCTTCTA
CACGCTGCCG GCCGTTCCGG GCGAGGGGGC CCGAGAGCGC CAGCGTGCTC CTACGAAGAT

XbaI

2161 GAGGGCCCTA TTCTATAGTG TCACTAAAT GCTAGAGCTC GCTGATCAGC CTCGACTGTG
CTCCCGGGAT AAGATATCAC AGTGGATTTA CGATCTCGAG CGACTAGTCG GAGCTGACAC

?-----BGH polyadenylation signal-----

2221 CCTTCTAGTT GCCAGCCATC TGTGTGTTGTC CCCTCCCGCG TGCCTTCCTT GACCCCTGGAA
GGAAGATCAA CCGTCGGTAG ACAACAAACG GGGAGGGGGC ACGGAAGGAA CTGGGACCTT

2281 GGTGCCACTC CCACTGTCCT TTCCTAATAA AATGAGGAAA TTGCATCGCA TTGTCTGAGT
CCAAGGTGAG GGTGACAGGA AAGGATTATT TTACTCCCTT AACGTAGCGT AACAGACTCA

2341 AGGTGTCAIT CTATTCTGGG GGTGGGGTG GGGCAGGACA GCAAGGGGGA GCATTGGGAA
TCCACAGTAA GATAAGACCC CCCACCCAC CCGTCCCTGT CGTCCCCCT CCAACCCTT

----->

2401 GACAATAGCA GGCATGCTCG GGATGCGGTG GGCTCTATGG CTTCTGAGGC GAAAAGAACC
CTGTTATCGT CCGTACGACC CCTACGCCAC CCGAGATACC GAAGACTCCG CTTTCTTGG

2461 AGCTGGGGCT CTAGGGGGTA TCCCCACGCG CCCTGTAGCG GCGCATTAG CCGGGCGGGT
TCGACCCCGA GATCCCCCAT AGGGGTGCGC GGGACATCGC CGGTAAATC GCGCCGCCA

2521 GTGGTGGTTA CCGCAGCGT GACCGCTACA CTTGCCAGCG CCCTAGCGGC CGCTCCTTTC
CACCACCAAT GCGCGTCGCA CTGGCGATGT GAAOGGTGCG GCGATCGCGG GCGAGGAAAG

2581 GCTTTCTTCC CTTCCTTCTT CCGCACGTTT GCGCTGTGGA ATGTGTGTCA GTTAGGGTGT
CGAAAGAAGG GAAGGAAAGA GCGGTGCAAG CGGGACACCT TACACACAGT CAATCCACA

2641 GGAAAGTCCC CAGGCTCCCC AGCAGGCAGA AGTATGCAA GCATGCATCT CAATTAGTCA
CCTTTCAGGG GTCCGAGGGG TCGTCCGTCT TCATACGTTT CGTACGTAGA GTTAATCAGT

2701 GCAACCAGGT GTGGAAAGTC CCCAGGCTCC CCAGCAGGCA GAAGTATGCA AAGCATGCAT
CGTTGGTCCA CACCTTTCAG GGGTCCGAGG GGTGTCCTGT CTTACATAGT TTCGTACGTA

2761 CTCAATTAGT CAGCAACCAT AGTCCCGCCC CTAAGTCCGC CCATCCCGCC CCTAACTCCG
GAGTTAATCA GTCGTTGGTA TCAGGGCCGG GATTCAGGCG GSTAGCGCGG GGATTGAGGC

NotI

?-----SV40 Promoter-----

2821 CCCAGTCCCG CCCATTCTCC GCGCCATGCG TGAATAATTT TTTTATTTTA TGCAGAGGCC
GGTCAAGGC GGTAAGAGG CCGGGTACCG ACTGATTAAA AAAAATAAAT ACCTCTCCGG

----->
2881 GAGGCGCCT CGGCCTCTGA GCTATTCCAG AAGTAGTGAG GAGGCTTTTT TGGAGGCCTA
CTCGCGCGGA GCGSAGACT CGATAAGGTC TTCATCACTC CTTCCGAAAA ACCTCCGGAT

HindIII

2941 GGCITTTGCA AAAAGCTTGG ACAGCTGAGG GCTGCGATTT CGCGCCAAAC TTGACGGCAA
CCGAAAACGT TTTTCGAACC TGTGACTCC CGAGGCTAAA GCGCGGTTTG AACTGCGGTT

-----dhfr-----

3001 TCCTAGCGTG AAGGCTGCTA GGATTTTATC CCGCTGCCA TCATGGTTGG ACCATTGAAC
AGGATCGCAC TTCCGACCAT CCTAAAATAG GGGCGACGGT AGTACCAAGC TGSTAACTTG

3061 TGCATCGTGG CGGTGTCCCA AGATATGGGG ATTGGCAAGA ACGGAGACCT ACCCTGGCCT
ACGTAGCAGC GGCACAGGGT TCTATACCCC TAACCGTTCT TGCCTCTGGA TGGGACCGGA

3121 CCGCTCAGGA ACGAGTTCAA GACTTTCCAA AGAATGACCA CAACCTCTTC AGTGGAAAGGT
GGCGAGTCTT TGCTCAAGTT CATGAAGGTT TCTTACTGGT GTTGGAGAAG TCACCTTCCA

3181 AAACAGAATC TGGTGATTAT GGGTAGGAAA ACCTGGTTCT CCATTCCTGA GAAGAATCGA
TTTGTCTTAG ACCACTAATA CCCATCCTTT TGGACCAAGA GGTAAAGGACT CTTCTTAGCT

3241 CCTTTAAAGG ACAGAATTAA TATAGTTCTC AGTAGAGAAC TCAAAGAACC ACCACGAGGA
GGAAATTCG TGTCTTAATT ATATCAAGAG TCATCTCTTG AGTTTCTTGG TGGTCTCCT

dhfr

3301 GCTCATTTC TTGCCAAAAG TTGGATGAT GCCTTAAGAC TTATTGAACA ACCGGAATG
CGAGTAAAAG AACGGTTTTT AACCTACTA CCGAATTCTG AATAACTTGT TGGCCTTAAC

3361 GCAAGTAAAG TAGACATGGT TTGGATAGTC GGAGGCAGTT CTGTTTACCA GGAAGCCATG
CGTTCAATTC ATCTGTACCA AACCTATCAG CCTCCGTCAA GACAAATGGT CCTTCGGTAC

3421 AATCAACCAG GCCACCTCAG ACTCTTTGTC ACAAGGATCA TGCAGGAATT TGAAAGTGAC
TTAGTTGGTC CGGTGGAGTC TGAGAAACAC TGTTCCCTAGT ACGTCCTTAA ACTTTCACTG

3481 ACGTTTTTCC CAGAAATTGA TTGGGGGAAA TATAAACTTC TCCCAGAATA CCCAGGGCTC
TGCAAAAAGG GTCCTTAACT AAACCCCTTT ATATTTGAAG AGGGTCTTAT GGGTCCGCAG

3541 CTCCTTGAGG TCCAGGAGGA AAAAGGCATC AAGTATAAGT TTGAAGTCTA CGAGAAGAAA
GAGAGACTCC AGTCCCTCCT TTTTCCGTAG TTCATATTCA AACTTCAGAT GCTCTTCTTT

3601 GACTAACAGG AAGATGCTTT CAAGTTCTCT GCTCCCTCC TAAAGCTATG CATTTTTATA
CTGATTGTCC TTCTACGAAA GTTCAAGAGA CGAGGGGAGG ATTTCCGATC GTAAAAATAT

NcoI

BglII

3661 AGAOCATGGG ACTTTTGCTE GCTTTAGATC TTGTGAAGG AACCTTACIT CTGTGGTGTG
TCTGGTACCC TGAAAACGAC CGAAATCTAG AAACACTTCC TTGGAATGAA GACACCACAC

3721 ACATAATTGG ACAAACTACC TACAGAGATT TAAAGCTCTA AGGTAAATAT AAAAITTTTA
TGTATTAACC TGTTGATGG ATGTCTCTAA ATTTCCGAGAT TCCATTTATA TTTTAAAAAT

3781 AGTGTATAAT GTGTTAACT ACTGATTCTA ATTGTTTGTG TATTTTAGAT TCCAACCTAT
TCACATATTA CACAATTGA TACTAAGAT TAACAAACAC ATAAAATCTA AGGTTGGATA

3841 GGAAGTATG AATGGAGCA GTGTTGAAAT GCCTTTAATG AGGAAAACCT GTTTTGCTCA
CCTTGACTAC TTACCCTCGT CACCACCTTA CGAAAATTAC TCCTTTTGGG CAAAACGAGT

3901 GAAGAAATGC CATCTAGTGA TGATGAGGCT ACTGCTGACT CTCAACATTC TACTCCTCCA
 CTTCTTTTACG GTAGATCACT ACTACTCCGA TGACGACTGA GAGTTGTAAG ATGAGGAGGT

3961 AAAAGAAGA GAAAGGTAGA AGACCCCAAG GACTTTCCTT CAGAATTGCT AAGTTTTTTG
 TTTTCTTCT CTITCCATCT TCTGGGGTTC CTGAAAGGAA GTCTTAACGA TTCAAAAAAC

4021 AGTCATGCTG TGTTTAGTAA TAGAACTCTT GCTTGCTTTG CTATTTACAC CACAAAGGAA
 TCAGTACGAC ACAAATCATT ATCTTGAGAA CGAACGAAAC GATAAATGTG GTGTTTCCTT

4081 AAAGCTGCAC TGCTATACAA GAAAATTATG GAAAAATATT CTGTAACTTT TATAAGTAGG
 TTTTCGACGTG ACGATAATGT CTTTTAATAC CTTTTTATAA GACATTGGAA ATATTCAATC

4141 CATAACAGTT ATAATCATAA CATACTGTTT TTTCTTACTC CACACAGGCA TAGAGTGTCT
 GTATTGTCAA TATTAGTATT GTATGACAAA AAAGAAATGAG GGTGTCCGT ATCTCACAGA

4201 GCTATTAATA ACTATGCTCA AAAATTGTGT ACCTTTAGCT TTTTAATTTG TAAAGGGGTT
 CGATAAATTAT TGATACGAGT TTTTAACACA TGGAAATCGA AAAATTAAAC ATTTCCCAA

4261 AATAAGGAAT ATTTGATGTA TAGTGCCTTG ACTAGAGATC ATAATCAGCC ATACCACATT
 TTATTCCCTTA TAAACTACAT ATCAGGGAAC TGATCTCTAG TATTAGTCGG TATGGTGTAA

4321 TGTAGAGGTT TTACTTGCTT TAAAAACCT CCCACACCTC CCCCTGAACC TGAACATAA
 ACATCTCCAA AATGAACGAA ATTTTTTGA GGGTGTGGAG GGGGACTTGG ACTTTGTATT

4381 AATGAATGCA ATTGTTGTTG TTAAGTTGTT TATTGCAGCT TATAATGGTT ACAAATAAG
 TTACTTACGT TAACAACAAC AATTGAACAA ATAACGTGCA ATATTACCAA TGTTTTATTTC

4441 CAATAGCATC ACAAATTTCA CAAATAAAGC ATTTTTTTCA CTGCATTTCA GTTGTGGTIT
 GATATCGTAG TGTTTAAAGT GTTTATTTG TAAAAAAGT GACGTAAGAT CAACACCAA

4501 GTCCAAACTC ATCAATGTAT CTTATCATGT CTGGATCGGC TGGATGATCC TCCAGCGCGG
 CAGGTTTGAG TAGTTACATA GAATAGTACA GACCTAGCCG ACCTACTAGG AGGTCCGCGC

4561 GGATCTCATG CTGGAGTICT TCGCCACCC CAACITGITT ATTGCAGCTT ATAATGGTIA
 CCTAGAGTAC GACCTCAAGA AGCGGGTGGG GTTGAACAAA TAACGTGAA TATTACCAAT

4621 CAAATAAAGC AATAGCATCA CAAATTTCCAC AAATAAAGCA TTTTTTTCCAC TGCATTCTAG
 GITTATTTCCG TTATCGTAGT GITTAAAGTG TTTATTTCCGT AAAAAAAGTG ACGTAAGATC

4681 TTGTGGTTTG TCCAAACTCA TCAATGTATC TTATCATGTC TGTATACCGT CGACCTCTAG
 AACACCAAAC AGGTTTGAGT AGTTACATAG AATAGTACAG ACATATGGCA GCTGGAGATC

4741 CTAGAGCTTG GCGTAATCAT GGTCCATAGCT GTTTCCTGTG TGAAATTGTT ATCCGCTCAC
 GATCTCGAAC CGCATTAGTA CCAGTATOGA CAAAGGACAC ACTTTAACAA TAGGCGAGTG

4801 AATTCCACAC AACATACGAG CCGGAAGCAT AAAGTGTAAG CCTGGGGGTG CCTAATGAGT
 TTAAGGTGTG TGTATGCTC GGCCTTCGTA TTTACATTT CGGACCCAC GGATTACTCA

4861 GAGCTAACTC ACATTAATTG CGTTGCGCTC ACTGCCCGCT TTCCAGTCGG GAAACCTGTC
 CTCGATTGAG TGTAAATTAAC GCAACGCGAG TGACGGGCGA AAGGTACGCC CTTTGGACAG

4921 GTGCCAGCTG CATTAAATGAA TCGGCCAACG CGCGGGGAGA GCGGTTTGTG GTATTGGGCG
 CACGGTCCAC GTAATTACTT AGCGGTTGC GCGCCCTCT CCGCCAAACG CATAACCCGC

4981 CTCTTCCGCT TCTTCGCTCA CTGACTCGCT GCGCTCGGTG GTTCGGCTGC GCGGAGCGGT
 GAGAAGGCGA AGGAGCGAGT GACTGAGCGA CGGAGCCAG CAGCCGAGC CGCTCGCCA

5041 ATCAGCTCAC TCAAAGGCGG TAATACGTT ATCCACAGAA TCAGGGGATA ACGCAGGAAA
 TAGTCGAGTG AGTTTCGCGC ATTATGCCAA TAGGTGTCTT AGTCCCCTAT TCGTCCCTTT

?-----ColE1 ori-----

5101 GAACATGTGA GCAAAAGGCC AGCAAAAGGC CAGGAACCGT AAAAAGGCCG CGTTGCTGGC
 CTGTACTACT CGTTTTCCGG TCGTTTTCCG GTCCTTGGCA TTTTTCCGGC GCAACGACCG

5161 GTTTTTCCAT AGGCTCCGCC CCCCTGAOGA GCATCACAAA AATCGACGCT CAAGTCAGAG
 CAAAAGGTA TCCGAGGCCG GGGACTGCT CGTAGTGTT TTAGCTGOGA GTTCAGTCTC

5221 GTGGCGAAAC CCGACAGGAC TATAAGATA CCAGGCGTTC CCCCTGGAA GCTCCCTCGT
 CACCGCTTTC GGCTGTCTG ATATTTCTAT GGTCCGCAA GGGGACCTT CGAGGGAGCA

-----ColE1 ori-----

5281 GCGTCTCTCT GTTCCGACCC TCCCGCTTAC CGGATACCTG TCCGCTTTTC TCCCTTCGGG
 CCGGACAGGA CAAGCTGGG ACGGCGAATG GCCTATGGAC AGGCGGAAAG AGGGAAGCCC

5341 AAGCGTGGCG CTTTCGCAAT GCTCACCGTG TAGGTATCTC AGTTCCGTTT AGGTGCTTCG
 TTCGCACCGC GAAAGAGTTA CGAGTGGCAC ATCCATAGAG TCAAGCCACA TCCAGCAAGC

ApaLI

5401 CTCCAAGCTG GGCTGTGTGC ACCAAGCCCC CGTTCAGCCC GACCGCTGGC CCTTATCCGG
 GAGGTTCCAC CCGACACACG TGCTTGGGGG GCAAGTCCGG CTGGCGACGC GGAATAGGCC

5461 TAACTATCGT CTTGAGTCCA ACCCGTAAAG ACACGACTTA TCGCCACTGG CAGCAGCCAC
 ATTGATAGCA GAACTCAGGT TGGGCCATTG TGTGCTGAAT AGCGGTGACC GTCGTCGGTG

5521 TGSTAACAGG ATTAGCAGAG CAGGATATGT AGGCGGTGCT ACAGAGTTCT TGAAGTGGTG
 ACCATTGTCC TAATCGTCTC GCTCCATACA TCCGCCACGA TGTCTCAAGA ACTTCACCAC

5581 GCCTAACTAC GGCTACACTA GAAGGACAGT ATTTGGTATC TCGGCTCTGC TGAAGCCAGT
 CCGATTGATG CCGATGTGAT CTTCCCTGCA TAAACCATAG ACGGAGAGC ACTTCGGTCA

5641 TACCTTCGGA AAAAGAGTTG GTAGCTCTTG ATCCGGCAAA CAAACCACCG CTGGTAGCGG
 ATGGAAGCCT TTTTCTCAAC CATCGAGAAC TAGGCGTTT GTTTGGTGGC GACCATCGCC

5701 TGGTTTTTTT GTTTGCAAGC AGCAGATTAC GCGCAGAAAA AAAGGATCTC AAGAAGATCC
 ACCAAAAAAA CAAACGTTCC TGCTCTAATG CCGCTCTTTT TTTCCTAGAG TTCTCTAGG

-----?

5761 TTTGATCTTT TCTACGGGGT CTGACGCTCA GTGGAAAGAA AACTCAGGTT AAGGGATTTT
 AAAGTAGAAA AGATGCCCCA GACTGCGAGT CACCTTGCTT TTGAGTGCAA TTCCCTAAAA

5821 GGTCAAGAGA TTATCAAAA GGATCITCAC CTAGATCCTT TTAATTTAAA AATGAAGTTT
 CCAGTACTCT AATAGTTTTT CCTAGAAGTG GATCTAGGAA AATTTAATTT TTAAGTCAAA

5881 TAAATCAATC TAAAGTATAT ATGAGTAAAC TTGGTCTGAC AGTTACCAAT GCTTAATCAG
 AITTAGITAG ATTTATATA TACTCATTIG AACCAAGACTG TCAATGGTTA CGAATTAGTC
 <-----ampR----->

5941 TGAGGCACCT ATCTCAGCGA TCTGTCTATT TCGTTTCATCC ATAGTTGCCT GACTCCCCGT
 ACTCCGTGGA TAGAGTCGCT AGACAGATAA AGCAAGTAGG TATCAACCGA CTGAGGGSCA

6001 CGTGTAGATA ACTACGATAC GGGAGGGCTT ACCATCTGGC CCCAGTGCCT CAATGATACC
 GCACATCTAT TGATGCTATG CCGTCCCGAA TGGTAGACCG GGGTCACGAC GTTACTATGG

6061 GCGAGACCCA CGCTCACCGG CTCCAGATTT ATCAGCAATA AACCAAGCCAG CCGGAAGGGC
 CGCTCTGGGT GCGAGTGGCC GAGGTCTAAA TAGTCGTTAT TTGGTCGGTC GGCCTTCCCG

6121 CGAGCGCAGA AGTGGTCCCTG CAACCTTTATC CGCCTCCATC CAGTCTATTA ATTGTTGCCG
 GCTCGGCTCT TCACCAGGAC GTTGAATAG GCGGAGGTAG GTCAGATAAT TAACAAAGGC

6181 GGAAGCTAGA GTAAGTAGTT CGCCAGTTAA TAGTTTGCGC AACGTTGTTG CCATTGCTAC
 CCTTCGATCT CATTATCAA GCGGTCAATT ATCAAAGCGG TTGCAACAAC GGTAACGATG

6241 AGGCATCGTG GTGTCAAGCT CGTCGTTTGG TATGGCTTCA TTCAGCTCCG GTTCCCAAGC
 TCCGTAGCAC CACAGTGGGA GCAGCAAACC ATACCGAAGT AAGTCGAGGC CAAGGGTTGC

6301 ATCAAGGCGA GTTACATGAT CCCCATGTT GTGCAAAAAA GCGGTTAGCT CTTTGGTCC
 TAGTTCCGCT CAATGTACTA GGGGTACAA CACGTTTTTT CGCCAATCGA GGAAGCGAG

PvuI

-----ampR-----

6361 TCCGATCGTT GTCAGAAGTA AGTTGGCCGC AGTGTATCA CTCATGGTTA TGGCAGCACT
 AGGCTAGCAA CAGTCTTCAT TCAACCGGCG TCACAATAGT GAGTACCAAT ACCGTCTGTA

6421 GCATAATTCT CTTACTGTCA TGCCATCGT AAGATGCITT TCTGTGACTG GTGAGTACTC
 CGTATTAAGA GAATGACAGT ACGGTAGGCA TTCTACGAAA AGACTCTGAC CACTCATGAG

6481 AACCAAGTCA TTCTGAGAAT AGTGTATGCG GCGACCGAGT TGCTCTTGCC CGCGTCAAT
 TTGCTTCAGT AAGACTCTTA TCACATAAGC CGCTGGCTCA ACGAGAACGG GCCCGAGTA

6541 ACCGGATAAT ACCGGGCCAC ATAGCAGAAC TTTAAAAGTG CTCATCATTC GAAAACGTTT
 TGCCCTATTA TGGCGCGGTG TATGCTCTTG AAATTTTCAC GAGTAGTAAC CTTTTGCAAG

6601 TTGGGGCGA AAACCTCTCA GGATCTTACC GCTGTTGAGA TCCAGTTGGA TGTAAACCCAC
 AAGCCCCGCT TTTGAGAGTT CCTAGAAATGG CGACAACCTT AGGTCAAGCT ACATTGGGTG

ApaLI

6661 TCGTGCACCC AACTGATCTT CAGCATCTTT TACTTTTACC AGCGTTTCTG GGTGAGCAAA
 AGCACGTGGG TTGACTAGAA GTGCTAGAAA ATGAAAGTGG TCGCAAAGAC CCACTCGITT

6721 AACCGGAAGG CAAAATGCCG CAAAAAGGG AATAAGGGCG ACACGGAAAT GTTGAATACT
 TTGTCTTCC GTTTTACGGC GTTTTTTCCC TTATTCCCAG TGTGCTTTTA CAACTTATGA

--?

6781 CATACTCTTC CTTTTTCAAT ATTATTGAAG CATTTATCAG GGTATTGTG TCATGAGCGG
 GTATGAGAAG GAAAAAGTTA TAATACTTC GTAATATGTC CCAATAACAG AGTACTCGCC

6841 ATACATATTT GAATGTATTT AGAAAAATAA ACAAATAGGG GTTCCGCGCA CATTTCCTCG
 TAGTATAAAA CTTACATAAA TCITTTTATF TGTTTATCCC CAAGGCGCGT GTAAAGGGGC

BglIII

~

6901 AAAAGTGCCA CCTGACGTG ACGGATCGGG A
 TTTTCAGGT GGACTGCAGC TGCTAGCCC T

- sinal de poliadenilação de BGH
- 5 • Promotor SV40

Os Exemplos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 16, 17, 18, 21, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 42, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67 acima se referem, em particular, à proteína de C-TLA4-Ig tendo SEQ ID NO: 1, 2, 5, 6, 7, 8, 9, 10 ou 18 e os Exemplos 19, 20,

22, 23, 24, 25, 26, 27, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 52, 53, 54, 55, 56, 57 acima se referem, em particular, à proteína de CTLA4-Ig tendo SEQ ID NO: 4, 11, 12, 13, 14, 15 ou 16. Conforme descrito na presente especificação, os métodos relativos a e usos dessas proteínas nos Exemplos são ilustrativos de métodos relativos a e usos de outras proteínas de CTLA4-Ig da invenção.

Composições exemplificativas e não limitativas compreendendo moléculas de CTLA4-Ig da invenção incluem tais composições em que:

(1) as moléculas de CTLA4-Ig compreendem qualquer uma ou mais de SEQ ID NO: 2, 5, 6, 7, 8, 9, 10 ou 18 e as moléculas de CTLA4-Ig têm uma área de menos de ou igual a cerca de 5,0 por cento de espécies de elevado peso molecular de CTLA4-Ig (ou tetrâmeros de CTLA4-Ig) conforme determinado através de cromatografia por exclusão de tamanho e detecção espectrofotométrica (um método de medição para o qual é apresentado no Exemplo 10). Mais particularmente, a invenção proporciona tais composições ainda tendo uma ou mais das seguintes características:

não excedendo uma quantidade máxima de endotoxina bacteriana de 0,35 EU/mg de moléculas de CTLA4-Ig ou 76,8 EU/mL (a qual pode ser uma ausência de endotoxina bacteriana); um método para medição dessa característica é apresentado no Exemplo 48;

não excedendo uma biocarga máxima de 1 CFU/10 mL ou 1 CFU/mL (a qual pode ser uma ausência de biocarga); um método para medição dessa característica é apresentado no Exemplo 49;

fornecimento (como moléculas de CTLA4-Ig ou como a referida composição) de (a) cerca de 10 a 22 bandas com uma faixa de pI de cerca de 4,3 a cerca de 5,6, intensidade de banda cumulativa de 90% - 110% em uma faixa de pI de cerca de 4,3 a cerca de 5,3 e cerca de 3 bandas principais em uma faixa de pI de cerca de 4,5 a cerca de 5,2 ou (b) isoformas de CTLA4-Ig dominantes tendo um pI que é menos de ou igual a 5,1 e pelo menos 90% das moléculas de CTLA4-Ig exibem um pI menos de ou igual a cerca de 5,3; um método para medição dessa característica é apresentado no Exemplo 50;

uma área de menos de ou igual a 3,5 por cento das moléculas de CTLA4-Ig são espécies oxidadas das mesmas e uma área de menos de ou igual a 2,5 por cento das moléculas de CTLA4-Ig são espécies deamidadas das mesmas; métodos para medição dessas características são apresentados no Exemplo 47;

as moléculas de CTLA4-Ig têm uma área de mais de ou igual a 95,0 por cento de dímeros de CTLA4-Ig conforme determinado através de cromatografia por exclusão de tamanho e detecção espectrofotométrica; um método para medição dessa característica é apresentado no Exemplo 10;

as moléculas de CTLA4-Ig têm uma área de menos de 5,0 por cento de espécies de elevado peso molecular de CTLA4-Ig (ou tetrâmeros de CTLA4-Ig) conforme determinado através de cromatografia por exclusão de tamanho e detecção espectrofotométrica; um método para medição dessa característica é apresentado no Exemplo 10;

as moléculas de CTLA4-Ig têm uma área de menos de ou igual a 0,5 por cento de espécies de baixo peso molecular (ou monômeros de CTLA4-Ig) conforme determinado através de cromatografia por exclusão de tamanho e detecção espectrofotométrica ou uma área de menos de 0,5 por cento de espécies de baixo peso molecular (ou monômeros de CTLA4-Ig) conforme determinado através de cromatografia por exclusão de tamanho e detecção espectrofotométrica; um método para medição dessa característica é apresentado no Exemplo 10;

não excedendo uma quantidade máxima de DNA de 2,5 picograma/mg de moléculas de CTLA4-Ig ou 2,5 picograma/mg de dímero de CTLA4-Ig (a qual pode ser uma ausência de DNA); um método para medição dessa característica é apresentado no Exemplo 58;

não excedendo uma quantidade máxima de MCP-1 de 3,0 ng/mg de moléculas totais de CTLA4-Ig, 5 ppm ou 5 ng/mg de dímero de CTLA4-Ig (a qual pode ser uma ausência de MCP-1); um método para medição dessa característica é apresentado no Exemplo 59;

não excedendo uma quantidade máxima de proteína de células hospedeiras (também conhecida como proteína celular) de 25 ng/mg de mo-

léculas de CTLA4-Ig ou 50 ng/mg de dímero de CTLA4-Ig (a qual pode ser uma ausência de proteína de células hospedeiras ou proteína celular); um método para medição dessa característica é apresentado no Exemplo 60;

5 não excedendo uma quantidade máxima de Triton X-100 de 1,0 ng/mg de moléculas de CTLA4-Ig (a qual pode ser uma ausência de Triton-X); um método para medição dessa característica é apresentado no Exemplo 61;

10 não excedendo uma quantidade máxima de Proteína A de 5,0 ng/mg de moléculas de CTLA4-Ig (a qual pode ser uma ausência de Proteína A); um método para medição dessa característica é apresentado no Exemplo 62;

15 as moléculas de CTLA4-Ig têm uma proporção molar média de GlcNAc para moléculas de CTLA4-Ig (ou para dímeros de CTLA4-Ig), expressa como moles/mol de proteína, de cerca de 15 a cerca de 35; um método para medição dessa característica é apresentado no Exemplo 63;

20 as moléculas de CTLA4-Ig têm uma proporção molar média de GalNAc para moléculas de CTLA4-Ig (ou para dímeros de CTLA4-Ig), expressa como moles/mol de proteína, de cerca de 1,7 a cerca de 3,6; um método para medição dessa característica é apresentado no Exemplo 63;

25 as moléculas de CTLA4-Ig têm uma proporção molar média de galactose para moléculas de CTLA4-Ig (ou para dímeros de CTLA4-Ig), expressa como moles/mol de proteína, de cerca de 8,0 a cerca de 17; um método para medição dessa característica é apresentado no Exemplo 64;

30 as moléculas de CTLA4-Ig têm uma proporção molar média de fucose para moléculas de CTLA4-Ig (ou para dímeros de CTLA4-Ig), expressa como moles/mol de proteína, de cerca de 3,5 a cerca de 8,3; um método para medição dessa característica é apresentado no Exemplo 64;

as moléculas de CTLA4-Ig têm uma proporção molar média de manose para moléculas de CTLA4-Ig (ou para dímeros de CTLA4-Ig), expressa como moles/mol de proteína, de cerca de 7,7 a cerca de 22; um método para medição dessa característica é apresentado no Exemplo 64;

as moléculas de CTLA4-Ig têm uma proporção molar média de ácido siálico para moléculas de CTLA4-Ig (ou para dímeros de CTLA4-Ig), expressa como moles/mol de proteína, de mais de ou igual a 8,0, tal como de cerca de 8,0 a cerca de 12,0; um método para medição dessa característica é apresentado no Exemplo 16;

as moléculas de CTLA4-Ig têm uma proporção molar média de NANA para moléculas de CTLA4-Ig (ou para dímeros de CTLA4-Ig), expressa como moles/mol de proteína, de mais de ou igual a 8,0, tal como de cerca de 8,0 a cerca de 12,0; um método para medição dessa característica é apresentado no Exemplo 16;

as moléculas de CTLA4-Ig têm glicosilação N-ligada, de modo que o Domínio I exibe uma área percentual de cerca de 24,5% a cerca de 35,2% ou o Domínio II exibe uma área percentual de cerca de 26,3% a cerca de 34,1% ou o Domínio III exibe uma área percentual de cerca de 21,9% a cerca de 31,5% ou o Domínio IV e Domínio V exibem uma área percentual de cerca de 7,9% a cerca de 18,6%; um método para medição dessa característica é apresentado no Exemplo 44;

as moléculas de CTLA4-Ig têm uma proporção molar média de NGNA para moléculas de CTLA4-Ig (ou para dímeros de CTLA4-Ig), expressa como moles/mol de proteína, de menos de ou igual a 1,5; um método para medição dessa característica é apresentado no Exemplo 16.

A invenção proporciona tais composições como isoladas ou substancialmente purificadas. A invenção proporciona tais composições como composições farmacêuticas ou composições farmacêuticamente aceitáveis. A invenção proporciona composições tendo qualquer permuta ou combinação dessas características.

A invenção proporciona tais composições como isoladas ou substancialmente purificadas. A invenção proporciona tais composições como composições farmacêuticas ou composições farmacêuticamente aceitáveis. A invenção proporciona composições tendo qualquer permuta ou combinação dessas características:

(2) as moléculas de CTLA4-Ig compreendem qualquer uma ou mais de SEQ ID NO: 4, 11, 12, 13, 14, 15, 16 ou 24 (por exemplo CTLA4^{A29YL104E}-Ig), as moléculas de CTLA4-Ig têm uma área de menos de ou igual a 5,0 por cento de espécies de elevado peso molecular de CTLA4-Ig (ou tetrâmeros de CTLA4-Ig) conforme determinado através de cromatografia por exclusão de tamanho e detecção espectrofotométrica (um método de medição para o qual é apresentado no Exemplo 25); . Mais particularmente, a invenção proporciona tais composições ainda tendo uma ou mais das seguintes características:

10 as moléculas de CTLA4-Ig têm uma área de mais de ou igual a 95,0 por cento de dímeros de CTLA4-Ig conforme determinado através de cromatografia por exclusão de tamanho e detecção espectrofotométrica; um método para medição dessa característica é apresentado no Exemplo 25;

15 as moléculas de CTLA4-Ig têm uma área de menos de ou igual a 1,0 por cento de espécies de baixo peso molecular de CTLA4-Ig (ou monômeros de CTLA4-Ig) conforme determinado através de cromatografia por exclusão de tamanho e detecção espectrofotométrica; um método para medição dessa característica é apresentado no Exemplo 25;

20 fornecimento (como moléculas de CTLA4-Ig ou como a referida composição) de cerca de 8-15 bandas com uma faixa de pI de cerca de 4,5 a cerca de 5,6 e intensidade de banda cumulativa de 95% - 105% em uma faixa de pI de 4,5 a 5,6; um método para medição dessa característica é apresentado no Exemplo 22;

25 não excedendo uma quantidade máxima de DNA de cerca de 2,5 pg/mg de moléculas de CTLA4-Ig; um método para medição dessa característica é apresentado no Exemplo 55;

não excedendo uma quantidade máxima de Proteína A de 5 ng/mg de moléculas de CTLA4-Ig; um método para medição dessa característica é apresentado no Exemplo 53;

30 não excedendo uma quantidade máxima de MCP-1 de 5 ng/mg de moléculas de CTLA4-Ig; um método para medição dessa característica é apresentado no Exemplo 54;

não excedendo uma quantidade máxima de proteína de células hospedeiras (também conhecida como proteína celular) de 50 ng/mg de moléculas de CTLA4-Ig; um método para medição dessa característica é apresentado no Exemplo 52;

5 não excedendo uma quantidade máxima de endotoxina bacteriana de 0,42 EU/mg de moléculas de CTLA4-Ig; um método para medição dessa característica é apresentado no Exemplo 48;

não excedendo uma biocarga máxima de 1 CFU/ml; um método para medição dessa característica é apresentado no Exemplo 49;

10 não excedendo uma quantidade máxima de Triton X-100 de 2 ppm; um método para medição dessa característica é apresentado no Exemplo 57;

as moléculas de CTLA4-Ig têm uma proporção molar média de ácido siálico para moléculas de CTLA4-Ig (ou para dímeros de CTLA4-Ig),
15 expressa como moles/mol de proteína, de mais de ou igual a 5,0, tal como de cerca de 5,0 a cerca de 9,0 ou de cerca de 5,0 a cerca de 10,0; um método para medição dessa característica é apresentado no Exemplo 39;

as moléculas de CTLA4-Ig têm uma proporção molar média de NANA para moléculas de CTLA4-Ig (ou para dímeros de CTLA4-Ig), expres-
20 sa como moles/mol de proteína, de mais de ou igual a 5,0, tal como de cerca de 5,0 a cerca de 9,0 ou de cerca de 5,0 a cerca de 10,0; um método para medição dessa característica é apresentado no Exemplo 39;

as moléculas de CTLA4-Ig têm uma proporção molar média de GalNAc para moléculas de CTLA4-Ig (ou para dímeros de CTLA4-Ig), ex-
25 pressa como moles/mol de proteína, de cerca de 0,8 a cerca de 4,0; um método para medição dessa característica é apresentado no Exemplo 36;

as moléculas de CTLA4-Ig têm uma proporção molar média de GlcNAc para moléculas de CTLA4-Ig (ou para dímeros de CTLA4-Ig), ex-
30 pressa como moles/mol de proteína, de cerca de 14 a cerca de 35; um método para medição dessa característica é apresentado no Exemplo 36;

as moléculas de CTLA4-Ig têm uma proporção molar média de galactose para moléculas de CTLA4-Ig (ou para dímeros de CTLA4-Ig), ex-

pressa como moles/mol de proteína, de cerca de 8,0 a cerca de 14; um método para medição dessa característica é apresentado no Exemplo 35;

5 as moléculas de CTLA4-Ig têm uma proporção molar média de fucose para moléculas de CTLA4-Ig (ou para dímeros de CTLA4-Ig), expressa como moles/mol de proteína, de cerca de 1,7 a cerca de 9,3; um método para medição dessa característica é apresentado no Exemplo 35;

10 as moléculas de CTLA4-Ig têm uma proporção molar média de manose para moléculas de CTLA4-Ig (ou para dímeros de CTLA4-Ig), expressa como moles/mol de proteína, de cerca de 9 a cerca de 18; um método para medição dessa característica é apresentado no Exemplo 35.

A invenção proporciona tais composições como sendo isoladas ou substancialmente purificadas. A invenção proporciona proteínas e composições tendo qualquer permuta ou combinação dessas características.

15 Os Exemplos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 16, 17, 18, 21, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 42, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67 acima se referem, em particular, à proteína de CTLA4-Ig de (1) acima embora, conforme descrito na presente especificação, os métodos referentes a e usos de tais proteínas nesses Exemplos são ilustrativos de métodos referentes a e usos de outras proteínas de CTLA4-Ig
20 da invenção.

Os Exemplos 19, 20, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 52, 53, 54, 55, 56, 57 acima se referem, em particular, à proteína de CTLA4-Ig de (2) acima embora, conforme descrito na presente especificação, os métodos referentes a e usos de tais proteínas nesses Exemplos são
25 ilustrativos de métodos referentes a e usos de outras proteínas de CTLA4-Ig da invenção.

LISTAGEM DE SEQÜÊNCIA

<110> Bristol-Myers Squibb Company
 <120> COMPOSICOES E METODOS PARA PRODUCAO DE UMA COMPOSICAO
 <130> 10734 TW
 <140> 95147641
 <141> 19/12/2006
 <150> 60/849.543
 <151> 05/10/2006
 <150> 60/752.267
 <151> 20/12/2005
 <150> 60/752.150
 <151> 20 /12/ 2005
 <160> 77
 <170> PatentIn versão 3.3
 <210> 1
 <211> 1223
 <212> DNA
 <213> seqüência Artificial
 <220>
 <223> CTLA4Ig

 <220>
 <221> CDS
 <222> (11)..(1159)
 <400> 1
 400> 1

agcttcacca atg ggt gta ctg ctc aca cag agg acg ctg ctc agt ctg 49
 Met Gly Val Leu Leu Thr Gln Arg Thr Leu Leu Ser Leu
 1 5 10

gtc ctt gca ctc ctg ttt cca agc atg gcg agc atg gca atg cac gtg 97
 Val Leu Ala Leu Leu Phe Pro Ser Met Ala Ser Met Ala Met His Val
 15 20 25

gcc cag cct gct gtg gta ctg gcc agc agc cga gcc atc gcc agc ttt 145
 Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile Ala Ser Phe
 30 35 40 45

gtg tgt gag tat gca tct cca ggc aaa gcc act gag gtc cgg gtg aca 193
 Val Cys Glu Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Ala Thr Glu Val Arg Val Thr
 50 55 60

gtg ctt cgg cag gct gac agc cag gtg act gaa gtc tgt gcg gca acc 241
 Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys Ala Ala Thr
 65 70 75

tac atg atg ggg aat gag ttg acc ttc cta gat gat tcc atc tgc acg 289
 Tyr Met Met Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Ser Ile Cys Thr
 80 85 90

ggc acc tcc agt gga aat caa gtg aac ctc act atc caa gga ctg agg 337
 Gly Thr Ser Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln Gly Leu Arg
 95 100 105

gcc atg gac acg gga ctc tac atc tgc aag gtg gag ctc atg tac cca 385
 Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu Met Tyr Pro
 110 115 120 125

ccg cca tac tac ctg ggc ata ggc aac gga acc cag att tat gta att 433
 Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile Tyr Val Ile
 130 135 140

gat cca gaa ccg tgc cca gat tct gat cag gag ccc aaa tct tct gac 481

<210> 2
 <211> 383
 <212> PRT
 <213> Sequência Artificial
 <220>
 <223> CTLA4Ig
 <400> 2

Met Gly Val Leu Leu Thr Gln Arg Thr Leu Leu Ser Leu Val Leu Ala
 1 5 10 15

Leu Leu Phe Pro Ser Met Ala Ser Met Ala Met His Val Ala Gln Pro
 20 25 30

Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile Ala Ser Phe Val Cys Glu
 35 40 45

Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Ala Thr Glu Val Arg Val Thr Val Leu Arg
 50 55 60

Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys Ala Ala Thr Tyr Met Met
 65 70 75 80

Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Ser Ile Cys Thr Gly Thr Ser
 85 90 95

Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln Gly Leu Arg Ala Met Asp
 100 105 110

Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu Met Tyr Pro Pro Pro Tyr
 115 120 125

Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile Tyr Val Ile Asp Pro Glu
 130 135 140

Pro Cys Pro Asp Ser Asp Gln Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His
 145 150 155 160

Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Ser Ser Val
 165 170 175

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
 180 185 190

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
 195 200 205

Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
 210 215 220

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
 225 230 235 240

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
245 250 255

Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
260 265 270

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
275 280 285

Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
290 295 300

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
305 310 315 320

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
325 330 335

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
340 345 350

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
355 360 365

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
370 375 380

. copiar seqüência

<210> 3

<400> 3

ESSA SEQUENCIA DEIXADA INTENCIONALMENTE EM BRANCO

<210> 4

<211> 384

<212> PRT

<213> seqüência Artificial

<220>

<223> CTLA4A29YL104E

<400> 4

Met Gly Val Leu Leu Thr Gln Arg Thr Leu Leu Ser Leu Val Leu Ala
1 5 10 15

Leu Leu Phe Pro Ser Met Ala Ser Met Ala Met His Val Ala Gln Pro
20 25 30

Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile Ala Ser Phe Val Cys Glu
35 40 45

Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Tyr Thr Glu Val Arg Val Thr Val Leu Arg
50 55 60

Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys Ala Ala Thr Tyr Met Met
65 70 75 80

Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Ser Ile Cys Thr Gly Thr Ser
85 90 95

Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln Gly Leu Arg Ala Met Asp
 100 105 110

Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu Met Tyr Pro Pro Pro Tyr
 115 120 125

Tyr Glu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile Tyr Val Ile Asp Pro Glu
 130 135 140

Pro Cys Cys Pro Asp Ser Asp Gln Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr
 145 150 155 160

His Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Ser Ser
 165 170 175

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
 180 185 190

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
 195 200 205

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
 210 215 220

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
 225 230 235 240

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
 245 250 255

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
 260 265 270

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
 275 280 285

Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
 290 295 300

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
 305 310 315 320

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
 325 330 335

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
 340 345 350

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala

355

360

365

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 370 375 380

. copiar seqüência

<210> 5

<211> 359

<212> PRT

<213> seqüência Artificial

<220>

<223> CTLA4Ig - Aminoácidos 25-383 de SEQ ID NO:2

<400> 5

Met Ala Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg
 1 5 10 15

Gly Ile Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Ala Thr
 20 25 30

Glu Val Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu
 35 40 45

Val Cys Ala Ala Thr Tyr Met Met Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp
 50 55 60

Asp Ser Ile Cys Thr Gly Thr Ser Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr
 65 70 75 80

Ile Gln Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val
 85 90 95

Glu Leu Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr
 100 105 110

Gln Ile Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp Gln Glu
 115 120 125

Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Pro
 130 135 140

Glu Leu Leu Gly Gly Ser Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 145 150 155 160

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 165 170 175

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 180 185 190

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
 195 200 205

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 210 215 220

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
 225 230 235 240

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 245 250 255

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys
 260 265 270

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 275 280 285

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 290 295 300

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 305 310 315 320

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
 325 330 335

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 340 345 350

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 355

. copiar seqüência

<210> 6

<211> 358

<212> PRT

<213> seqüência Artificial.

<220>

<223> CTLA4Ig - aminoácidos 26-383 de SEQ ID NO:2

<400> 6

Ala Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly
 1 5 10 15

Ile Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Ala Thr Glu
 20 25 30

Val Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val
 35 40 45

Cys Ala Ala Thr Tyr Met Met Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp
 50 55 60

Ser Ile Cys Thr Gly Thr Ser Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile
 65 70 75 80

Gln Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu
 85 90 95

Leu Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln
 100 105 110

Ile Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp Gln Glu Pro
 115 120 125

Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Pro Glu
 130 135 140

Leu Leu Gly Gly Ser Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
 145 150 155 160

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
 165 170 175

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
 180 185 190

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
 195 200 205

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
 210 215 220

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
 225 230 235 240

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
 245 250 255

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn
 260 265 270

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
 275 280 285

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
 290 295 300

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
 305 310 315 320

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
 325 330 335

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
225 230 235 240

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
245 250 255

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln
260 265 270

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
275 280 285

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
290 295 300

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
305 310 315 320

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
325 330 335

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
340 345 350

Leu Ser Pro Gly Lys
355

. copiar seqüência

<210> 8

<211> 358

<212> PRT

<213> seqüência Artificial

<220>

<223> CTLA4Ig - aminoácidos 25-382 de SEQ ID NO:2

<400> 8

Met Ala Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg
1 5 10 15

Gly Ile Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Ala Thr
20 25 30

Glu Val Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu
35 40 45

Val Cys Ala Ala Thr Tyr Met Met Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp
50 55 60

Asp Ser Ile Cys Thr Gly Thr Ser Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr
65 70 75 80

Ile Gln Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val
85 90 95

Glu Leu Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr
 100 105 110

Gln Ile Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp Gln Glu
 115 120 125

Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Pro
 130 135 140

Glu Leu Leu Gly Gly Ser Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 145 150 155 160

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 165 170 175

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 180 185 190

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
 195 200 205

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 210 215 220

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
 225 230 235 240

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 245 250 255

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys
 260 265 270

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 275 280 285

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 290 295 300

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 305 310 315 320

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
 325 330 335

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 340 345 350

Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 355

. copiar seqüência

<210> 9

<211> 357

<212> PRT

<213> seqüência Artificial

<220>

<223> CTLA4Ig - aminoácidos 26-382 de SEQ ID NO:2

<400> 9

Ala Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly
1 5 10 15

Ile Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Ala Thr Glu
20 25 30

Val Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val
35 40 45

Cys Ala Ala Thr Tyr Met Met Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp
50 55 60

Ser Ile Cys Thr Gly Thr Ser Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile
65 70 75 80

Gln Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu
85 90 95

Leu Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln
100 105 110

Ile Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp Gln Glu Pro
115 120 125

Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Pro Glu
130 135 140

Leu Leu Gly Gly Ser Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
145 150 155 160

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
165 170 175

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
180 185 190

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
195 200 205

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
210 215 220

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
225 230 235 240

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
245 250 255

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn
260 265 270

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
275 280 285

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
290 295 300

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
305 310 315 320

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
325 330 335

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
340 345 350

Ser Leu Ser Pro Gly
355

<210> 10

<211> 356

<212> PRT

<213> seqüência Artificial

<220>

<223> CTLA4Ig - aminoácidos 27-382 de SEQ ID NO:2

<400> 10

Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
1 5 10 15

Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Ala Thr Glu Val
20 25 30

Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
35 40 45

Ala Ala Thr Tyr Met Met Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Ser
50 55 60

Ile Cys Thr Gly Thr Ser Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
65 70 75 80

Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu
85 90 95

Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile
100 105 110

Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp Gln Glu Pro Lys
115 120 125

Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Pro Glu Leu
130 135 140

Leu Gly Gly Ser Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
145 150 155 160

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
165 170 175

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
180 185 190

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
195 200 205

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
210 215 220

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
225 230 235 240

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
245 250 255

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln
260 265 270

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
275 280 285

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
290 295 300

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
305 310 315 320

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
325 330 335

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
340 345 350

Leu Ser Pro Gly
355

<210> 11
<211> 359

<212> PRT
 <213> seqüência Artificial
 <220>
 <223> CTLA4A29YL104E - Aminoácidos 25-382 de SEQ ID NO:4
 <400> 11
 Met Ala Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg
 1 5 10 15

 Gly Ile Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Tyr Thr
 20 25 30

 Glu Val Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu
 35 40 45

 Val Cys Ala Ala Thr Tyr Met Met Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp
 50 55 60

 Asp Ser Ile Cys Thr Gly Thr Ser Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr
 65 70 75 80

 Ile Gln Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val
 85 90 95

 Glu Leu Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Glu Gly Ile Gly Asn Gly Thr
 100 105 110

 Gln Ile Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp Gln Glu
 115 120 125

 Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Pro
 130 135 140

 Glu Leu Leu Gly Gly Ser Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 145 150 155 160

 Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 165 170 175

 Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 180 185 190

 Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
 195 200 205

 Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 210 215 220

 Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
 225 230 235 240

 Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 245 250 255

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys
260 265 270

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
275 280 285

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
290 295 300

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
305 310 315 320

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
325 330 335

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
340 345 350

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
355

<210>

12

<211>

358

<212>

PRT

<213>

seqüência Artificial

<220>

<223>

CTLA4A29YL104E - aminoácidos 26-383 de SEQ ID NO:4

<400>

12

Ala Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly
1 5 10 15

Ile Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Tyr Thr Glu
20 25 30

Val Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val
35 40 45

Cys Ala Ala Thr Tyr Met Met Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp
50 55 60

Ser Ile Cys Thr Gly Thr Ser Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile
65 70 75 80

Gln Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu
85 90 95

Leu Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Glu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln
100 105 110

Ile Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp Gln Glu Pro
115 120 125

Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Pro Glu
130 135 140

Leu Leu Gly Gly Ser Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
145 150 155 160

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
165 170 175

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
180 185 190

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
195 200 205

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
210 215 220

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
225 230 235 240

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
245 250 255

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn
260 265 270

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
275 280 285

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
290 295 300

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
305 310 315 320

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
325 330 335

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
340 345 350

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
355

<210>

13

<211>

357

<212>

PRT

<213>

sequência Artificial

<220>

<223>

CTLA4A29YL104E - aminoácidos 27-383 de SEQ ID NO:4

<400>

13

Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
 1 5 10 15
 Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Tyr Thr Glu Val
 20 25 30
 Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
 35 40 45
 Ala Ala Thr Tyr Met Met Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Ser
 50 55 60
 Ile Cys Thr Gly Thr Ser Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
 65 70 75 80
 Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu
 85 90 95
 Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Glu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile
 100 105 110
 Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp Gln Glu Pro Lys
 115 120 125
 Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Pro Glu Leu
 130 135 140
 Leu Gly Gly Ser Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
 145 150 155 160
 Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
 165 170 175
 Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
 180 185 190
 Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
 195 200 205
 Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
 210 215 220
 Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
 225 230 235 240
 Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
 245 250 255
 Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln
 260 265 270

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
275 280 285

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
290 295 300

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
305 310 315 320

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
325 330 335

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
340 345 350

Leu Ser Pro Gly Lys
355

<210> 14
<211> 358
<212> PRT
<213> seqüência Artificial

<223> CTLA4A29YL104E - aminoácidos 25-382 de SEQ ID NO:4
<400> 14

Met Ala Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg
1 5 10 15

Gly Ile Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Tyr Thr
20 25 30

Glù Val Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu
35 40 45

Val Cys Ala Ala Thr Tyr Met Met Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp
50 55 60

Asp Ser Ile Cys Thr Gly Thr Ser Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr
65 70 75 80

Ile Gln Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val
85 90 95

Glu Leu Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Glu Gly Ile Gly Asn Gly Thr
100 105 110

Gln Ile Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp Gln Glu
115 120 125

Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Pro
130 135 140

Glu Leu Leu Gly Gly Ser Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys

Val Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val
 35 40 45

Cys Ala Ala Thr Tyr Met Met Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp
 50 55 60

Ser Ile Cys Thr Gly Thr Ser Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile
 65 70 75 80

Gln Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu
 85 90 95

Leu Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Glu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln
 100 105 110

Ile Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp Gln Glu Pro
 115 120 125

Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Pro Glu
 130 135 140

Leu Leu Gly Gly Ser Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
 145 150 155 160

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
 165 170 175

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
 180 185 190

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
 195 200 205

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
 210 215 220

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
 225 230 235 240

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
 245 250 255

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn
 260 265 270

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
 275 280 285

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr

290 295 300
 Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
 305 310 315 320
 Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
 325 330 335
 Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
 340 345 350
 Ser Leu Ser Pro Gly
 355
 <210> 16
 <211> 356
 <212> PRT
 <213> seqüência Artificial
 <220>
 <223> CTLA4A29YL104E - aminoácidos 27-382 de SEQ ID NO:4
 <400> 16
 Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
 1 5 10 15
 Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Tyr Thr Glu Val
 20 25 30
 Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
 35 40 45
 Ala Ala Thr Tyr Met Met Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Ser
 50 55 60
 Ile Cys Thr Gly Thr Ser Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
 65 70 75 80
 Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu
 85 90 95
 Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Glu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile
 100 105 110
 Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp Gln Glu Pro Lys
 115 120 125
 Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Pro Glu Leu
 130 135 140
 Leu Gly Gly Ser Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
 145 150 155 160
 Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
 165 170 175

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
180 185 190

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
195 200 205

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
210 215 220

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
225 230 235 240

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
245 250 255

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln
260 265 270

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
275 280 285

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
290 295 300

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
305 310 315 320

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
325 330 335

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
340 345 350

Leu Ser Pro Gly
355

<210> 17
<211> 6928
<212> DNA
<213> sequência Artificial
<220>
<223> Plasmídeo sintético

<220>
<221> CDS
<222> (949)..(2097)
<400> 17
<400> 17

gatctcccga tcccctatgg tcgactctca gtacaatctg ctctgatgcc gcatagttaa 60
gccagtatct gctccctgct tgtgtgttgg aggtcgctga gtagtgcgcg agcaaaattt 120
aagctacaac aaggcaaggc ttgaccgaca attgcatgaa gaatctgctt agggtttagc 180

gttttgcgct gcttcgcat gtacggcca gatatacgcg ttgacattga ttattgacta	240
gttattaata gtaatcaatt acggggtcat tagttcatag cccatatatg gagttccgcg	300
ttacataact tacggtaaat ggcccgcctg gctgaccgcc caacgacccc cgcccattga	360
cgtaataat gacgtatggt cccatagtaa cgccaatagg gactttccat tgacgtcaat	420
gggtggacta tttacggtaa actgcccact tggcagtaca tcaagtgtat catatgccaa	480
gtacgcccc tattgacgtc aatgacggta aatggcccgc ctggcattat gcccagtaca	540
tgaccttatg ggactttcct acttggcagt acatctacgt attagtcacg gctattacca	600
tggtgatgcg gttttggcag tacatcaatg ggcgtggata gcggttgac tcacggggat	660
ttccaagtct ccaccccatt gacgtcaatg ggagtttgtt ttggcaccaa aatcaacggg	720
actttccaaa atgtcgtaac aactcggccc cattgacgca aatgggcggt aggcgtgtac	780
ggtgggaggt ctatataagc agagctctct ggctaactag agaaccact gcttactggc	840
ttatcgaaat taatacgact cactataggg agaccaagc ttggtaccga gctcggatcc	900
actagtaacg gccgccagtg tgctggaatt ctgcagatag cttacca atg ggt gta	957
	Met Gly Val
	1
ctg ctc aca cag agg acg ctg ctc agt ctg gtc ctt gca ctc ctg ttt	1005
Leu Leu Thr Gln Arg Thr Leu Leu Ser Leu Val Leu Ala Leu Leu Phe	
5 10 15	
cca agc atg gcg agc atg gca atg cac gtg gcc cag cct gct gtg gta	1053
Pro Ser Met Ala Ser Met Ala Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val	
20 25 30 35	
ctg gcc agc agc cga ggc atc gcc agc ttt gtg tgt gag tat gca tct	1101
Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Ser	
40 45 50	
cca ggc aaa gcc act gag gtc cgg gtg aca gtg ctt cgg cag gct gac	1149
Pro Gly Lys Ala Thr Glu Val Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp	
55 60 65	
agc cag gtg act gaa gtc tgt gcg gca acc tac atg atg ggg aat gag	1197
Ser Gln Val Thr Glu Val Cys Ala Ala Thr Tyr Met Met Gly Asn Glu	
70 75 80	
ttg acc ttc cta gat gat tcc atc tgc acg ggc acc tcc agt gga aat	1245
Leu Thr Phe Leu Asp Asp Ser Ile Cys Thr Gly Thr Ser Ser Gly Asn	
85 90 95	
caa gtg aac ctc act atc caa gga ctg agg gcc atg gac acg gga ctc	1293
Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu	
100 105 110 115	
tac atc tgc aag gtg gag ctc atg tac cca ccg cca tac tac ctg ggc	1341
Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly	
120 125 130	
ata ggc aac gga acc cag att tat gta att gat cca gaa ccg tgc cca	1389
Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro	
135 140 145	
gat tct gat cag gag ccc aaa tct tct gac aaa act cac aca tcc cca	1437
Asp Ser Asp Gln Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Ser Pro	
150 155 160	

ccg tcc cca gca cct gaa ctc ctg ggg gga tgc tca gtc ttc ctc ttc	1485
Pro Ser Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Ser Ser Val Phe Leu Phe	
165 170 175	
ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc atg atc tcc cgg acc cct gag gtc	1533
Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val	
180 185 190 195	
aca tgc gtg gtg gtg gac gtg agc cac gaa gac cct gag gtc aag ttc	1581
Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe	
200 205 210	
aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca aag ccg	1629
Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro	
215 220 225	
cgg gag gag cag tac aac agc acg tac cgt gtg gtc agc gtc ctc acc	1677
Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr	
230 235 240	
gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat ggc aag gag tac aag tgc aag gtc	1725
Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val	
245 250 255	
tcc aac aaa gcc ctc cca gcc ccc atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc	1773
Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala	
260 265 270 275	
aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgg	1821
Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg	
280 285 290	
gat gag ctg acc aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc	1869
Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly	
295 300 305	
ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg cag ccg	1917
Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro	
310 315 320	
gag aac aac tac aag acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc	1965
Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser	
325 330 335	
ttc ttc ctc tac agc aag ctc acc gtg gac aag agc agg tgg cag cag	2013
Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln	
340 345 350 355	
ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac cac	2061
Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His	
360 365 370	
tac acg cag aag agc ctc tcc ctg tct ccg ggt aaa tgagtgcgac	2107
Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys	
375 380	
ggccggcaag cccccgctcc ccgggctctc gcggctgcac gaggatgctt ctagagggcc	2167
ctattctata gtgtcaccta aatgctagag ctgctgatc agcctcgact gtgccttcta	2227
gttgccagcc atctgttgtt tgccccctcc ccgtgccttc cttgaccctg gaaggtgcca	2287
ctcccactgt cctttcctaa taaaatgagg aaattgcac gcattgtctg agtaggtgtc	2347
attctattct ggggggtggg gtggggcagg acagcaaggg ggaggattgg gaagacaata	2407

gcaggcatgc tgggatgcg gtgggctcta tggcttctga ggcggaaaga accagctggg 2467
gctctagggg gtatccccac gcgccctgta gcggcgcatt aagcgcggcg ggtgtggtgg 2527
ttacgcgcag cgtgaccgct acaacttgcca gcgccctagc gcccgctcct ttcgctttct 2587
tcccttcctt tctcgccacg ttcgcccctgt ggaatgtgtg tcagttaggg tgtggaaagt 2647
ccccaggctc cccagcaggc agaagtatgc aaagcatgca tctcaattag tcagcaacca 2707
ggtgtggaaa gtccccaggc tccccagcag gcagaagtat gcaaagcatg catctcaatt 2767
agtcagcaac catagtcccg cccctaactc cgcccatccc gccctaact ccgcccagtt 2827
ccgcccattc tccgcccatt ggctgactaa ttttttttat ttatgcagag gccgaggccg 2887
cctcggcctc tgagctattc cagaagtagt gaggaggctt ttttgaggc ctaggctttt 2947
gcaaaaagct tggacagctg agggctgcga ttcgcgcga aacttgacgg caatcctagc 3007
gtgaaggctg gtaggatttt atccccgctg ccatcatggt tcgaccattg aactgcatcg 3067
tcgccgtgtc ccaagatatg gggattggca agaacggaga cctaccctgg cctccgctca 3127
ggaacgagtt caagtacttc caaagaatga ccacaacctc ttcagtggaa ggtaaacaga 3187
atctggtgat tatgggtagg aaaacctggt tctccattcc tgagaagaat cgacctttaa 3247
aggacagaat taatatagtt ctcagtagag aactcaaaga accaccacga ggagctcatt 3307
ttcttgccaa aagtttggat gatgccttaa gacttattga acaaccggaa ttggcaagta 3367
aagtagacat ggtttggata gtcggaggca gttctgttta ccaggaagcc atgaatcaac 3427
caggccacct cagactcttt gtgacaagga tcatgcagga atttgaaagt gacacgtttt 3487
tcccagaaat tgatttgggg aatataaac ttctcccaga ataccaggc gtcctctctg 3547
aggccagga ggaaaaaggc atcaagtata agtttgaagt ctacgagaag aaagactaac 3607
aggaagatgc tttcaagttc tctgctcccc tctaaagct atgcattttt ataagaccat 3667
gggacttttg ctggctttag atctttgtga aggaacctta cttctgtggt gtgacataat 3727
tgacaaaact acctacagag atttaaagct ctaaggtaaa tataaaattt ttaagtgtat 3787
aatgtgttaa actactgatt ctaattgttt gtgtatttta gattccaacc tatggaactg 3847
atgaatggga gcagtggtgg aatgccttta atgaggaaaa cctgttttgc tcagaagaaa 3907
tgccatctag tgatgatgag gctactgctg actctcaaca ttctactcct ccaaaaaaga 3967
agagaaaggt agaagacccc aaggactttc cttcagaatt gctaagtttt ttgagtcatg 4027
ctgtgtttag taatagaact cttgcttgct ttgctattta caccacaaag gaaaaagctg 4087
cactgctata caagaaaatt atggaaaat attctgtaac ctttataagt aggcataaca 4147
gttataatca taacatactg ttttttctta ctccacacag gcatagagtg tctgctatta 4207
ataactatgc tcaaaaattg tgtaccttta gctttttaat ttgtaaaggg gttaataagg 4267
aatatttgat gtatagtgcc ttgactagag atcataatca gccataccac atttgtagag 4327
gttttacttg ctttaaaaaa cctcccacac ctcccctga acctgaaaca taaaatgaat 4387
gcaattggtg ttgttaactt gtttattgca gttataatg gttacaaata aagcaatagc 4447

atcacaatt tcacaaataa agcatttttt tcaactgcatt ctagtgtgg tttgtccaaa 4507
ctcatcaatg tatcttatca tgtctggatc ggctggatga tctccagcg cggggatctc 4567
atgctggagt tcttcgcca cccaacttg tttattgag cttataatgg ttacaaataa 4627
agcaatagca tcacaaattt cacaaataa gcattttttt cactgcattc tagttgtggt 4687
ttgtccaaac tcatcaatgt atcttatcat gtctgtatac cgtcgacctc tagctagagc 4747
ttggcgtaat catggtcata gctgtttcct gtgtgaaatt gttatccgct cacaattcca 4807
cacaacatac gagccggaag cataaagtgt aaagcctggg gtgcctaag agtgagctaa 4867
ctcacattaa ttgcgttgcg ctcaactgcc gctttccagt cgggaaacct gtcgtgccag 4927
ctgcattaat gaatcggcca acgcgcgggg agaggcggtt tgcgtattgg gcgctcttc 4987
gcttccctgc tcaactgactc gctgcgctcg gtcgttcggc tgcggcgagc ggtatcagct 5047
cactcaaagg cgtaatacag gttatccaca gaatcagggg ataacgcagg aaagaacatg 5107
tgagcaaaag gccagcaaaa ggcaggaac cgtaaaaagg ccgcttgct ggcgtttttc 5167
cataggctcc gccccctga cgagcatcac aaaaatcgac gctcaagtca gagtgggcga 5227
aaccgcagag gactataaag ataccaggcg tttccccctg gaagctccct cgtgcgctct 5287
cctgttccga ccctgcccgt taccggatac ctgtccgctt ttctcccttc gggaaagcgtg 5347
gcgctttctc aatgctcacg ctgtaggat ctcaagtcgg ttaggtcgt tcgctccaag 5407
ctgggctgtg tgcacgaacc cccgctcag cccgaccgt gcgcttacc cggttaactat 5467
cgtcttgagt ccaaccggg aagacacgac ttatcgccac tggcagcagc cactggtaac 5527
aggattagca gagcgaggta ttagggcgt gctacagagt tcttgaagtg gtggcctaac 5587
tacggctaca ctagaaggac agtatttggg atctgcgctc tgcgaagcc agttacctc 5647
ggaaaaagag ttggtagctc ttgatccggc aaacaaacca ccgctggtag cgggtggttt 5707
tttgtttgca agcagcagat tacgcgcaga aaaaaaggat ctcaagaaga tctttgatc 5767
ttttctacgg ggtctgacgc tcagtggaac gaaaactcac gtaaggat tttggtcatg 5827
agattatcaa aaaggatctt cacctagatc cttttaaatt aaaaatgaag ttttaaatca 5887
atctaaagta tatatgagta aacttggctt gacagttacc aatgcttaat cagtgaggca 5947
cctatctcag cgatctgtct atttcttca tccatagttg cctgactccc cgctggtgag 6007
ataactacga tacgggaggg cttaccatct gggcccagtg ctgcaatgat accgcgagac 6067
ccacgctcac cggctccaga tttatcagca ataaccagc cagccggaag ggccgagcgc 6127
agaagtggtc ctgcaacttt atccgctcc atccagtcta ttaattgttg ccgggaagct 6187
agagtaagta gttcgccagt taatagtttg cgcaacggtt ttgccattgc tacaggcatc 6247
gtggtgtcac gctcgctgtt tggatggct tcaatcagct ccggttccca acgtcaaggc 6307
gagttacatg atccccatg ttgtgcaaaa aagcgggttag ctcttcggt ccccgatcgt 6367
tgtcagaagt aagttggccg cagtgttacc actcatggtt atggcagcac tcataattct 6427

cttactgtca tgccatccgt aagatgcttt tctgtgactg gtgagtactc aaccaagtca 6487
 ttctgagaat agtgtatgcg gcgaccgagt tgctcttgcc cggcgtaaat acgggataat 6547
 accgcgccac atagcagaac tttaaaagtg ctcatcattg gaaaacgttc ttcggggcga 6607
 aaactctcaa ggatcttacc gctgttgaga tccagttcga tgtaaccac tctgtcacc 6667
 aactgatctt cagcatcttt tactttcacc agcgtttctg ggtgagcaaa aacaggaagg 6727
 caaaatgccg caaaaaaggg aataagggcg acacggaaat gttgaatact catactcttc 6787
 ctttttcaat attattgaag catttatcag ggttattgtc tcatgagcgg atacatattt 6847
 gaatgtattt agaaaaataa acaaataggg gttccgcgca catttccccg aaaagtgcca 6907
 cctgacgtcg acggatcggg a 6928

<210> 18
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> seqüência Artificial
 <220>
 <223> seqüência do domínio extracelular de CTLA4
 <400> 18
 Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
 1 5 10 15

Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Ala Thr Glu Val
 20 25 30

Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
 35 40 45

Ala Ala Thr Tyr Met Met Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Ser
 50 55 60

Ile Cys Thr Gly Thr Ser Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
 65 70 75 80

Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu
 85 90 95

Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile
 100 105 110

Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp
 115 120

<210> 19
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> seqüência Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleotídeo sintético
 <400> 19
 agaaaagggg ctggagagat ggctcagtg ttaagagca 39

<210> 20
 <211> 9

<212> DNA
 <213> seqüência Artificial
 <220>
 <223> oligonucleotídeo sintético
 <400> 20
 gtactcagg 9

<210> 21
 <211> 10
 <212> DNA
 <213> seqüência Artificial
 <220>
 <223> oligonucleotídeo sintético
 <400> 21
 agtcagagac 10

<210> 22
 <211> 48
 <212> DNA
 <213> seqüência Artificial
 <220>
 <223> oligonucleotídeo sintético
 <400> 22
 cggcagatct ctgtgagttt gaggccagcc tggctctacaa agcaagtt 48

<210> 23
 <211> 1152
 <212> DNA
 <213> seqüência Artificial
 <220>
 <223> CTLA4Ig
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1149)
 <400> 23
 atg ggt gta ctg ctc aca cag agg acg ctg ctc agt ctg gtc ctt gca 48
 Met Gly Val Leu Leu Thr Gln Arg Thr Leu Leu Ser Leu Val Leu Ala
 1 5 10 15

ctc ctg ttt cca agc atg gcg agc atg gca atg cac gtg gcc cag cct 96
 Leu Leu Phe Pro Ser Met Ala Ser Met Ala Met His Val Ala Gln Pro
 20 25 30

gct gtg gta ctg gcc agc agc cga ggc atc gct agc ttt gtg tgt gag 144
 Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile Ala Ser Phe Val Cys Glu
 35 40 45

tat gca tct cca ggc aaa tat act gag gtc cgg gtg aca gtg ctt cgg 192
 Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Tyr Thr Glu Val Arg Val Thr Val Leu Arg
 50 55 60

cag gct gac agc cag gtg act gaa gtc tgt gcg gca acc tac atg atg 240
 Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys Ala Ala Thr Tyr Met Met
 65 70 75 80

ggg aat gag ttg acc ttc cta gat gat tcc atc tgc acg ggc acc tcc 288
 Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Ser Ile Cys Thr Gly Thr Ser
 85 90 95

agt gga aat caa gtg aac ctc act atc caa gga ctg agg gcc atg gac 336
 Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln Gly Leu Arg Ala Met Asp
 100 105 110

acg gga ctc tac atc tgc aag gtg gag ctc atg tac cca ccg cca tac 384
 Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu Met Tyr Pro Pro Pro Tyr
 115 120 125

tac gag ggc ata ggc aac gga acc cag att tat gta att gat cca gaa 432
 Tyr Glu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile Tyr Val Ile Asp Pro Glu
 130 135 140

ccg tgc cca gat tct gat cag gag ccc aaa tct tct gac aaa act cac 480
 Pro Cys Pro Asp Ser Asp Gln Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His
 145 150 155 160

aca tcc cca ccg tcc cca gca cct gaa ctc ctg ggg gga tcg tca gtc 528
 Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Ser Ser Val
 165 170 175

ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc atg atc tcc cgg acc 576
 Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
 180 185 190

cct gag gtc aca tgc gtg gtg gtg gac gtg agc cac gaa gac cct gag 624
 Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
 195 200 205

gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag 672
 Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
 210 215 220

aca aag ccg cgg gag gag cag tac aac agc acg tac cgt gtg gtc agc 720
 Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
 225 230 235 240

gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat ggc aag gag tac aag 768
 Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
 245 250 255

tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc cca gcc ccc atc gag aaa acc atc 816
 Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
 260 265 270

tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc 864
 Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
 275 280 285

cca tcc ccg gat gag ctg acc aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg 912
 Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
 290 295 300

gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat 960
 Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
 305 310 315 320

ggg cag ccg gag aac aac tac aag acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc 1008
 Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
 325 330 335

gac ggc tcc ttc ttc ctc tac agc aag ctc acc gtg gac aag agc agg 1056
 Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
 340 345 350

tgg cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg 1104
 Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
 355 360 365

cac aac cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg tct ccg ggt aaa tga 1152
 His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 370 375 380

<210> 24
 <211> 124

<212> PRT
 <213> seqüência Artificial
 <220>
 <223> Domínio extracelular de CTLA4 com A29Y e L104E
 <400> 24
 Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
 1 5 10 15

 Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Tyr Thr Glu Val
 20 25 30

 Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
 35 40 45

 Ala Ala Thr Tyr Met Met Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Ser
 50 55 60

 Ile Cys Thr Gly Thr Ser Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
 65 70 75 80

 Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu
 85 90 95

 Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Glu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile
 100 105 110

 Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp
 115 120

 <210> 25
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> seqüência Artificial
 <220>
 <223> peptídeo tríptico
 <400> 25
 Ala Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg
 1 5 10 15

 <210> 26
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> seqüência Artificial
 <220>
 <223> peptídeo tríptico
 <400> 26

 Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg
 1 5 10

 <210> 27
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> seqüência Artificial
 <220>
 <223> peptídeo tríptico
 <400> 27
 Gly Ile Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Ser Pro Gly Lys
 1 5 10

<210> 28
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> seqüência Artificial
 <220>
 <223> peptídeo tríptico
 <400> 28
 Ala Thr Glu Val Arg
 1 5

<210> 29
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> seqüência Artificial
 <220>
 <223> peptídeo tríptico
 <400> 29

Val Thr Val Leu Arg
 1 5

<210> 30
 <211> 45
 <212> PRT
 <213> seqüência Artificial
 <220>
 <223> peptídeo tríptico
 <400> 30

Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys Ala Ala Thr Tyr Met Met
 1 5 10 15

Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Ser Ile Cys Thr Gly Thr Ser
 20 25 30

Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln Gly Leu Arg
 35 40 45

<210> 31
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> seqüência Artificial
 <220>
 <223> peptídeo tríptico
 <400> 31

Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys
 1 5 10

<210> 32
 <211> 35
 <212> PRT
 <213> seqüência Artificial
 <220>
 <223> peptídeo tríptico
 <400> 32

Val Glu Leu Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly
 1 5 10 15

Thr Gln Ile Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp Gln
 20 25 30

Glu Pro Lys
 35

<210> 33
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> seqüência Artificial
 <220>
 <223> peptídeo tríptico
 <400> 33
 Ser Ser Asp Lys
 1

<210> 34
 <211> 26
 <212> PRT
 <213> seqüência Artificial
 <220>
 <223> peptídeo sintético
 <400> 34
 Thr His Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Ser
 1 5 10 15

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 20 25

<210> 35
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> seqüência Artificial
 <220>
 <223> peptídeo tríptico
 <400> 35
 Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
 1 5

<210> 36
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> seqüência Artificial
 <220>
 <223> peptídeo tríptico
 <400> 36
 Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
 1 5 10 15

Glu Val Lys

<210> 37
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> seqüência Artificial
 <220>
 <223> peptídeo sintético
 <400> 37
 Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
 1 5 10

<210> 38
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> seqüência Artificial
 <220>
 <223> peptídeo tríptico
 <400> 38
 Thr Lys Pro Arg
 1

<210> 39
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> seqüência Artificial
 <220>
 <223> peptídeo tríptico
 <400> 39
 Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
 1 5

<210> 40
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> seqüência Artificial
 <220>
 <223> peptídeo tríptico
 <400> 40
 Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 1 5 10 15

<210> 41
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> seqüência Artificial
 <220>
 <223> peptídeo tríptico
 <400> 41
 Val Ser Asn Lys
 1

<210> 42
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> seqüência Artificial
 <220>
 <223> peptídeo tríptico
 <400> 42
 Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
 1 5

<210> 43
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> seqüência Artificial
 <220>
 <223> peptídeo tríptico
 <400> 43
 Thr Ile Ser Lys
 1

<210> 44
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> seqüência Artificial
 <220>
 <223> peptídeo tríptico
 <400> 44
 Gly Gln Pro Arg
 1

<210> 45
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> seqüência Artificial
 <220>
 <223> peptídeo tríptico
 <400> 45

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
1 5 10

<210> 46
<211> 5
<212> PRT
<213> seqüência Artificial
<220>
<223> peptídeo tríptico
<400> 46
Asp Glu Leu Thr Lys
1 5

<210> 47
<211> 10
<212> PRT
<213> seqüência Artificial
<220>
<223> peptídeo tríptico
<400> 47
Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
1 5 10

<210> 48
<211> 22
<212> PRT
<213> seqüência Artificial
<220>
<223> peptídeo tríptico
<400> 48
Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
1 5 10 15

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
20

<210> 49
<211> 17
<212> PRT
<213> seqüência Artificial
<220>
<223> peptídeo tríptico
<400> 49
Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
1 5 10 15

Lys

<210> 50
<211> 5
<212> PRT
<213> seqüência Artificial
<220>
<223> peptídeo tríptico
<400> 50
Leu Thr Val Asp Lys
1 5

<210> 51
<211> 23
<212> PRT
<213> seqüência Artificial
<220>
<223> peptídeo tríptico

<400> 51
 Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
 1 5 10 15

His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 20

<210> 52
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> seqüência Artificial
 <220>
 <223> peptídeo tríptico
 <400> 52

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5

<210> 53
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> seqüência Artificial
 <220>
 <223> peptídeo tríptico
 <400> 53

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 1 5

<210> 54
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> seqüência Artificial
 <220>
 <223> peptídeo tríptico

<400> 54
 Gly Ile Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr
 1 5

<210> 55
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> seqüência Artificial
 <220>
 <223> peptídeo tríptico
 <400> 55
 Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 1 5 10

<210> 56
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> seqüência Artificial
 <220>
 <223> peptídeo tríptico
 <400> 56
 Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
 1 5 10 15

<210> 57
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> seqüência Artificial
 <220>
 <223> peptídeo tríptico
 <400> 57
 Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
 1 5

<210> 58
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> seqüência Artificial
 <220>
 <223> peptídeo tríptico
 <400> 58
 Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
 1 5

<210> 59
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> seqüência Artificial
 <220>
 <223> peptídeo tríptico
 <400> 59
 Tyr Thr Glu Val Arg
 1 5

<210> 60
 <211> 35
 <212> PRT
 <213> seqüência Artificial
 <220>
 <223> peptídeo tríptico
 <400> 60
 Val Glu Leu Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Glu Gly Ile Gly Asn Gly
 1 5 10 15

Thr Gln Ile Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp Gln
 20 25 30

Glu Pro Lys
35

<210> 61
<211> 17
<212> PRT
<213> seqüência Artificial
<220>
<223> peptídeo tríptico
<400> 61
Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys Ala Ala Thr Tyr Met Met
1 5 10 15

Gly

<210> 62
<211> 28
<212> PRT
<213> seqüência Artificial
<220>
<223> peptídeo tríptico
<400> 62
Asn Arg Leu Gly Gln Ile Thr Leu Asn Val Gln Asn Gly Ser Ser Thr
1 5 10 15

Gly Thr Cys Ile Ser Asp Asp Leu Phe Thr Leu Glu
20 25

<210> 63
<211> 4
<212> PRT
<213> seqüência Artificial
<220>
<223> peptídeo tríptico
<400> 63
Val Cys Glu Tyr
1

<210> 64
<211> 4
<212> PRT
<213> seqüência Artificial
<220>
<223> peptídeo tríptico
<400> 64
Cys Leu Val Lys
1

<210> 65
<211> 5
<212> PRT
<213> seqüência Artificial
<220>
<223> peptídeo tríptico
<400> 65
Ser Cys Ser Val Met
1 5

<210> 66
<211> 15
<212> PRT
<213> seqüência Artificial
<220>
<223> peptídeo tríptico

<400> 66
 Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp Gln Glu Pro Lys
 1 5 10 15

<210> 67
 <211> 26
 <212> PRT
 <213> seqüência Artificial
 <220>
 <223> peptídeo tríptico
 <400> 67

Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys Ala Ala Thr Tyr Met Met
 1 5 10 15

Gly Asn Arg Leu Gly Gln Ile Thr Leu Val
 20 25

<210> 68
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> seqüência Artificial
 <220>
 <223> peptídeo tríptico
 <400> 68

Gln Asn Gly Ser Ser Thr Gly Thr Cys Ile Ser Asp Asp Leu Phe Thr
 1 5 10 15

Leu Glu

<210> 69
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> seqüência Artificial
 <220>
 <223> peptídeo tríptico
 <400> 69

Thr Cys Ile Ser Asp Asp Leu Phe
 1 5

<210> 70
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> seqüência Artificial
 <220>
 <223> Peptídeo Asp-N
 <400> 70

Glu Val Cys Ala Ala Thr Tyr Met Met Gly Asn
 1 5 10

<210> 71
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> seqüência Artificial
 <220>
 <223> peptídeo tríptico
 <400> 71

Met Tyr Pro Pro Pro Tyr
 1 5

<210> 72
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Seqüência Artificial
 <220>

<223> Peptídeo triptico
 <400> 72
 Trp Gln Gln Gly Asp Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
 1 5 10 15

His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 20

<210> 73
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Sequência Artificial
 <220>
 <223> Peptídeo Sintético

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (14)..(14)
 <223> iso-Asp
 <400> 73
 Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asp Gly Gln
 1 5 10 15

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 20

<210> 74
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> sequência Artificial
 <220>
 <223> Peptídeo Sintético

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (7)..(7)
 <223> Cam
 <400> 74
 Val Ile Asp Pro Glu Pro Xaa Pro Asp Ser Asp Gln Glu Pro Lys
 1 5 10 15

<210> 75
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> sequência Artificial
 <220>
 <223> Tag sintética 6x His
 <400> 75
 His His His His His His
 1 5

<210> 76
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> sequência Artificial
 <220>
 <223> Peptídeo Asp-N
 <400> 76

Asp Gln Glu Pro Lys Ser Ser
 1 5

<210> 77
 <211> 13
 <212> PRT

<213> seqüência Artificial

<220>

<223> peptídeo tríptico

<400> 77

Thr His Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Pro Glu Leu Leu
1 5 10

REIVINDICAÇÕES

1. Método para obtenção de uma composição compreendendo uma população isolada de moléculas de CTLA4-Ig de um meio de cultura líquido, o meio compreendendo uma população inicial de moléculas de CTLA4-Ig, em que (1) moléculas de CTLA4-Ig da população inicial têm um ou mais resíduos de ácido siálico, (2) o número de resíduos de ácido siálico por molécula de CTLA4-Ig varia dentro da população inicial e (3) a população inicial compreende dímero de CTLA4-Ig e agregado de elevado peso molecular, o método compreendendo:

- 10 (a) coleta, do meio de cultura líquido, de uma cultura de células de mamífero expressando moléculas de CTLA4-Ig;
- (b) separação das moléculas de CTLA4-Ig de componentes celulares;
- (c) separação de dímeros de CTLA4-Ig de agregados de CTLA4-Ig de elevado peso molecular; e
- 15 (d) separação das moléculas de CTLA4-Ig em duas ou mais frações, em que pelo menos uma fração tem uma maior proporção molar de ácido siálico para moléculas de CTLA4-Ig comparado com pelo menos uma outra fração,
- 20 em que as etapas (b), (c) e (d) são realizadas simultaneamente ou em qualquer ordem, de modo a obter a referida composição.

2. Método de acordo com a reivindicação 1, em que a etapa de coleta (a) compreende obtenção de uma fração solúvel da cultura líquida.

3. Método de acordo com a reivindicação 1, em que as etapas (c) e (d) compreendem o uso de cromatografia em coluna de modo a obter frações de moléculas de CTLA4-Ig tendo diferentes teores de ácido siálico.

4. Método de acordo com a reivindicação 1, ainda compreendendo uso de cromatografia em coluna para reduzir o teor de MCP-1 na composição.

30 5. Método de acordo com a reivindicação 1, em que as moléculas de CTLA4-Ig compreendem um ou mais polipeptídeos tendo SEQ ID NO:2, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10.

6. Método de acordo com a reivindicação 1, em que as moléculas de CTLA4-Ig compreendem um ou mais polipeptídeos tendo SEQ ID NO:4, 11, 12, 13, 14, 15 ou 16.

7. Método de acordo com a reivindicação 1, em que a fração em (d) tendo a maior proporção molar de ácido siálico para moléculas de CTLA4-Ig exibe uma proporção molar média de ácido siálico para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 8 a cerca de 14.

8. Método de acordo com a reivindicação 7, em que a proporção molar média é de cerca de 8 a cerca de 11, de cerca de 8 a cerca de 10 ou de cerca de 8 a cerca de 9.

9. Método para isolamento de uma composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig, o método compreendendo:

(i) obtenção de uma fração solúvel de uma cultura líquida compreendendo células de mamífero que produzem moléculas de CTLA4-Ig e, em qualquer ordem,

(ii) sujeição da fração solúvel à cromatografia de troca de ânions de modo a obter uma composição enriquecida e eluída compreendendo moléculas de CTLA4-Ig;

(iii) sujeição da fração solúvel à cromatografia por interação hidrofóbica de modo a obter uma composição enriquecida e eluída compreendendo moléculas de CTLA4-Ig;

(iv) sujeição da fração solúvel à cromatografia por afinidade de modo a obter uma composição enriquecida e eluída compreendendo moléculas de CTLA4-Ig; e

(v) sujeição da fração solúvel à cromatografia de troca de ânions de modo a obter uma composição enriquecida e eluída compreendendo moléculas de CTLA4-Ig.

10. Método para isolamento de uma composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig, o método compreendendo:

(i) obtenção de uma fração solúvel de uma cultura líquida compreendendo células de mamífero que produzem moléculas de CTLA4-Ig;

(ii) sujeição da fração solúvel à cromatografia de troca de ân-

nions para obter uma composição eluída compreendendo moléculas de CTLA4-Ig;

(iii) sujeição do produto de proteína da etapa (ii) à cromatografia por interação hidrofóbica de modo a obter uma composição enriquecida compreendendo moléculas de CTLA4-Ig;

(iv) sujeição do produto de proteína de (iii) à cromatografia por afinidade para obter uma composição adicionalmente enriquecida compreendendo moléculas de CTLA4-Ig; e

(v) sujeição do produto de proteína de (iv) à cromatografia de troca de ânions, de modo a isolar uma composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig.

11. Método de acordo com a reivindicação 9 ou 10, em que a composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig obtidas na etapa (ii) é caracterizada por: (a) uma proporção molar média de NANA para moléculas de CTLA4-Ig de 6,0 a 10,1 e (b) uma área de menos do que ou igual a 25,7 por cento de espécies de elevado peso moléculas de CTLA4-Ig conforme determinado através de cromatografia por exclusão de tamanho e detecção espectrofotométrica.

12. Método de acordo com a reivindicação 9 ou 10, em que a composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig obtidas na etapa (iii) é caracterizada pelo fato de que (a) espécies de elevado peso molecular de CTLA4-Ig é uma área de menos de cerca de 2,5% conforme determinado através de cromatografia por exclusão de tamanho e detecção espectrofotométrica, (b) proteína celular é menos de cerca de 6600 ng/ml e (c) MCP-1 é menos de cerca de 5600 ppm.

13. Método de acordo com a reivindicação 9 ou 10, em que a composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig obtidas na etapa (iii) é caracterizada por: (a) uma proporção molar média de NANA para moléculas de CTLA4-Ig de 6,8 a 11,4 e (b) uma área de menos do que ou igual a 2,5 por cento de espécies de elevado peso moléculas de CTLA4-Ig conforme determinado através de cromatografia por exclusão de tamanho e detecção espectrofotométrica.

14. Método de acordo com a reivindicação 9 ou 10, em que a composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig obtidas na etapa (iv) é caracterizada por: (a) uma proporção molar média de NANA para moléculas de CTLA4-Ig de 8,0 a 11,0 e (b) uma área de menos do que ou igual a 2,5 por cento de espécies de elevado peso moléculas de CTL4-Ig conforme determinado através de cromatografia por exclusão de tamanho e detecção espectrofotométrica.

15. Método de acordo com a reivindicação 9 ou 10, em que a composição enriquecida obtida na etapa (iii) é caracterizada pelo fato de que espécies de elevado peso molecular de CTLA4-Ig é uma área de menos de 2,5% conforme determinado através de cromatografia por exclusão de tamanho e detecção espectrofotométrica.

16. Método de acordo com a reivindicação 9 ou 10, em que a composição de proteína compreendendo moléculas de CTLA4-Ig na etapa (v) é caracterizada por: (a) uma proporção molar média de NANA para moléculas de CTLA4-Ig de 8,0 a 11,9 e (b) uma área de menos do que ou igual a 2,0 por cento de espécies de elevado peso moléculas de CTL4-Ig conforme determinado através de cromatografia por exclusão de tamanho e detecção espectrofotométrica.

17. Método para isolamento de uma composição de moléculas de CTLA4-Ig, o método compreendendo:

(i) obtenção de uma fração solúvel de uma cultura líquida compreendendo células de mamífero que produzem moléculas de CTLA4-Ig e, em qualquer ordem, (ii) sujeição da fração solúvel à cromatografia de troca de ânions de modo a obter uma composição enriquecida e eluída compreendendo moléculas de CTLA4-Ig; (iii) sujeição da fração solúvel à cromatografia por interação hidrofóbica de modo a obter uma composição enriquecida e eluída compreendendo moléculas de CTLA4-Ig; (iv) sujeição da fração solúvel à cromatografia por afinidade modo a obter uma composição enriquecida e eluída compreendendo moléculas de CTLA4-Ig; e (v) sujeição da fração solúvel à cromatografia de troca de ânions de modo a obter uma composição enriquecida e eluída compreendendo moléculas de CTLA4-Ig,

em que a composição obtida na etapa (v) é caracterizada pelo fato de que o percentual de espécies de elevado peso molecular de CTLA4-Ig é uma área de menos de cerca de 2,0%, proteína celular é menos de cerca de 95 ng/ml e MCP-1 é menos de cerca de 9,55 ng/ml.

5 18. Método para isolamento de uma composição de moléculas de CTLA4-Ig, o método compreendendo: (i) obtenção de uma fração solúvel de uma cultura líquida compreendendo células de mamífero que produzem moléculas de CTLA4-Ig e , em qualquer ordem, (ii) sujeição da fração solúvel à cromatografia de troca de ânions de modo a obter uma composição enriquecida e eluída compreendendo moléculas de CTLA4-Ig; (iii) sujeição da fração solúvel à cromatografia por interação hidrofóbica de modo a obter uma composição enriquecida e eluída compreendendo moléculas de CTLA4-Ig; (iv) sujeição da fração solúvel à cromatografia por afinidade modo a obter uma composição enriquecida e eluída compreendendo moléculas de CTLA4-Ig; e (v) sujeição da fração solúvel à cromatografia de troca de ânions de modo a obter uma composição enriquecida e eluída compreendendo moléculas de CTLA4-Ig, em que a composição obtida na etapa (iii) é caracterizada pelo fato de que o percentual de espécies de elevado peso molecular de CTLA4-Ig é uma área % de menos de cerca de 2,5, proteína celular é menos de 95 ng/ml, MCP-1 e material semelhante a MCP é menos de cerca de 5 ppm e a proporção molar média de NANA para moléculas de CTLA4-Ig é de cerca de 8,0 a cerca de 12.

10

15

20

19. Método de acordo com a reivindicação 9 ou 10, em que a cromatografia de troca de ânions da etapa (ii) é realizada usando um tampão de lavagem compreendendo HEPES a cerca de 75 mM e NaCl a cerca de 360 mM e tendo um pH de cerca de 8,0.

25

20. Método de acordo com a reivindicação 9 ou 10, em que a cromatografia de troca de ânions da etapa (ii) é realizada usando um tampão de eluição compreendendo HEPES a cerca de 25 mM e NaCl a cerca de 850 mM e tendo um pH de cerca de 7,0.

30

21. Método de acordo com a reivindicação 9 ou 10, em que a cromatografia por interação hidrofóbica da etapa (iii) é realizada usando um

único tampão de lavagem compreendendo HEPES a cerca de 25 mM e NaCl a cerca de 850 mM e tendo um pH de cerca de 7,0.

22. Método de acordo com a reivindicação 9 ou 10, em que a cromatografia por afinidade da etapa (iv) é realizada usando um tampão de lavagem compreendendo Tris a cerca de 25 mM e NaCl a cerca de 250 mM e tendo um pH de cerca de 8,0.

23. Método de acordo com a reivindicação 9 ou 10, em que a cromatografia por afinidade da etapa (iv) é realizada usando um tampão de eluição compreendendo glicina a cerca de 100 mM e tendo um pH de cerca de 3,5.

24. Método de acordo com a reivindicação 9 ou 10, em que a cromatografia de troca de ânions da etapa (v) é realizada usando um tampão de lavagem compreendendo HEPES a cerca de 25 mM e NaCl a cerca de 120 mM e NaCl a cerca de 130 mM e tendo um pH de cerca de 8,0.

25. Método de acordo com a reivindicação 9 ou 10, em que a cromatografia de troca de ânions da etapa (v) é realizada usando um tampão de eluição compreendendo HEPES a cerca de 25 mM e NaCl a cerca de 200 mM e tendo um pH de cerca de 8,0.

26. Método de acordo com a reivindicação 9 ou 10, em que a cromatografia de troca de ânions da etapa (ii) é realizada usando uma coluna tendo uma resina de troca de ânions compreendendo um grupo funcional amina primária, secundária, terciária ou quaternária.

27. Método de acordo com a reivindicação 26, em que uma resina compreende um grupo funcional amina quaternária.

28. Método de acordo com a reivindicação 9 ou 10, em que a cromatografia por interação hidrofóbica da etapa (iii) é realizada usando uma resina de interação hidrofóbica compreendendo um grupo funcional fenila, octila, propila, alcóxi, butila ou isoamila.

29. Método de acordo com a reivindicação 28, em que o grupo funcional compreende um grupo funcional fenila.

30. Método de acordo com a reivindicação 9 ou 10, em que a cromatografia por afinidade da etapa (iv) é realizada usando uma resina de

cromatografia por afinidade compreendendo Proteína A.

31. Método para preparo de uma composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig, o método compreendendo purificação de moléculas de CTLA4-Ig de uma cultura líquida de células, em que a composição de CTLA4-Ig purificada compreende (a) uma quantidade farmacologicamente aceitável de MCP-1 e material semelhante a MCP por mg de moléculas de CTLA4-Ig e (b) uma área de menos de 2,5% de espécies de elevado peso molecular de CTLA4-Ig conforme determinado através de cromatografia por exclusão de tamanho e detecção espectrofotométrica.

32. Método de acordo com a reivindicação 31, em que a quantidade farmacologicamente aceitável de MCP-1 e material semelhante a MCP compreende cerca de 40 a cerca de 0,5 ng/mg de moléculas de CTLA4-Ig.

33. Método de acordo com a reivindicação 31, em que a quantidade farmacologicamente aceitável de MCP-1 e material semelhante a MCP compreende cerca de 35 a cerca de 0,5 ng/mg de moléculas de CTLA4-Ig.

34. Método de acordo com a reivindicação 31, em que a quantidade farmacologicamente aceitável de MCP-1 e material semelhante a MCP compreende cerca de 10 a cerca de 0,5 ng/mg de moléculas de CTLA4-Ig.

35. Método de acordo com a reivindicação 9 ou 10, em que a cromatografia por afinidade da etapa (iv) é realizada usando uma coluna compreendendo uma resina capaz de reduzir MCP-1 e material semelhante a MCP no produto de proteína eluído.

36. Método de acordo com a reivindicação 9 ou 10, em que a cromatografia por interação hidrofóbica da etapa (iii) é realizada usando uma resina de interação hidrofóbica, em que uma resina é capaz de (a) separação de dímeros de CTLA4-Ig de espécies de elevado peso molecular de CTLA4-Ig; (b) aumento do teor de ácido siálico das moléculas de CTLA4-Ig eluídas; ou (c) (a) e (b).

37. Método de acordo com a reivindicação 9 ou 10, em que a cromatografia de troca de ânions da etapa (ii) ou etapa (v) ou ambas, é realizada usando uma resina de troca de ânions, em que uma resina é capaz de (a) diminuir o teor de agregado de elevado peso molecular de CTLA4-Ig da

composição eluída; (b) aumentar o teor de ácido siálico da composição eluída; ou (c) (a) e (b).

38. Método para isolamento de uma composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig, o método compreendendo:

5 (i) obtenção de uma fração solúvel de uma cultura líquida compreendendo células de mamífero que produzem moléculas de CTLA4-Ig e em qualquer ordem;

(ii) sujeição da fração solúvel à cromatografia por afinidade modo a obter uma composição eluída compreendendo moléculas de CTLA4-Ig;

10 (iii) sujeição da fração solúvel à cromatografia de troca de ânions de modo a obter uma composição eluída e enriquecida compreendendo moléculas de CTLA4-Ig; e

(iv) sujeição da fração solúvel à cromatografia por interação hidrofóbica de modo a obter uma composição eluída e enriquecida compreendendo moléculas de CTLA4-Ig.

39. Método de acordo com a reivindicação 38, em que a cromatografia por afinidade etapa é realizada primeiro.

20 40. Método de acordo com a reivindicação 38, em que a cromatografia por afinidade da etapa (ii) é realizada usando uma resina compreendendo Proteína A.

41. Método de acordo com a reivindicação 38, em que a cromatografia por afinidade da etapa (ii) é realizada usando um tampão de eluição compreendendo guanidina.

25 42. Método de acordo com a reivindicação 38, em que a cromatografia por afinidade da etapa (ii) é realizada usando um tampão de eluição compreendendo uréia.

43. Método de acordo com a reivindicação 38, em que a cromatografia por afinidade da etapa (ii) resulta em um aumento em dímeros de CTLA4-Ig na composição eluída compreendendo moléculas de CTLA4-Ig.

30 44. Método para isolamento de uma composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig de líquido coletado de uma cultura de células de

mamífero, em que as células produzem moléculas de CTLA4-Ig, o método compreendendo:

- (i) obtenção de uma fração solúvel do líquido coletado;
- (ii) sujeição da fração solúvel à cromatografia por afinidade para obter uma composição eluída compreendendo moléculas de CTLA4-Ig;
- (iii) sujeição da composição da etapa (ii) à cromatografia de troca de ânions de modo a obter uma composição eluída e enriquecida compreendendo moléculas de CTLA4-Ig; e
- (iv) sujeição da composição da etapa (iii) à cromatografia por interação hidrofóbica para obter uma composição adicionalmente enriquecida compreendendo moléculas de CTLA4-Ig.

45. Método de acordo com a reivindicação 44, em que a composição obtida na etapa (iv) é caracterizada pelo fato de que o percentual de espécies de elevado peso molecular é uma área % de menos de cerca de 2,5 conforme determinado através de cromatografia por exclusão de tamanho e detecção espectrofotométrica e o percentual de proteína celular é menos de cerca de 95 ng/ml e o percentual de MCP-1 é menos de cerca de 5 ppm.

46. Método de acordo com a reivindicação 44, em que a cromatografia de troca de ânions da etapa (iii) é realizada usando um tampão de lavagem compreendendo HEPES a cerca de 50 mM e NaCl a cerca de 135 mM e tendo um pH de cerca de 7.

47. Método de acordo com a reivindicação 44, em que a cromatografia de troca de ânions da etapa (iii) é realizada usando um tampão de eluição compreendendo HEPES a cerca de 50 mM e NaCl a cerca de 200 mM e tendo um pH de cerca de 7.

48. Método de acordo com a reivindicação 44, em que a cromatografia por interação hidrofóbica da etapa (iv) é realizada usando um tampão de lavagem compreendendo HEPES a cerca de 50 mM e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a cerca de 1,2 M e tendo um pH de cerca de 7.

49. Método de acordo com a reivindicação 44, em que a cromatografia por afinidade da etapa (ii) é realizada usando um tampão de lava-

gem compreendendo NaH_2PO_4 a cerca de 25 mM e NaCl a cerca de 150 mM e tendo um pH de cerca de 7,5.

50. Método de acordo com a reivindicação 44, em que a cromatografia por afinidade da etapa (ii) é realizada usando um tampão de eluição compreendendo glicina a cerca de 250 mM e tendo um pH de cerca de 3.

51. Método de acordo com a reivindicação 44, em que a cromatografia de troca de ânions da etapa (iii) é realizada usando uma coluna tendo uma resina de troca de ânions compreendendo um grupo funcional amina primária, secundária, terciária ou quaternária.

52. Método de acordo com a reivindicação 51, em que uma resina compreende um grupo funcional amina quaternária.

53. Método de acordo com a reivindicação 47, em que a cromatografia por interação hidrofóbica da etapa (iii) é realizada usando uma resina de interação hidrofóbica compreendendo um grupo funcional fenila, octila, propila, alcóxi, butila ou isoamila.

54. Método de acordo com a reivindicação 53, em que o grupo funcional compreende um grupo funcional fenila.

55. Método de acordo com a reivindicação 44, em que a cromatografia por afinidade da etapa (ii) é realizada usando uma resina compreendendo Proteína A.

56. Composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig obtidas através do método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-55.

57. Composição de CTLA4-Ig obtida através do método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-56, em que a composição compreende um ou mais polipeptídeos tendo SEQ ID NO:2, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10.

58. Composição de CTLA4-Ig obtida através do método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-56, em que a composição compreende um ou mais polipeptídeos tendo SEQ ID NO:4, 11, 12, 13, 14, 15 ou 16.

59. Plasmídeo de expressão de CTLA4-Ig tendo a seqüência de ácido nucleico de SEQ ID NO:17.

60. Composição substancialmente purificada compreendendo moléculas de CTLA4-Ig, em que as moléculas de CTLA4-Ig têm uma proporção molar média de ácido siálico para proteína de CTLA4-Ig de cerca de 5,5 a cerca de 18.

5 61. Composição substancialmente purificada compreendendo moléculas de CTLA4-Ig, em que as moléculas de CTLA4-Ig têm uma proporção molar média de ácido siálico para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 5,5 a cerca de 9,5.

10 62. Composição substancialmente purificada compreendendo moléculas de CTLA4-Ig, em que as moléculas de CTLA4-Ig têm uma proporção molar média de ácido siálico para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 5 a cerca de 10.

15 63. Composição substancialmente purificada compreendendo moléculas de CTLA4-Ig, em que as moléculas de CTLA4-Ig têm uma proporção molar média de ácido siálico para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 6 a cerca de 18.

20 64. Composição substancialmente purificada compreendendo moléculas de CTLA4-Ig, em que as moléculas de CTLA4-Ig têm uma proporção molar média de ácido siálico para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 8 a cerca de 18.

25 65. Composição substancialmente purificada compreendendo moléculas de CTLA4-Ig, em que as moléculas de CTLA4-Ig têm uma proporção molar média de ácido siálico para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 8 a cerca de 12.

66. Composição substancialmente purificada compreendendo moléculas de CTLA4-Ig, em que as moléculas de CTLA4-Ig têm uma proporção molar média de ácido siálico para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 8 a cerca de 11.

30 67. Composição substancialmente purificada compreendendo moléculas de CTLA4-Ig, em que as moléculas de CTLA4-Ig têm uma proporção molar média de ácido siálico para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 7 a cerca de 12.

68. Composição substancialmente purificada compreendendo moléculas de CTLA4-Ig, em que as moléculas de CTLA4-Ig têm uma proporção molar média de ácido siálico para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 7 a cerca de 11.

5 69. Composição substancialmente purificada compreendendo moléculas de CTLA4-Ig, em que as moléculas de CTLA4-Ig têm uma proporção molar média de ácido siálico para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 11 a cerca de 18.

10 70. Composição substancialmente purificada compreendendo moléculas de CTLA4-Ig, em que as moléculas de CTLA4-Ig têm uma proporção molar média de ácido siálico para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 12 a cerca de 18.

15 71. Composição substancialmente purificada compreendendo moléculas de CTLA4-Ig, em que as moléculas de CTLA4-Ig têm uma proporção molar média de ácido siálico para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 13 a cerca de 18.

20 72. Composição substancialmente purificada compreendendo moléculas de CTLA4-Ig, em que as moléculas de CTLA4-Ig têm uma proporção molar média de ácido siálico para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 14 a cerca de 18.

73. Composição substancialmente purificada compreendendo moléculas de CTLA4-Ig, em que as moléculas de CTLA4-Ig têm uma proporção molar média de ácido siálico para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 15 a cerca de 17.

25 74. Composição substancialmente purificada compreendendo moléculas de CTLA4-Ig, em que as moléculas de CTLA4-Ig têm uma proporção molar média de ácido siálico para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 16.

30 75. Composição substancialmente purificada compreendendo moléculas de CTLA4-Ig, em que as moléculas de CTLA4-Ig têm uma proporção molar média de ácido siálico para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 10.

76. Composição substancialmente purificada compreendendo moléculas de CTLA4-Ig, em que as moléculas de CTLA4-Ig têm uma proporção molar média de ácido siálico para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 6.

5 77. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 60-76, em que o ácido siálico é ácido N-acetil neuramínico (NANA).

78. Composição substancialmente purificada compreendendo moléculas de CTLA4-Ig, em que as moléculas de CTLA4-Ig têm uma proporção molar média de NANA para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 8 a cerca de 12.

10 79. Composição substancialmente purificada compreendendo moléculas de CTLA4-Ig, em que as moléculas de CTLA4-Ig têm uma proporção molar média de ácido N-glicolil neuramínico (NGNA) para moléculas de CTLA4-Ig de menos de ou igual a cerca de 1,5.

15 80. Composição substancialmente purificada compreendendo moléculas de CTLA4-Ig, em que as moléculas de CTLA4-Ig têm uma proporção molar média de NGNA para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 0,5 a cerca de 1,5.

20 81. Composição substancialmente purificada compreendendo moléculas de CTLA4-Ig, em que as moléculas de CTLA4-Ig têm uma proporção molar média de NGNA para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 1,0 a cerca de 1,5.

25 82. Composição substancialmente purificada compreendendo moléculas de CTLA4-Ig, em que as moléculas de CTLA4-Ig têm uma proporção molar média de ácido siálico para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 6 a cerca de 18.

83. Composição substancialmente purificada compreendendo moléculas de CTLA4-Ig, em que as moléculas de CTLA4-Ig são caracterizadas por uma proporção molar média de ácido siálico por mol de moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 6 a cerca de 12.

30 84. Composição substancialmente purificada compreendendo moléculas de CTLA4-Ig, em que cada polipeptídeo da molécula compreende a seqüência de SEQ ID NO:11, 12, 13, 14, 15 ou 16 e em que as moléculas

de CTLA4-Ig são caracterizadas por uma proporção molar média de ácido siálico por mol de moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 5,5 a cerca de 9,5.

85. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 78-84, em que a proporção molar de ácido siálico por mol de moléculas de CTLA4-Ig é determinada através de hidrólise ácida e HPLC.

86. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 78-84, em que as moléculas de CTLA4-Ig compreendem um ou mais polipeptídeos tendo SEQ ID NO:2, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10.

87. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 78-84, em que as moléculas de CTLA4-Ig compreendem um ou mais polipeptídeos tendo SEQ ID NO:4, 11, 12, 13, 14, 15 ou 16.

88. Composição substancialmente purificada compreendendo moléculas de CTLA4-Ig, em que uma área de mais do que ou igual a 95 por cento das moléculas de CTLA4-Ig são dímeros de CTLA4-Ig, conforme determinado através de cromatografia por exclusão de tamanho e detecção espectrofotométrica.

89. Composição de acordo com a reivindicação 88, em que mais do que ou igual a 98% das moléculas de CTLA4-Ig são dímeros de CTLA4-Ig.

90. Composição de acordo com a reivindicação 88, em que mais do que ou igual a 99% das moléculas de CTLA4-Ig são dímeros de CTLA4-Ig.

91. Composição de acordo com a reivindicação 88, em que mais do que ou igual a 99,5% das moléculas de CTLA4-Ig são dímeros de CTLA4-Ig.

92. Composição de acordo com a reivindicação 88, em que de cerca de 95% a cerca de 99,5% das moléculas de CTLA4-Ig são dímeros de CTLA4-Ig e uma área de cerca de 0,5 por cento a uma área de cerca de 5 por cento das moléculas são espécies de elevado peso molecular de CTLA4-Ig conforme determinado através de cromatografia por exclusão de tamanho e detecção espectrofotométrica.

93. Composição de acordo com a reivindicação 88, em que cer-

ca de 98,6% das moléculas são dímeros de CTLA4-Ig e uma área de cerca de 1,2 por cento das moléculas são espécies de elevado peso molecular de CTLA4-Ig e uma área de menos de cerca de 0,7 por cento das moléculas são monômeros de CTLA4-Ig conforme determinado através de cromatografia por exclusão de tamanho e detecção espectrofotométrica.

94. Composição de acordo com a reivindicação 88, em que cerca de menos de 0,3% das moléculas são multímeros compreendendo cinco ou mais monômeros de CTLA4-Ig.

95. Composição consistindo essencialmente de dímeros de CTLA4-Ig.

96. Composição consistindo essencialmente de moléculas de CTLA4-Ig, em que a população é substancialmente isenta de monômeros de CTLA4-Ig.

97. Composição consistindo essencialmente de moléculas de CTLA4-Ig, em que a população é substancialmente isenta de espécies de elevado peso molecular de CTLA4-Ig.

98. Composição consistindo essencialmente de monômeros de CTLA4-Ig substancialmente isenta de dímeros de CTLA4-Ig e espécies de elevado peso molecular.

99. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 95-98, em que cada monômero de cada dímero de CTLA4-Ig tem pelo menos 3 grupos ácido siálico.

100. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 95-98, em que cada monômero de cada dímero de CTLA4-Ig tem pelo menos 2,5 grupos ácido siálico.

101. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 95-98, em que cada monômero de cada dímero de CTLA4-Ig tem de pelo menos 3 grupos ácido siálico para pelo menos 8 grupos ácido siálico.

102. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 95-98, em que cada monômero de cada dímero de CTLA4-Ig tem de pelo menos 2,5 grupos ácido siálico para pelo menos 5 grupos ácido siálico.

103. Composição de acordo com qualquer uma das reivindica-

ções 95-98, em que cada dímero compreende dois polipeptídeos de CTLA4-Ig, em que cada polipeptídeo tem uma seqüência de aminoácido selecionada do grupo consistindo de SEQ ID NOS:5-16.

5 104. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 95-98, em que a composição compreende um ou mais polipeptídeos tendo SEQ ID NO:2, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10.

105. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 95-98, em que a composição compreende um ou mais polipeptídeos tendo SEQ ID NO:4, 11, 12, 13, 14, 15 ou 16.

10 106. Composição isolada compreendendo tetrâmeros de CTLA4-Ig a qual é substancialmente isenta de dímeros de CTLA4-Ig.

107. Composição isolada compreendendo tetrâmeros de CTLA4-Ig a qual é substancialmente isenta de monômeros de CTLA4-Ig.

15 108. Composição de acordo com a reivindicação 106 ou 107, em que a composição existe como uma quantidade que é maior do que cerca de 100 gramas.

20 109. Composição de tetrâmeros de CTLA4-Ig de acordo com a reivindicação 106 ou 107, em que cada tetrâmero compreende dois pares de polipeptídeos de CTLA4-Ig, em que cada polipeptídeo tem uma seqüência de aminoácido selecionada do grupo consistindo de SEQ ID NOS:5-10.

110. Composição de tetrâmeros de CTLA4-Ig de acordo com a reivindicação 106 ou 107, em que cada tetrâmero compreende dois pares de polipeptídeos de CTLA4-Ig, em que cada polipeptídeo tem uma seqüência de aminoácido selecionada do grupo consistindo de SEQ ID NOS:11-16.

25 111. Composição de acordo com a reivindicação 106 ou 107, em que cada tetrâmero é capaz de se ligar à CD80 ou CD86.

112. Composição farmacologicamente aceitável compreendendo moléculas de CTLA4-Ig, em que a composição é substancialmente isenta de MCP-1.

30 113. Composição farmacologicamente aceitável compreendendo moléculas de CTLA4-Ig, em que a composição compreende não mais do que cerca de 25 ppm de MCP-1.

114. Composição de acordo com a reivindicação 113, em que a composição compreende não mais do que 10 ppm de MCP-1.

5 115. Composição de acordo com a reivindicação 113, em que a composição compreende cerca de 0,2 ng/ml de MCP-1 a cerca de 10 ng / ml de MCP-1.

116. Composição farmacologicamente aceitável compreendendo moléculas de CTLA4-Ig, em que a composição compreende (a) de cerca de 0,2 ng/ml de MCP-1 a cerca de 10 ng / ml de MCP-1 e (b) não mais do que 25 ng/ml de proteína CHO ou não mais do que 10 ng/ml de proteína CHO.

10 117. Composição de acordo com a reivindicação 116, em que a composição compreende não mais do que cerca de 20 pg/ml de DNA.

118. Composição isolada compreendendo moléculas de CTLA4-Ig em que, quando administrada a um indivíduo em uma dose intravenosa de cerca de 10 mg/kg, como moléculas de CTLA4-Ig são capazes de exibir:

- 15 (a) uma área sob a curva (AUC) de cerca de 44400 µg.h/ml;
(b) um volume de distribuição de cerca de 0,09 L/kg;
(c) uma concentração de pico (Cmax) de cerca de 292 µg/ml;

e

- (d) uma taxa de eliminação de cerca de 0,23 ml/h/kg.

20 119. Composição isolada compreendendo moléculas de CTLA4-Ig, em que a composição compreende isoformas dominantes de moléculas de CTLA4-Ig visualizáveis sobre um gel de focalização isoeletrica o qual têm um ponto isoeletrico, pI, menos do que ou igual a $5,1 \pm 0,2$ conforme determinado através de focalização isoeletrica.

25 120. Composição de acordo com a reivindicação 119, em que o pI médio da composição aumenta após tratamento com neuraminidase.

30 121. Composição de acordo com a reivindicação 119, em que pelo menos 40% das moléculas de CTLA4-Ig exibem um ponto isoeletrico menos de ou igual a cerca de $5,1 \pm 0,2$ conforme determinado através de focalização isoeletrica.

122. Composição de acordo com a reivindicação 119, em que pelo menos 70% das moléculas de CTLA4-Ig exibem um ponto isoeletrico

menos de ou igual a cerca de $5,1 \pm 0,2$ conforme determinado através de focalização isoelétrica.

123. Composição de acordo com a reivindicação 119, em que pelo menos 90% das moléculas de CTLA4-Ig exibem um ponto isoelétrico
5 menos de ou igual a cerca de $5,1 \pm 0,2$ conforme determinado através de focalização isoelétrica.

124. Composição isolada compreendendo moléculas de CTLA4-Ig tendo um pI de cerca de $3,0 \pm 0,2$ a cerca de $5,0 \pm 0,2$.

125. Composição isolada compreendendo moléculas de CTLA4-Ig tendo um pI de cerca de $4,3 \pm 0,2$ a cerca de $5,0 \pm 0,2$.
10

126. Composição isolada compreendendo moléculas de CTLA4-Ig tendo um pI de cerca de $3,3 \pm 0,2$ a cerca de $4,7 \pm 0,2$.

127. Composição de acordo com a reivindicação 124, 125 ou 126, em que a composição é substancialmente purificada.

128. Método para preparo de uma composição, a composição compreendendo uma molécula de CTLA4-Ig com um pI de cerca de $3,0 \pm 0,2$ a cerca de $5,0 \pm 0,2$, o método compreendendo: (a) sujeição de uma mistura de moléculas de CTLA4-Ig à eletroforese em gel de focalização isoelétrica, em que uma única banda sobre o gel representa uma população de
15 moléculas de CTLA4-Ig com um pI em particular e (b) isolamento da população de moléculas de CTLA4-Ig tendo um pI de cerca de $3,0 \pm 0,2$ a cerca de $5,0 \pm 0,2$ de modo a preparar a composição.
20

129. Composição isolada compreendendo moléculas de CTLA4-Ig, em que a composição compreende isoformas dominantes visualizáveis
25 sobre um gel de focalização isoelétrica o qual têm um ponto isoelétrico, pI, menos do que ou igual a $5,5 \pm 0,2$ conforme determinado através de focalização isoelétrica.

130. Composição de acordo com a reivindicação 129, em que o pI médio da composição aumenta após tratamento com neuraminidase.

131. Composição de acordo com a reivindicação 129, em que pelo menos 40% das moléculas de CTLA4-Ig exibem um ponto isoelétrico
30 menos de ou igual a cerca de $5,3 \pm 0,2$ conforme determinado através de

focalização isoelétrica.

5 132. Composição de acordo com a reivindicação 129, em que pelo menos 70% das moléculas de CTLA4-Ig exibem um ponto isoelétrico menos de ou igual a cerca de $5,3 \pm 0,2$ conforme determinado através de focalização isoelétrica.

133. Composição de acordo com a reivindicação 129, em que pelo menos 90% das moléculas de CTLA4-Ig exibem um ponto isoelétrico menos de ou igual a cerca de $5,3 \pm 0,2$ conforme determinado através de focalização isoelétrica.

10 134. Composição isolada compreendendo moléculas de CTLA4-Ig tendo um pI de cerca de $3,0 \pm 0,2$ a cerca de $5,2 \pm 0,2$.

135. Composição isolada compreendendo moléculas de CTLA4-Ig tendo um pI de cerca de $4,5 \pm 0,2$ a cerca de $5,2 \pm 0,2$.

15 136. Composição isolada compreendendo moléculas de CTLA4-Ig tendo um pI de cerca de $4,7 \pm 0,2$ a cerca de $5,1 \pm 0,2$.

137. Composição de acordo com a reivindicação 134, 135 ou 136, em que a composição é substancialmente purificada.

20 138. Método para preparo de uma composição, a composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig com um pI de cerca de $2,0 \pm 0,2$ a cerca de $5,2 \pm 0,2$, o método compreendendo: (a) sujeição de uma mistura de moléculas de CTLA4-Ig à eletroforese em gel de focalização isoelétrica, em que uma única banda sobre o gel representa uma população de moléculas de CTLA4-Ig com um pI em particular e (b) isolamento da população de moléculas de CTLA4-Ig tendo um pI de cerca de $3,0 \pm 0,2$ a cerca de $5,2 \pm 0,2$ de modo a preparar a composição.

25 139. Composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig, em que as moléculas de CTLA4-Ig são caracterizadas por uma proporção molar média de GlcNAc para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 17 a cerca de 28.

30 140. Composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig, em que as moléculas de CTLA4-Ig são caracterizadas por uma proporção molar média de GlcNAc para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 17 a cerca de

25.

141. Composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig, em que as moléculas de CTLA4-Ig são caracterizadas por uma proporção molar média de GlcNAc para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 15 a cerca de

5 35.

142. Composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig, em que cada polipeptídeo da molécula compreende a seqüência de SEQ ID NO:11, 12, 13, 14, 15 ou 16 e em que as moléculas de CTLA4-Ig são caracterizadas por uma proporção molar média de GlcNAc para moléculas de C-
10 TLA4-Ig de cerca de 24 a cerca de 28.

143. Composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig, em que as moléculas de CTLA4-Ig são caracterizadas por uma proporção molar média de GalNAc para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 1,7 a cerca de
15 3,6.

144. Composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig, em que cada polipeptídeo da molécula compreende a seqüência de SEQ ID NO:11, 12, 13, 14, 15 ou 16 e em que as moléculas de CTLA4-Ig são caracterizadas por uma proporção molar média de GalNAc para moléculas de
20 CTLA4-Ig de cerca de 2,7 a cerca de 3,6.

145. Composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig, em que as moléculas de CTLA4-Ig são caracterizadas por uma proporção molar média de galactose para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 8 a cerca de
25 17.

146. Composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig, em que cada polipeptídeo da molécula compreende a seqüência de SEQ ID NO:11, 12, 13, 14, 15 ou 16 e em que as moléculas de CTLA4-Ig são caracterizadas por uma proporção molar média de galactose para moléculas de
30 CTLA4-Ig de cerca de 11 a cerca de 13.

147. Composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig, em que as moléculas de CTLA4-Ig são caracterizadas por uma proporção molar média de fucose para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 3,5 a cerca de
35 8,3.

148. Composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig, em que cada polipeptídeo da molécula compreende a seqüência de SEQ ID NO:11, 12, 13, 14, 15 ou 16 e em que as moléculas de CTLA4-Ig são caracterizadas por uma proporção molar média de fucose para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 6,4 a cerca de 7,0.

149. Composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig, em que as moléculas de CTLA4-Ig são caracterizadas por uma proporção molar média de manose para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 7,7 a cerca de 22.

150. Composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig, em que cada polipeptídeo da molécula compreende a seqüência de SEQ ID NO:11, 12, 13, 14, 15 ou 16 e em que as moléculas de CTLA4-Ig são caracterizadas por uma proporção molar média de manose para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 14 a cerca de 16.

151. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 139-150, em que a proporção molar de GlcNAc para moléculas de CTLA4-Ig é determinada através de eletroforese capilar.

152. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 139-150, em que a proporção molar de GalNAc para moléculas de CTLA4-Ig é determinada através de eletroforese capilar.

153. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 139-150, em que a proporção molar de galactose para moléculas de CTLA4-Ig é determinada através de eletroforese capilar.

154. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 139-150, em que a proporção molar de fucose para moléculas de CTLA4-Ig é determinada através de eletroforese capilar.

155. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 139-150, em que a proporção molar de manose para moléculas de CTLA4-Ig é determinada através de eletroforese capilar.

156. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 139-150, em que as moléculas de CTLA4-Ig são obtidas através de fixação enzimática de um ou mais carboidratos à molécula.

157. Composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig, em que as moléculas compreendem resíduos de carboidrato presos à moléculas enzimaticamente *in vitro*.

5 158. Composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig caracterizada por:

(a) uma proporção molar média de GlcNAc para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 15 a cerca de 35; e

(b) uma proporção molar média de ácido siálico para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 6 a cerca de 12.

10 159. Composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig caracterizada por:

(a) uma proporção molar média de GlcNAc para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 15 a cerca de 35;

15 (b) uma proporção molar média de GalNAc para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 1,7 a cerca de 3,6; e

(c) uma proporção molar média de ácido siálico para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 6 a cerca de 12.

160. Composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig caracterizada por:

20 (a) uma proporção molar média de GlcNAc para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 15 a cerca de 35;

(b) uma proporção molar média de GalNAc para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 1,7 a cerca de 3,6;

25 (c) uma proporção molar média de galactose para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 8 a cerca de 17; e

(d) uma proporção molar média de ácido siálico para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 6 a cerca de 12.

161. Composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig caracterizada por:

30 (a) uma proporção molar média de GlcNAc para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 15 a cerca de 35;

(b) uma proporção molar média de GalNAc para moléculas de

CTLA4-Ig de cerca de 1,7 a cerca de 3,6;

(c) uma proporção molar média de galactose para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 8 a cerca de 17;

(d) uma proporção molar média de fucose para moléculas de
5 CTLA4-Ig de cerca de 3,5 a cerca de 8,3; e

(e) uma proporção molar média de ácido siálico para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 6 a cerca de 12.

162. Composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig caracterizada por:

10 (a) uma proporção molar média de GlcNAc para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 15 a cerca de 35;

(b) uma proporção molar média de GalNAc para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 1,7 a cerca de 3,6;

(c) uma proporção molar média de galactose para moléculas
15 de CTLA4-Ig de cerca de 8 a cerca de 17;

(d) uma proporção molar média de fucose para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 3,5 a cerca de 8,3;

(e) uma proporção molar média de manose para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 7,2 a cerca de 22; e

20 (f) uma proporção molar média de ácido siálico para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 6 a cerca de 12.

163. Composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig caracterizada por:

25 (a) uma proporção molar média de GlcNAc para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 24 a cerca de 28; e

(b) uma proporção molar média de ácido siálico para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 5,5 a cerca de 9,5.

164. Composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig caracterizada por:

30 (a) uma proporção molar média de GlcNAc para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 24 a cerca de 28;

(b) uma proporção molar média de GalNAc para moléculas de

CTLA4-Ig de cerca de 2,7 a cerca de 3,6; e

(c) uma proporção molar média de ácido siálico para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 5,5 a cerca de 9,5.

5 165. Composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig caracterizada por:

(a) uma proporção molar média de GlcNAc para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 24 a cerca de 28;

(b) uma proporção molar média de GalNAc para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 2,7 a cerca de 3,6;

10 (c) uma proporção molar média de galactose para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 11 a cerca de 13; e

(d) uma proporção molar média de ácido siálico para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 5,5 a cerca de 9,5.

15 166. Composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig caracterizada por:

(a) uma proporção molar média de GlcNAc para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 24 a cerca de 28;

(b) uma proporção molar média de GalNAc para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 2,7 a cerca de 3,6;

20 (c) uma proporção molar média de galactose para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 11 a cerca de 13;

(d) uma proporção molar média de fucose para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 6,4 a cerca de 7,0; e

25 (e) uma proporção molar média de ácido siálico para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 5,5 a cerca de 9,5.

167. Composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig caracterizada por:

(a) uma proporção molar média de GlcNAc para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 24 a cerca de 28;

30 (b) uma proporção molar média de GalNAc para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 2,7 a cerca de 3,6;

(c) uma proporção molar média de galactose para moléculas

de CTLA4-Ig de cerca de 11 a cerca de 13;

(d) uma proporção molar média de fucose para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 6,4 a cerca de 7,0;

(e) uma proporção molar média de manose to proteína de C-
5 TLA4-Ig de cerca de 14 a cerca de 16; e

(f) uma proporção molar média de ácido siálico para proteína de CTLA4-Ig de cerca de 5,5 a cerca de 9,5.

168. Composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig, em que as moléculas de CTLA4-Ig são glicosiladas em um resíduo de aminoácido de asparagina na posição 102 de SEQ ID NO:2 ou 4, um resíduo de aminoácido de asparagina na posição 134 de SEQ ID NO:2 ou 4, um resíduo de aminoácido de asparagina na posição 233 de SEQ ID NO:2 ou 4, um resíduo de aminoácido de serina na posição 155 de SEQ ID NO:2 ou 4 ou um resíduo de aminoácido de serina na posição 165 de SEQ ID NO:2 ou 4.

15 169. Composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig, em que as moléculas de CTLA4-Ig são glicosiladas e em que pelo menos cerca de 2% da massa total de glicosilação é glicosilação O-ligada.

170. Composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig, em que a composição exibe um pico de cromatograma de NGNA de cerca de
20 $9,6 \pm 0,3$ e um cromatograma de pico de NANA de cerca de $10,5 \pm 0,3$.

171. Composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig, em que as moléculas de CTLA4-Ig exibem um perfil de carboidrato substancialmente o mesmo conforme a figura 68.

172. Composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig, em que as moléculas de CTLA-Ig exibem um perfil de carboidrato conforme
25 mostrado na figura 68.

173. Composição consistindo essencialmente de moléculas de CTLA4-Ig, em que as moléculas de CTLA4-Ig exibem um perfil de carboidrato dos Domínios I - IV, em que o Domínio I compreende picos os quais representam oligossacarídeos a-sialilados, o Domínio II compreende picos os
30 quais representam oligossacarídeos mono-sialilados, Domínio III compreende picos os quais representam oligossacarídeos di-sialilados, Domínio IV

compreende picos os quais representam oligossacarídeos tri-sialilados e Domínio V compreende picos os quais representam oligossacarídeos tetra-sialilados e em que o perfil é um cromatograma de oligossacarídeos liberados de CTLA4-Ig.

5 174. Composição de acordo com a reivindicação 172, em que a diferença nos tempos de retenção de oligossacarídeos N-ligados entre um primeiro pico no Domínio I e um pico principal no Domínio II é de cerca de 10 a cerca de 12 minutos.

10 175. Composição de acordo com a reivindicação 172, em que a diferença nos tempos de retenção de oligossacarídeos N-ligados entre um primeiro pico no Domínio I e um pico principal no Domínio II é de cerca de 11 a cerca de 13 minutos.

15 176. Composição de acordo com a reivindicação 172, em que glicosilação dos Domínios III e IV compreende cerca de 25% a cerca de 36% de glicosilação N-ligada conforme medido através de HPAEC.

 177. Composição de acordo com a reivindicação 172, em que glicosilação do Domínio I compreende cerca de 24,5% a cerca de 35,2% de glicosilação N-ligada conforme medido através de HPAEC.

20 178. Composição de acordo com a reivindicação 172, em que glicosilação do Domínio II compreende cerca de 26,3% a cerca de 34,1% de glicosilação N-ligada conforme medido através de HPAEC.

 179. Composição de acordo com a reivindicação 172, em que glicosilação do Domínio III compreende cerca de 21,9% a cerca de 31,5% de glicosilação N-ligada conforme medido através de HPAEC.

25 180. Composição de acordo com a reivindicação 172, em que glicosilação do Domínio IV e Domínio V compreende cerca de 7,9% a cerca de 18,6% de glicosilação N-ligada conforme medido através de HPAEC.

 181. Composição de acordo com a reivindicação 172, em que:

30 (a) o Domínio I exibe uma área percentual de pelo menos cerca de 31 %;

 (b) o Domínio II exibe uma área percentual de pelo menos cerca de 33 %;

(c) o Domínio III exibe uma área percentual de pelo menos cerca de 24 %;

(d) o Domínio IV exibe uma área percentual de pelo menos cerca de 9,4 % ou

5 (e) o Domínio V exibe uma área percentual de pelo menos cerca de 6,7 %;

em que a área é medida a partir de um cromatograma de oligosacarídeos liberados de CTLA4-Ig.

182. Composição de acordo com a reivindicação 172, em que:

10 (a) o Domínio I exibe pelo menos cerca de 5 picos;

(b) o Domínio II exibe pelo menos cerca de 5 picos;

(c) o Domínio III exibe pelo menos cerca de 5 picos;

(d) o Domínio IV exibe pelo menos cerca de 6 picos,

(e) o Domínio V exibe pelo menos cerca de 6 picos ou

15 (f) o Domínio I exibe pelo menos 3 picos,

em que os picos são exibidos sobre um cromatograma.

183. Composição compreendendo polipeptídeos de CTLA4-Ig, em que:

20 (a) cerca de 80 % dos polipeptídeos têm glicosilação N-ligada bi-antenária;

(b) cerca de 14 % dos polipeptídeos têm glicosilação N-ligada tri-antenária; e

(c) cerca de 6 % dos polipeptídeos têm glicosilação N-ligada tetra-antenária.

25 184. Composição de acordo com a reivindicação 183, em que a glicosilação N-ligada é determinada através de cromatografia de troca de ânions em elevado pH com detecção amperométrica pulsada (HPEAC-PAD).

185. Composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig caracterizada por:

30 (a) uma proporção molar média de galactose para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 8 a cerca de 17; e

(b) uma proporção molar média de NANA para moléculas de

CTLA4-Ig de cerca de 6 a cerca de 12.

186. Composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig caracterizada por:

(a) uma proporção molar média de galactose para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 8 a cerca de 17;

(b) uma proporção molar média de NANA para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 6 a cerca de 12; e

(c) uma área percentual de espécies de elevado peso molecular de CTLA4-Ig de menos de cerca de 3% conforme determinado através de cromatografia por exclusão de tamanho e detecção espectrofotométrica.

187. Composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig caracterizada por:

(a) uma proporção molar média de galactose para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 8 a cerca de 17;

(b) uma proporção molar média de NANA para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 6 a cerca de 12; e

(c) uma proporção molar média de NGNA para moléculas de CTLA4-Ig de menos de ou igual a cerca de 1,5.

188. Composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig caracterizada por:

(a) uma proporção molar média de galactose para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 8 a cerca de 17;

(b) uma proporção molar média de NANA para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 6 a cerca de 12;

(c) um teor de agregado de CTLA4-Ig de elevado peso molecular com uma área de menos de cerca de 3 por cento conforme determinado através de cromatografia por exclusão de tamanho e detecção espectrofotométrica; e

(d) um perfil de carboidrato substancialmente o mesmo conforme aquele da figura 68.

189. Composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig caracterizada por:

(a) uma proporção molar média de galactose para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 8 a cerca de 17;

(b) uma proporção molar média de NANA para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 6 a cerca de 12;

5 (c) um teor de agregado de CTLA4-Ig de elevado peso com uma área de menos de cerca de 3 por cento conforme determinado através de cromatografia por exclusão de tamanho e detecção espectrofotométrica; e

(d) um teor de glicosilação no Domínios III, IV e V de pelo me-
10 nos cerca de 29,8% a cerca de 50,1% de glicosilação N-ligada conforme determinado através de HPAEC.

190. Composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig caracterizada por:

(a) uma proporção molar média de galactose para moléculas
15 de CTLA4-Ig de cerca de 8 a cerca de 17;

(b) uma proporção molar média de NANA para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 6 a cerca de 12; e

(c) uma área de espécies de elevado peso molecular de C-
20 TLA4-Ig de menos de cerca de 3 por cento conforme determinado através de cromatografia por exclusão de tamanho e detecção espectrofotométrica.

191. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 185-190, em que as moléculas são ainda caracterizadas por uma proporção molar média de NANA para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 8 a cerca de 12.

25 192. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 185-190, em que as moléculas são ainda caracterizadas por:

(a) cerca de 80 % glicosilação N-ligada bi-antenária;

(b) cerca de 14 % glicosilação N-ligada tri-antenária; e

(c) cerca de 6 % glicosilação N-ligada tetra-antenária.

30 193. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 192, em que as moléculas ainda compreendem qualquer combinação de um ou mais de:

(a) a seqüência de aminoácido de SEQ ID NO:10 (metionina na posição de aminoácido 27 e glicina na posição de aminoácido 382 de SEQ ID NO:2);

5 (b) a seqüência de aminoácido de SEQ ID NO:7 (metionina na posição de aminoácido 27 e lisina na posição de aminoácido 383 de SEQ ID NO:2);

(c) a seqüência de aminoácido de SEQ ID NO:9 (alanina na posição de aminoácido 26 e glicina na posição de aminoácido 382 de SEQ ID NO:2); e

10 (d) a seqüência de aminoácido de SEQ ID NO:6 (alanina na posição de aminoácido 26 e lisina na posição de aminoácido 383 de SEQ ID NO:2).

194. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 185-190, em que:

15 (a) cerca de 90% das moléculas compreendem a seqüência de aminoácido de SEQ ID NO:2 começando com a metionina no resíduo 27;

(b) cerca de 10% das moléculas compreendem a seqüência de aminoácido de SEQ ID NO:2 começando com a alanina no resíduo número 26;

20 (c) cerca de 4% das moléculas compreendem a seqüência de aminoácido de SEQ ID NO:2 terminando com a lisina no resíduo número 383; e

(d) cerca de 96% das moléculas compreendem a seqüência de aminoácido de SEQ ID NO:2 terminando com a glicina no resíduo número 382.

25 195. Composição compreendendo polipeptídeos de CTLA4-Ig, em que:

(a) cerca de 80 % dos polipeptídeos têm glicosilação N-ligada bi-antenária;

30 (b) cerca de 14 % dos polipeptídeos têm glicosilação N-ligada tri-antenária;

(c) cerca de 6 % dos polipeptídeos têm glicosilação N-ligada

tetra-antenária; e

- (d) uma proporção molar média de NGNA para moléculas de CTLA4-Ig de menos do que ou igual a 1,5.

196. Composição compreendendo polipeptídeos de CTLA4-Ig,

5 em que:

- (a) cerca de 80% dos polipeptídeos têm glicosilação N-ligada bi-antenária;

- (b) cerca de 14 % dos polipeptídeos têm glicosilação N-ligada tri-antenária;

- 10 (c) cerca de 6 % dos polipeptídeos têm glicosilação N-ligada tetra-antenária; e

- (d) uma proporção molar média de GlcNAc para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 15 a cerca de 35.

197. Composição compreendendo polipeptídeos de CTLA4-Ig,

15 em que:

- (a) cerca de 80 % dos polipeptídeos têm glicosilação N-ligada bi-antenária;

- (b) cerca de 14 % dos polipeptídeos têm glicosilação N-ligada tri-antenária;

- 20 (c) cerca de 6 % dos polipeptídeos têm glicosilação N-ligada tetra-antenária; e

- (d) uma proporção molar média de GalNAc para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 1,7 a cerca de 3,6.

198. Composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig ca-

25 racterizada por:

- (a) uma proporção molar média de galactose para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 11 a cerca de 13; e

- (b) uma proporção molar média de ácido siálico para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 5,5 a cerca de 9,5.

30 199. Composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig caracterizada por:

- (a) uma proporção molar média de galactose para moléculas

de CTLA4-Ig de cerca de 11 a cerca de 13;

(b) uma proporção molar média de ácido siálico para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 5,5 a cerca de 9,5; e

(c) um teor de espécies de elevado peso molecular de CTLA4-Ig com uma área de menos de cerca de 5 por cento conforme determinado através de cromatografia por exclusão de tamanho e detecção espectrofotométrica.

200. Composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig caracterizada por:

10 (a) uma proporção molar média de galactose para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 11 a cerca de 13;

(b) uma proporção molar média de ácido siálico para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 5,5 a cerca de 9,5;

15 (c) um teor de espécies de elevado peso molecular de CTLA4-Ig com uma área de menos de cerca de 5 por cento conforme determinado através de cromatografia por exclusão de tamanho e detecção espectrofotométrica; e

(d) um perfil de carboidrato substancialmente o mesmo conforme aquele da figura 68.

20 201. Composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig caracterizada por:

(a) uma proporção molar média de galactose para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 11 a cerca de 13;

25 (b) uma proporção molar média de ácido siálico para moléculas de CTLA4-Ig de 5,5 a cerca de 9,5;

(c) um teor de espécies de elevado peso molecular de CTLA4-Ig com uma área de menos de cerca de 5 por cento conforme determinado através de cromatografia por exclusão de tamanho e detecção espectrofotométrica; e

30 (d) um teor de glicosilação no Domínios III, IV e V de pelo menos cerca de 29,8% a cerca de 50,1% de glicosilação N-ligada conforme determinado através de HPAEC.

202. Composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig caracterizada por:

(a) uma proporção molar média de galactose para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 11 a cerca de 13;

5 (b) uma proporção molar média de ácido siálico para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 5,5 a cerca de 9,5; e

(c) um teor de espécies de elevado peso molecular de CTLA4-Ig com uma área de menos de cerca de 5 por cento conforme determinado através de cromatografia por exclusão de tamanho e detecção espectrofotométrica.

203. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 195-202, em que as moléculas são ainda caracterizadas por:

(a) cerca de 80 % glicosilação N-ligada bi-anténaria;

(b) cerca de 14 % glicosilação N-ligada tri-anténaria; e

15 (c) cerca de 6 % glicosilação N-ligada tetra-anténaria.

204. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 195-202, em que as moléculas ainda compreendem qualquer combinação de um ou mais de:

(a) a seqüência de aminoácido de SEQ ID NO:16 (metionina na posição de aminoácido 27 e glicina na posição de aminoácido 382 de SEQ ID NO:4);

(b) a seqüência de aminoácido de SEQ ID NO:13 (metionina na posição de aminoácido 27 e lisina na posição de aminoácido 383 de SEQ ID NO:4);

25 (c) a seqüência de aminoácido de SEQ ID NO:15 (alanina na posição de aminoácido 26 e glicina na posição de aminoácido 382 de SEQ ID NO:4); e

(d) a seqüência de aminoácido de SEQ ID NO:12 (alanina na posição de aminoácido 26 e lisina na posição de aminoácido 383 de SEQ ID NO:4).

30 205. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 195-202, em que:

(a) cerca de 90% das moléculas compreendem a seqüência de aminoácido de SEQ ID NO:4 começando com a metionina no resíduo 27;

5 (b) cerca de 10% das moléculas compreendem a seqüência de aminoácido de SEQ ID NO:4 começando com a alanina no resíduo número 26;

(c) cerca de 4% das moléculas compreendem a seqüência de aminoácido de SEQ ID NO:4 terminando com a lisina no resíduo número 383; e

10 (d) cerca de 96% das moléculas compreendem a seqüência de aminoácido de SEQ ID NO:4 terminando com a glicina no resíduo número 382.

206. Composição compreendendo polipeptídeos de CTLA4-Ig, em que:

15 (a) cerca de 80 % dos polipeptídeos têm glicosilação N-ligada bi-antenária;

(b) cerca de 14 % dos polipeptídeos têm glicosilação N-ligada tri-antenária;

(c) cerca de 6 % dos polipeptídeos têm glicosilação N-ligada tetra-antenária; e

20 (d) uma proporção molar média de GlcNAc por mol de proteína de CTLA4-Ig de cerca de 24 a cerca de 28.

207. Composição compreendendo polipeptídeos de CTLA4-Ig, em que:

25 (a) cerca de 80% dos polipeptídeos têm glicosilação N-ligada bi-antenária;

(b) cerca de 14% dos polipeptídeos têm glicosilação N-ligada tri-antenária;

(c) cerca de 6% dos polipeptídeos têm glicosilação N-ligada tetra-antenária; e

30 (d) uma proporção molar média de GalNAc para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 2,7 a cerca de 3,6.

208. Composição de acordo com qualquer uma das reivindica-

ções 157-172, 195-202 ou 206-207, em que a composição é composição substancialmente purificada.

209. Composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig, em que menos de ou igual a cerca de 2,5 % das moléculas de CTLA4-Ig são oxidadas.

210. Composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig, em que menos de ou igual a cerca de 2,0 % das moléculas de CTLA4-Ig são deamidadas.

211. Composição compreendendo dímeros de moléculas de CTLA4-Ig, em que pelo menos 0,5 % dos dímeros de moléculas de CTLA4-Ig são cisteinilados.

212. Composição de acordo com a reivindicação 211, em que pelo menos 1,0% dos dímeros de moléculas de CTLA4-Ig são cisteinilados.

213. População de moléculas de CTLA4-Ig, em que a população exibe um perfil de espectrometria de massa substancialmente o mesmo conforme a figura 49.

214. População de moléculas de CTLA4-Ig, em que a população exibe um perfil de eletroforese capilar substancialmente o mesmo conforme a figura 48.

215. Composição de CTLA4-Ig obtida através de qualquer método de acordo com as reivindicações 1-55.

216. Composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig, em que a composição é caracterizada por:

(a) uma proporção molar média de GlcNAc para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 15 a cerca de 35;

(b) uma proporção molar média de GalNAc para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 1,7 a cerca de 3,6;

(c) uma proporção molar média de galactose para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 8 a cerca de 17;

(d) uma proporção molar média de fucose para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 3,5 a cerca de 8,3;

(e) uma proporção molar média de manose para moléculas de

CTLA4-Ig de cerca de 7,2 a cerca de 22;

(f) uma proporção molar média de ácido siálico para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 6 a cerca de 12;

(g) um pI conforme determinado a partir de visualização sobre um gel de focalização isoelétrica em uma faixa de cerca de $2,4 \pm 0,2$ a cerca de $5,0 \pm 0,2$;

(h) MCP-1 de menos do que ou igual a 3 ppm;

(i) uma área de menos de 2,5 por cento de espécies de elevado peso molecular conforme determinado através de cromatografia por exclusão de tamanho e detecção espectrofotométrica;

(j) uma área de menos de 0,5 por cento de monômeros conforme determinado através de cromatografia por exclusão de tamanho e detecção espectrofotométrica;

(k) polipeptídeos de CTLA4-Ig tendo uma seqüência de aminoácido pelo menos 95% idêntica a qualquer uma de SEQ ID NOS:5-10;

(l) moléculas de CTLA4-Ig capazes de se ligar à CD80 e CD86.

217. Composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig, em que a população de moléculas é caracterizada por:

(a) uma proporção molar média de GlcNAc para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 15 a cerca de 35;

(b) uma proporção molar média de GalNAc para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 1,7 a cerca de 3,6;

(c) uma proporção molar média de galactose para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 8 a cerca de 17;

(d) uma proporção molar média de fucose para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 3,5 a cerca de 8,3;

(e) uma proporção molar média de manose para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 7,2 a cerca de 22;

(f) uma proporção molar média de ácido siálico para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 6 a cerca de 12;

(g) um pI conforme determinado a partir de visualização sobre

um gel de focalização isoeletrica em uma faixa de cerca de $3,4 \pm 0,2$ a cerca de $5,0 \pm 0,2$;

(h) MCP-1 de menos do que ou igual a 5 ppm;

5 (i) uma área de menos de 2,5 por cento de espécies de elevado peso molecular conforme determinado através de cromatografia por exclusão de tamanho e detecção espectrofotométrica;

(j) uma área de menos de 0,5 por cento de monômeros conforme determinado através de cromatografia por exclusão de tamanho e detecção espectrofotométrica;

10 (k) polipeptídeos de CTLA4-Ig tendo uma seqüência de aminoácido pelo menos 95% idêntica a qualquer uma de SEQ ID NOS:5-10;

(l) moléculas de CTLA4-Ig capaz de se ligar à CD80 e CD86; ou equivalentes farmacêuticos da mesma.

15 218. Composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig, em que a população de moléculas é caracterizada por:

(a) uma proporção molar média de GlcNAc para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 24 a cerca de 28;

(b) uma proporção molar média de GalNAc para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 2,7 a cerca de 3,6;

20 (c) uma proporção molar média de galactose para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 11 a cerca de 13;

(d) uma proporção molar média de fucose para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 6,4 a cerca de 7,0;

25 (e) uma proporção molar média de manose para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 14 a cerca de 16;

(f) uma proporção molar média de ácido siálico para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 5,5 a cerca de 9,5;

30 (g) um pI conforme determinado a partir de visualização sobre um gel de focalização isoeletrica em uma faixa de cerca de $2,4 \pm 0,2$ a cerca de $5,2 \pm 0,2$;

(h) MCP-1 de menos do que ou igual a 5 ppm;

(i) uma área de menos de 5 por cento de espécies de elevado

peso molecular conforme determinado através de cromatografia por exclusão de tamanho e detecção espectrofotométrica;

(j) uma área de menos de 1 por cento de monômeros conforme determinado através de cromatografia por exclusão de tamanho e detecção espectrofotométrica;

(k) polipeptídeos de CTLA4-Ig tendo uma seqüência de aminoácido pelo menos 95% idêntica a qualquer uma de SEQ ID NOS:11-16;

(l) moléculas de CTLA4-Ig capaz de se ligar à CD80 e CD86.

219. Composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig, em que a população de moléculas é caracterizada por:

(a) uma proporção molar média de GlcNAc para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 24 a cerca de 28;

(b) uma proporção molar média de GalNAc para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 2,7 a cerca de 3,6;

(c) uma proporção molar média de galactose para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 11 a cerca de 13;

(d) uma proporção molar média de fucose para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 6,4 a cerca de 7,0;

(e) uma proporção molar média de manose para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 14 a cerca de 16;

(f) uma proporção molar média de ácido siálico para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 5,5 a cerca de 9,5;

(g) um pI conforme determinado a partir de visualização sobre um gel de focalização isoeletrica em uma faixa de cerca de $3,4 \pm 0,2$ a cerca de $5,2 \pm 0,2$;

(h) MCP-1 de menos do que ou igual a 5 ppm;

(i) uma área de menos de 5 por cento de espécies de elevado peso molecular conforme determinado através de cromatografia por exclusão de tamanho e detecção espectrofotométrica;

(j) uma área de menos de 1 por cento de monômeros conforme determinado através de cromatografia por exclusão de tamanho e detecção espectrofotométrica;

(k) polipeptídeos de CTLA4-Ig tendo uma seqüência de aminoácido pelo menos 95% idêntica a qualquer uma de SEQ ID NOS:11-16;

(l) moléculas de CTLA4-Ig capaz de se ligar à CD80 e CD86; ou equivalentes farmacêuticos da mesma.

5 220. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 216-219 ainda compreendendo um veículo farmacêuticamente aceitável.

10 221. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 216-219, ainda compreendendo uma quantidade de monohidrato de maltose.

222. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 216-219, ainda compreendendo um diluente, adjuvante ou veículo farmacêuticamente aceitável.

15 223. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 216-219, ainda compreendendo maltose, monohidrato de fosfato de sódio monobásico, cloreto de sódio, hidróxido de sódio e água estéril.

20 224. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 216-219, ainda compreendendo sacarose, poloxâmero, monohidrato de fosfato de sódio monobásico, fosfato de sódio dibásico anídrico, cloreto de sódio, hidróxido de sódio e água estéril.

25 225. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 216-219, ainda compreendendo sacarose, monohidrato de fosfato de sódio monobásico, cloreto de sódio, hidróxido de sódio, ácido clorídrico e água estéril.

226. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 216-219, em que a composição é liofilizada.

30 227. Composição liofilizada compreendendo uma quantidade eficaz da composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 216-219, maltose, monohidrato de fosfato de sódio monobásico, cloreto de sódio, hidróxido de sódio e ácido clorídrico.

228. Composição liofilizada compreendendo uma quantidade eficaz da composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 216-

219, sacarose, monohidrato de fosfato de sódio monobásico, cloreto de sódio, hidróxido de sódio e ácido clorídrico.

229. Composição liofilizada de moléculas de CTLA4-Ig compreendendo uma área de pelo menos 95 por cento de dímeros de CTLA4-Ig e
5 uma área de não mais do que 5 por cento de espécies de elevado peso molecular de CTLA4-Ig conforme determinado através de cromatografia por exclusão de tamanho e detecção espectrofotométrica.

230. Composição de acordo com a reivindicação 229, em que a composição compreende uma área de pelo menos 98 por cento de dímeros
10 de CTLA4-Ig e uma área de não mais do que 2 por cento de espécies de elevado peso molecular de CTLA4-Ig conforme determinado através de cromatografia por exclusão de tamanho e detecção espectrofotométrica.

231. Composição de acordo com a reivindicação 229, em que a composição compreende uma área de pelo menos 99 por cento de dímero
15 de CTLA4-Ig e uma área de não mais do que 1 por cento de espécies de elevado peso molecular de CTLA4-Ig conforme determinado através de cromatografia por exclusão de tamanho e detecção espectrofotométrica.

232. Composição de proteína de CTLA4-Ig liofilizada de acordo com a reivindicação 229, em que a composição compreende pelo menos 8,0
20 moles de ácido siálico por mol de proteína de CTLA4-Ig.

233. Composição de CTLA4-Ig liofilizada de acordo com a reivindicação 229, em que a composição compreende cerca de 15,7 a cerca de
31 moles de GlcNAc por mol de proteína de CTLA4-Ig.

234. Composição de CTLA4-Ig liofilizada de acordo com a reivindicação 229, em que a composição compreende cerca de 1,6 a cerca de
25 3,2 moles de GalNAc por mol de proteína de CTLA4-Ig.

235. Composição de CTLA4-Ig liofilizada de acordo com a reivindicação 229, em que a composição compreende cerca de 9,3 a cerca de
15,5 moles de galactose por mol de proteína de CTLA4-Ig.

236. Composição de CTLA4-Ig liofilizada de acordo com a reivindicação 229, em que a composição compreende cerca de 3,6 a cerca de
30 7,9 moles de fucose por mol de proteína de CTLA4-Ig.

237. Composição de CTLA4-Ig liofilizada de acordo com a reivindicação 229, em que a composição compreende cerca de 7,7 a cerca de 22 moles de manose por mol de proteína de CTLA4-Ig.

5 238. Composição de proteína de CTLA4-Ig liofilizada de acordo com a reivindicação 229, em que a composição compreende pelo menos 5,0 moles de ácido siálico por mol de proteína de CTLA4-Ig.

239. Composição de CTLA4-Ig liofilizada de acordo com a reivindicação 229, em que a composição compreende cerca de 24 a cerca de 28 moles de GlcNAc por mol de proteína de CTLA4-Ig.

10 240. Composição de CTLA4-Ig liofilizada de acordo com a reivindicação 229, em que a composição compreende cerca de 2,7 a cerca de 3,6 moles de GalNAc por mol de proteína de CTLA4-Ig.

241. Composição de CTLA4-Ig liofilizada de acordo com a reivindicação 229, em que a composição compreende cerca de 11 a cerca de 15 13 moles de galactose por mol de proteína de CTLA4-Ig.

242. Composição de CTLA4-Ig liofilizada de acordo com a reivindicação 229, em que a composição compreende cerca de 6,4 a cerca de 7,0 moles de fucose por mol de proteína de CTLA4-Ig.

20 243. Composição de CTLA4-Ig liofilizada de acordo com a reivindicação 229, em que a composição compreende cerca de 14 a cerca de 16 moles de manose por mol de proteína de CTLA4-Ig.

244. Kit farmacêutico compreendendo: (a) um recipiente contendo uma composição de CTLA4-Ig liofilizada de acordo com a reivindicação 229; e (b) instruções para reconstituição da composição de CTLA4-Ig liofilizada em solução para injeção. 25

245. Método para inibição de proliferação de células T ou ativação de células T, o método compreendendo contato de uma célula T com uma quantidade eficaz da composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 56-58, 60-127, 129-137 e 139-244.

30 246. Método para inibição de uma resposta imune em um indivíduo, o método compreendendo administração, a um indivíduo que precisa do mesmo, de uma quantidade eficaz da composição de acordo com qual-

quer uma das reivindicações 56-58, 60-127, 129-137 e 139-244.

5 247. Método para tratamento de um distúrbio imune em um indivíduo, o método compreendendo administração, a um indivíduo que precisa do mesmo, de uma quantidade eficaz da composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 56-58, 60-127, 129-137 e 139-244.

248. Método para indução de tolerância imune a um antígeno em um indivíduo, o método compreendendo administração, a um indivíduo que precisa do mesmo, de uma quantidade eficaz da composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 56-58, 60-127, 129-137 e 139-244.

10 249. Método para tratamento de inflamação em um indivíduo, o método compreendendo administração, a um indivíduo que precisa do mesmo, de uma quantidade eficaz da composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 56-58, 60-127, 129-137 e 139-244.

15 250. Método para tratamento de artrite reumatóide compreendendo administração, a um indivíduo que precisa do mesmo, de uma quantidade eficaz da composição farmacêutica de acordo com qualquer uma das reivindicações 56-58, 60-127, 129-137 e 139-244.

20 251. Método para tratamento de doença reumática compreendendo administração, a um indivíduo que precisa do mesmo, de uma quantidade eficaz da composição farmacêutica de acordo com qualquer uma das reivindicações 56-58, 60-127, 129-137 e 139-244.

25 252. Método para tratamento de colite ulcerativa compreendendo administração, a um indivíduo que precisa do mesmo, de uma quantidade eficaz da composição farmacêutica de acordo com qualquer uma das reivindicações 56-58, 60-127, 129-137 e 139-244.

253. Método para tratamento de psoríase em um indivíduo, o método compreendendo administração, a um indivíduo que precisa do mesmo, de uma quantidade eficaz da composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 56-58, 60-127, 129-137 e 139-244.

30 254. Método para tratamento de lupus em um indivíduo, o método compreendendo administração, a um indivíduo que precisa do mesmo, de uma quantidade eficaz da composição de acordo com qualquer uma das

reivindicações 56-58, 60-127, 129-137 e 139-244.

255. Método para tratamento ou prevenção de uma alergia em um indivíduo, o método compreendendo administração, a um indivíduo que precisa do mesmo, de uma quantidade eficaz da composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 56-58, 60-127, 129-137 e 139-244.

256. Método para tratamento ou prevenção de doença enxerto versus hospedeiro em um indivíduo, o método compreendendo administração, a um indivíduo que precisa do mesmo, de uma quantidade eficaz da composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 56-58, 60-127, 129-137 e 139-244.

257. Método para tratamento ou prevenção de rejeição de um órgão transplantado em um indivíduo, o método compreendendo administração, a um indivíduo que precisa do mesmo, de uma quantidade eficaz da composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 56-58, 60-127, 129-137 e 139-244.

258. Método para tratamento ou prevenção de rejeição de tecido transplantado em um indivíduo, o método compreendendo administração, a um indivíduo que precisa do mesmo, de uma quantidade eficaz da composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 56-58, 60-127, 129-137 e 139-244.

259. Método para tratamento ou prevenção de rejeição de uma célula transplantada em um indivíduo, o método compreendendo administração, a um indivíduo que precisa do mesmo, de uma quantidade eficaz da composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 56-58, 60-127, 129-137 e 139-244.

260. Método para tratamento de esclerose múltipla em um indivíduo, o método compreendendo administração, a um indivíduo que precisa do mesmo, de uma quantidade eficaz da composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 56-58, 60-127, 129-137 e 139-244.

261. Método para tratamento de doença de Crohn em um indivíduo, o método compreendendo administração, a um indivíduo que precisa do mesmo, de uma quantidade eficaz da composição de acordo com qual-

quer uma das reivindicações 56-58, 60-127, 129-137 e 139-244.

262. Método para tratamento de diabetes do tipo I em um indivíduo, o método compreendendo administração, a um indivíduo que precisa do mesmo, de uma quantidade eficaz da composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 56-58, 60-127, 129-137 e 139-244.

263. Método para tratamento de doença inflamatória do intestino em um indivíduo, o método compreendendo administração, a um indivíduo que precisa do mesmo, de uma quantidade eficaz da composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 56-58, 60-127, 129-137 e 139-244.

264. Método para tratamento de ooforite em um indivíduo, o método compreendendo administração, a um indivíduo que precisa do mesmo, de uma quantidade eficaz da composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 56-58, 60-127, 129-137 e 139-244.

265. Método para tratamento de glomerulonefrite em um indivíduo, o método compreendendo administração, a um indivíduo que precisa do mesmo, de uma quantidade eficaz da composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 56-58, 60-127, 129-137 e 139-244.

266. Método para tratamento de encefalomielite alérgica em um indivíduo, o método compreendendo administração, a um indivíduo que precisa do mesmo, de uma quantidade eficaz da composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 56-58, 60-127, 129-137 e 139-244.

267. Método para tratamento de miastenia gravis em um indivíduo, o método compreendendo administração, a um indivíduo que precisa do mesmo, de uma quantidade eficaz da composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 56-58, 60-127, 129-137 e 139-244.

268. Uso de uma população de moléculas de CTLA4-Ig tendo uma proporção molar média de grupos ácido siálico para proteína de CTLA4-Ig de cerca de 5 a cerca de 18 na fabricação de um medicamento para o tratamento terapêutico e/ou profilático de um distúrbio imune.

269. Uso de uma população de moléculas de CTLA4-Ig tendo uma proporção molar média de grupos ácido siálico para proteína de CTLA4-Ig de cerca de 5 a cerca de 18 na fabricação de um agente anti-artrite

reumatóide em uma embalagem junto com instruções para seu uso no tratamento de artrite reumatóide.

5 270. Método para inibição de proliferação de células T ou ativação de células T, o método compreendendo contanto de uma célula T com uma quantidade eficaz da composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 56-58, 60-127, 129-137 e 139-244 em combinação com metotrexato.

10 271. Método para inibição de uma resposta imune em um indivíduo, o método compreendendo administração, a um indivíduo que precisa do mesmo, de uma quantidade eficaz da composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 56-58, 60-127, 129-137 e 139-244 em combinação com metotrexato.

15 272. Método para indução de tolerância imune a um antígeno em um indivíduo, o método compreendendo administração, a um indivíduo que precisa do mesmo, de uma quantidade eficaz da composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 56-58, 60-127, 129-137 e 139-244 em combinação com metotrexato.

20 273. Composição isolada compreendendo moléculas de CTLA4-Ig tendo uma incidência de imunogenicidade de menos do que ou igual a 7,4%.

274. Composição isolada de acordo com a reivindicação 273, em que a incidência de imunogenicidade é de cerca de 2,1% a cerca de 7,4%.

25 275. Composição isolada de acordo com a reivindicação 273, em que a incidência de imunogenicidade é menos do que ou igual a 3,7%.

276. Composição isolada de acordo com a reivindicação 273, em que a incidência de imunogenicidade é menos do que ou igual a 3,0%.

30 277. Composição isolada de acordo com a reivindicação 273, em que a incidência de imunogenicidade é de cerca de 2,8% a cerca de 3,0%.

278. Composição isolada compreendendo moléculas de CTLA4-Ig em que, após administração da composição a seres humanos, a produção

de anticorpos que se ligam à moléculas de CTLA4-Ig ocorre em uma incidência, em seres humanos, de menos do que ou igual a 7,4%.

279. Composição isolada de acordo com a reivindicação 278, em que a incidência é de cerca de 2,1% a cerca de 7,4%.

5 280. Composição isolada de acordo com a reivindicação 278, em que a incidência é menos do que ou igual a 3,7%.

281. Composição isolada de acordo com a reivindicação 278, em que a incidência é menos do que ou igual a 3,0%.

10 282. Composição isolada de acordo com a reivindicação 278, em que a incidência é de cerca de 2,8% a cerca de 3,0%.

15 283. Composição isolada compreendendo moléculas de CTLA4-Ig em que, após administração da composição a seres humanos, a produção de anticorpos que se ligam à porções de CTLA4 das moléculas de CTLA4-Ig ocorre, em seres humanos, em uma incidência de menos do que ou igual a 4,9%.

284. Composição isolada de acordo com a reivindicação 283, em que a incidência é de cerca de 0,5% a cerca de 4,9%.

285. Composição isolada de acordo com a reivindicação 283, em que a incidência é menos do que ou igual a 1,2%.

20 286. Composição isolada de acordo com a reivindicação 283, em que a incidência é menos do que ou igual a 1,0%.

287. Composição isolada de acordo com a reivindicação 283, em que a incidência é de cerca de 0,9% a cerca de 1,0%.

25 288. Composição isolada de acordo com qualquer uma das reivindicações 273 a 287, em que a incidência é medida em um ensaio imunabsorvente enzima-ligado (ELISA).

289. Composição isolada de acordo com qualquer uma das reivindicações 273 a 287, em que a incidência é medida em um ensaio de eletroquimioluminescência (ECL).

30 290. Composição isolada compreendendo moléculas de CTLA4-Ig em que, após administração da composição a seres humanos, a produção de anticorpos que neutralizam as moléculas de CTLA4-Ig ocorre em uma

incidência de menos do que ou igual a 75% dos seres humanos tendo anticorpos que se ligam à porção de CTLA4 da molécula de CTLA4-Ig.

291. Composição isolada de acordo com a reivindicação 290, em que a incidência é 40-75%.

5 292. Composição isolada de acordo com a reivindicação 291, em que a incidência é de menos do que ou igual a 40%.

293. Composição isolada de acordo com qualquer uma das reivindicações 290 a 292, em que a incidência é medida em um ensaio de repórter de luciferase baseado em célula.

10 294. Composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig caracterizada por um teor de glicosilação N-ligada no Domínio I com uma área de pelo menos cerca de 24,5 por cento a uma área de cerca de 35,2 por cento conforme determinado através de HPAEC.

15 295. Composição de acordo com a reivindicação 294, em que o Domínio I compreende três picos, em que o primeiro pico compreende uma área de cerca de 7,3 por cento, o segundo pico compreende uma área de cerca de 10,7 por cento e o terceiro pico compreende uma área de cerca de 8,8 por cento, todos conforme determinado através de HPAEC.

20 296. Composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig caracterizada por um teor de glicosilação N-ligada no Domínio II com uma área de pelo menos cerca de 26,3 por cento a uma área de cerca de 34,1 por cento conforme determinado através de HPAEC.

1 AGCTTCACCA ATG GGT GTA CTG CTC ACA CAG AGG ACG CTG
M G V L L T Q R T L
↳ Sequência sinalizadora de oncostatina M →

41 CTC AGT CTG GTC CTT GCA CTC CTG TTT CCA AGC ATG GCG
L S L V L A L L F P S M A

80 AGC ATG GCA ATG CAC GTG GCC CAG CCT GCT GTG GTA CTG
S M A M H V A Q P A V V L
↳ Dobradiça de IgG, humana →

119 GCC AGC AGC CGA GGC ATC GCC AGC TTT GTG TGT GAG TAT
A S S R G I A S F V C E Y

158 GCA TCT CCA GGC AAA GCC ACT GAG GTC CGG GTG ACA GTG
A S P G K A T E V R V T V

197 CTT CGG CAG GCT GAC AGC CAG GTG ACT GAA GTC TGT GCG
L R Q A D S Q V T E V C A

236 GCA ACC TAC ATG ATG GGG AAT GAG TTG ACC TTC CTA GAT
A T Y M M G N E L T F L D

275 GAT TCC ATC TGC ACG GGC ACC TCC AGT GGA AAT CAA GTG
D S I C T G T S S G N Q V

314 AAC CTC ACT ATC CAA GGA CTG AGG GCC ATG GAC ACG GGA
N L T I Q G L R A M D T G

353 CTC TAC ATC TGC AAG GTG GAG CTC ATG TAC CCA CCG CCA
L Y I C K V E L M Y P P P

392 TAC TAC CTG GGC ATA GGC AAC GGA ACC CAG ATT TAT GTA
Y Y L G I G N G T Q I Y V

431 ATT GAT CCA GAA CCG TGC CCA GAT TCT GAT CAG GAG CCC
I D P E P C P D S D Q E P
↳

470 AAA TCT TCT GAC AAA ACT CAC ACA TCC CCA CCG TCC CCA
K S S* D K T H T S* P P S* P
CTLA4 humana →

509 GCA CCT GAA CTC CTG GGG GGA TCG TCA GTC TTC CTC TTC
A P E L L G G S* S V F L F
↳ Domínio C₂ de IgG, humana →

548 CCC CCA AAA CCC AAG GAC ACC CTC ATG ATC TCC CGG ACC
P P K P K D T L M I S R T

FIG. 1A

587 CCT GAG GTC ACA TGC GTG GTG GTG GAC GTG AGC CAC GAA
 P E V T C V V V D V S H E
 626 GAC CCT GAG GTC AAG TTC AAC TGG TAC GTG GAC GGC GTG
 D P E V K F N W Y V D G V
 665 GAG GTG CAT AAT GCC AAG ACA AAG CCG CGG GAG GAG CAG
 E V H N A K T K P R E E Q
 704 TAC AAC AGC ACG TAC CGT GTG GTC AGC GTC CTC ACC GTC
 Y N S T Y R V V S V L T V
 743 CTG CAC CAG GAC TGG CTG AAT GGC AAG GAG TAC AAG TGC
 L H Q D W L N G K E Y K C
 782 AAG GTC TCC AAC AAA GCC CTC CCA GCC CCC ATC GAG AAA
 K V S N K A L P A P I E K
 821 ACC ATC TCC AAA GCC AAA GGG CAG CCC CGA GAA CCA CAG
 T I S K A K G Q P R E P Q
 860 GTG TAC ACC CTG CCC CCA TCC CGG GAT GAG CTG ACC AAG
 V Y T L P P S R D E L T K
 899 AAC CAG GTC AGC CTG ACC TGC CTG GTC AAA GGC TTC TAT
 N Q V S L T C L V K G F Y
 938 CCC AGC GAC ATC GCC GTG GAG TGG GAG AGC AAT GGG CAG
 P S D I A V E W E S N G Q
 977 CCG GAG AAC AAC TAC AAG ACC ACG CCT CCC GTG CTG GAC
 P E N N Y K T T P P V L D
 1016 TCC GAC GGC TCC TTC TTC CTC TAC AGC AAG CTC ACC GTG
 S D G S F F L Y S K L T V
 1055 GAC AAG AGC AGG TGG CAG CAG GGG AAC GTC TTC TCA TGC
 D K S R W Q Q G N V F S C
 1094 TCC GTG ATG CAT GAG GCT CTG CAC AAC CAC TAC ACG CAG
 S V M H E A L H N H Y T Q
 1133 AAG AGC CTC TCC CTG TCT CCG GGT AAA TGA GTGCGACG
 K S L S L S P G K -
 1172 GCCGGCAAGC CCCGCTCCCC GGGCTCTCGC GGTCGCAC GAGGATGCTT
 1222 CTAGA


 FIG. 1B

ATGGGTGTACTGCTCACACAGAGGACGCTGCTCAGTCTGGTCCTTGCACTCCTGTTTCCA -19
 M~G~V~L~L~T~Q~R~T~L~L~S~L~V~L~A~L~L~F~P~ -7
 AGCATGGCGAGCATGGCAATGCACGTGGCCCAGCCTGCTGTGGTACTGGCCAGCAGCCGA +42
 S~M~A~S~M~A~M~H~V~A~Q~P~A~V~V~L~A~S~S~R~ +14
 +1
 GGCATCGCTAGCTTTGTGTGTGAGTATGCATCTCCAGGCAAATATACTGAGGTCCGGGTG +102
 G~I~A~S~F~V~C~E~Y~A~S~P~G~K~Y~T~E~V~R~V~ +34
 ACAGTGCTTCGGCAGGCTGACAGCCAGGTGACTGAAGTCTGTGCGGCAACCTACATGATG +162
 T~V~L~R~Q~A~D~S~Q~V~T~E~V~C~A~A~T~Y~M~M~ +54
 GGAATGAGTTGACCTTCCTAGATGATTCATCTGCACGGGCACCTCCAGTGGAAATCAA +222
 G~N~E~L~T~F~L~D~D~S~I~C~T~G~T~S~S~G~N~Q~ +74
 GTGAACCTCACTATCCAAGGACTGAGGGCCATGGACACGGGACTCTACATCTGCAAGGTG +282
 V~N~L~T~I~Q~G~L~R~A~M~D~T~G~L~Y~I~C~K~V~ +94
 GAGTCATGTACCCACCGCCATACTACGAGGGCATAGGCAACGGAACCCAGATTTATGTA +342
 E~L~M~Y~P~P~P~Y~Y~E~G~I~G~N~G~T~Q~I~Y~V~ +114
 ATTGATCCAGAACCGTGCCAGATTCTGATCAGGAGCCCAAATCTTCTGACAAAACCTCAC +402
 I~D~P~E~P~C~P~D~S~D~Q~E~P~K~S~S~D~K~T~H~ +134
 ACATCCCCACCGTCCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGATCGTCAGTCTTCTCTTCCCC +462
 T~S~P~P~S~P~A~P~E~L~L~G~G~S~S~V~F~L~F~P~ +154
 CAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGTGGTG +522
 P~K~P~K~D~T~L~M~I~S~R~T~P~E~V~T~C~V~V~V~ +174
 GACGTGAGCCACGAAGACCCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTG +582
 D~V~S~H~E~D~P~E~V~K~F~N~W~Y~V~D~G~V~E~V~ +194
 CATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGC +642
 H~N~A~K~T~K~P~R~E~E~Q~Y~N~S~T~Y~R~V~V~S~ +214
 GTCCTCACCGTCTGACACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCC +702
 V~L~T~V~L~H~Q~D~W~L~N~G~K~E~Y~K~C~K~V~S~ +234
 AACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGA +762
 N~K~A~L~P~A~P~I~E~K~T~I~S~K~A~K~G~Q~P~R~ +254
 GAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGC +822
 E~P~Q~V~Y~T~L~P~P~S~R~D~E~L~T~K~N~Q~V~S~ +274
 CTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAAT +882
 L~T~C~L~V~K~G~F~Y~P~S~D~I~A~V~E~W~E~S~N~ +294
 GGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTC +942
 G~Q~P~E~N~N~Y~K~T~T~P~P~V~L~D~S~D~G~S~F~ +314
 TTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCA +1002
 F~L~Y~S~K~L~T~V~D~K~S~R~W~Q~Q~G~N~V~F~S~ +334
 TGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCT +1062
 C~S~V~M~H~E~A~L~H~N~H~Y~T~Q~K~S~L~S~L~S~ +354
 CCGGGTAAATGA
 P~G~K~*

FIG. 2

MGVLLTQRTLLSLVLALLFPSMASMA

MHVAQPAVV LASSRG IASFVCEYASPGKYTEVRVTVLRQADSQVTEVCAA	50
TYMMGNELTFLDDSICTGTSSGNQVNLTIQGLRAMDTGLYICKVELMYPP	100
PYYEGIGNGTQIYVIDPEPCCPDS DQEPKSSDKTHTSPPSPAPPELLGGSSV	150
FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK	200
PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK	250
GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN	300
YKTTTPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS	350
LSLSPGK	

Pró-sequência

FIG. 3

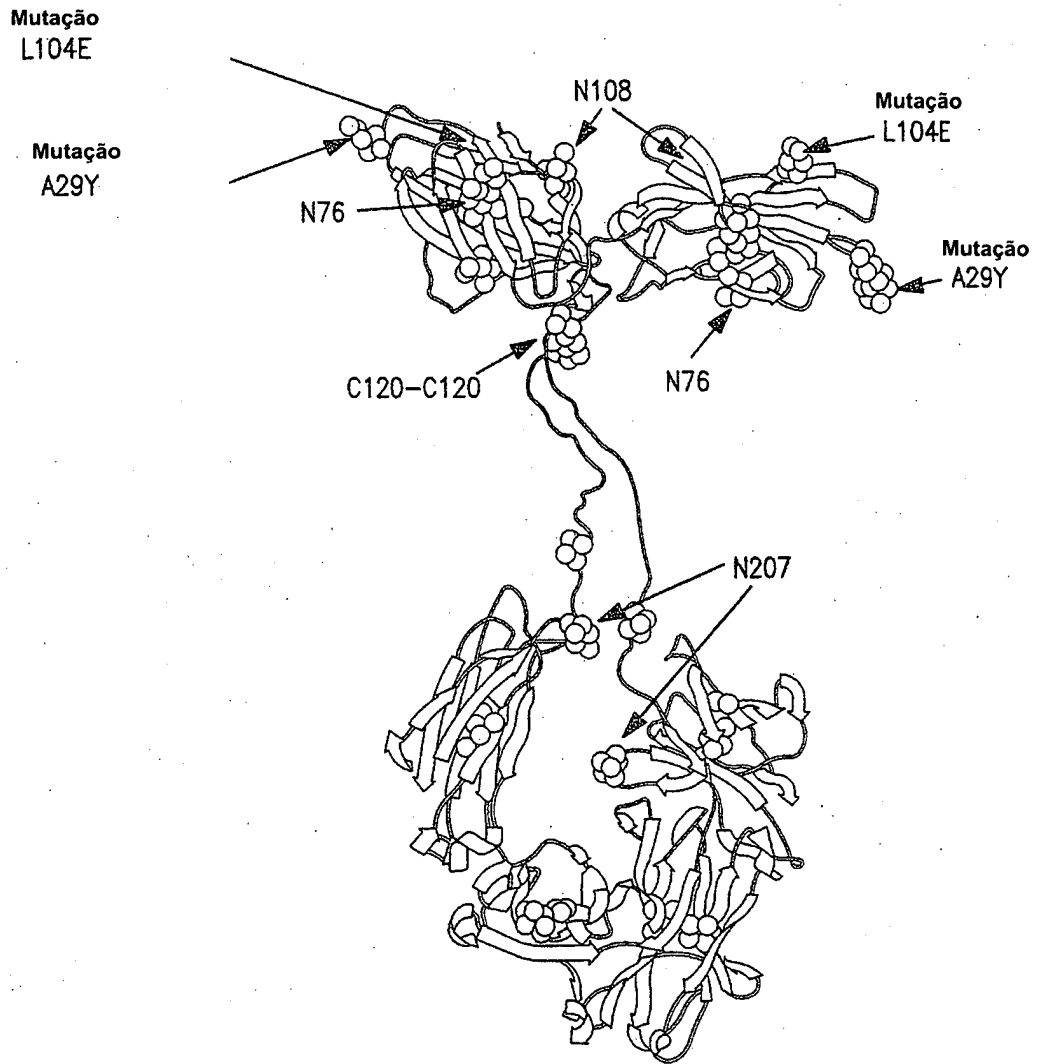


FIG. 4

MGVLLTQRTLLSLVLALLFPMASMA*
 M**HVAQPAVVLASSRGIASFVCEYASPGKYTEVRVIVLRQADSQVTEVCAA⁵⁰
 TYMMGNELTHLDDSICTGTSSGNQVNLTIQGLRAMDTGLYICKVELMYPP¹⁰⁰
 PYYEGIGNGTQIYVIDPEPCPDSDAQEPKSSDKTHTSPSPAPELLGGSSV¹⁵⁰
 FLFPPKPKDITLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK²⁰⁰
 PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK²⁵⁰
 GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN³⁰⁰
 YKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKS³⁵⁰
 LSLSPGK

 G

Chave
 Pró-sequência
 Domínio de CTLA-3 com duas substituições de aminoácido (L104E e A29Y)
 Fragmento Fc de IgG humana
 Substituição de aminoácido
 Sítios de glicosilação N-ligada
 C-120, ligação dissulfeto inter-cadeia

FIG. 5

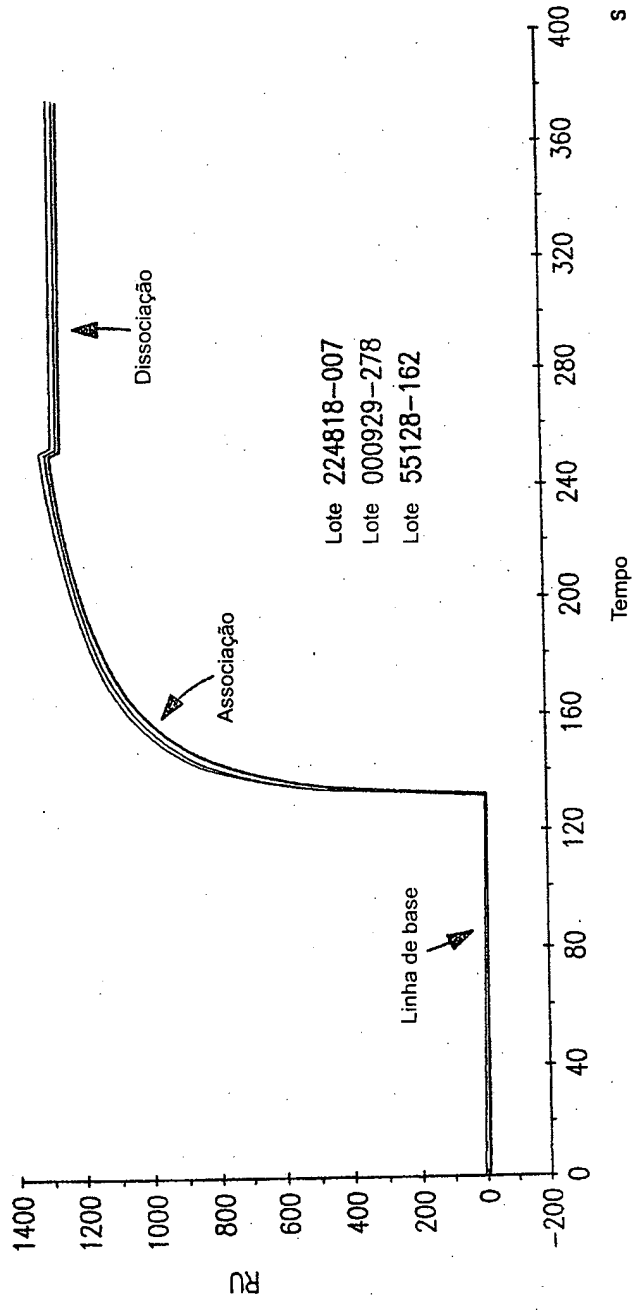


FIG. 6

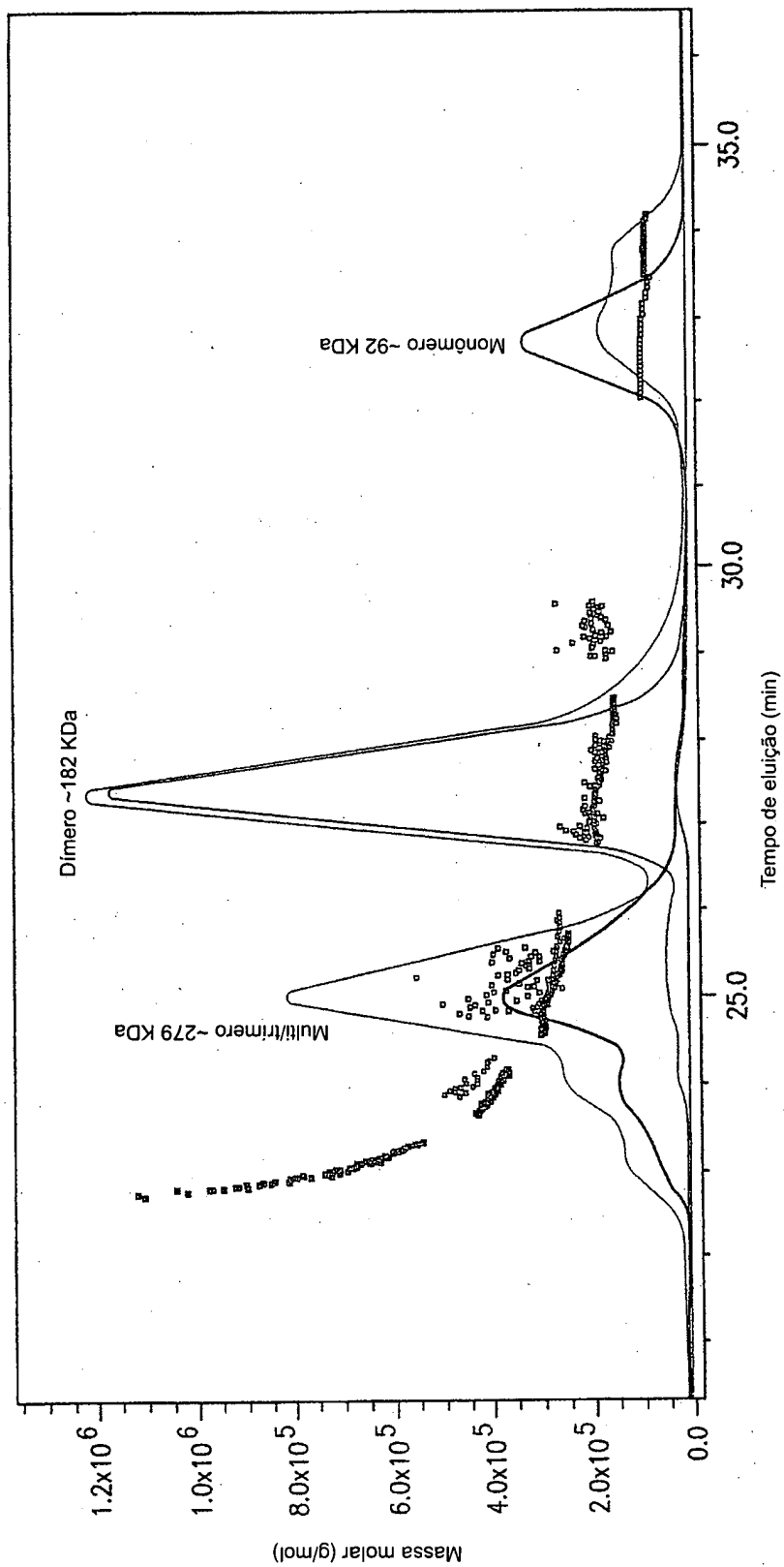


FIG. 7

PÁGINA INTENCIONALMENTE DEIXADA EM BRANCO

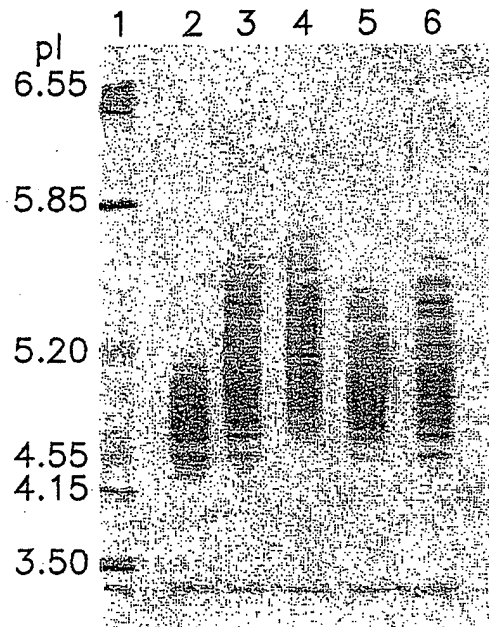


FIG. 8A

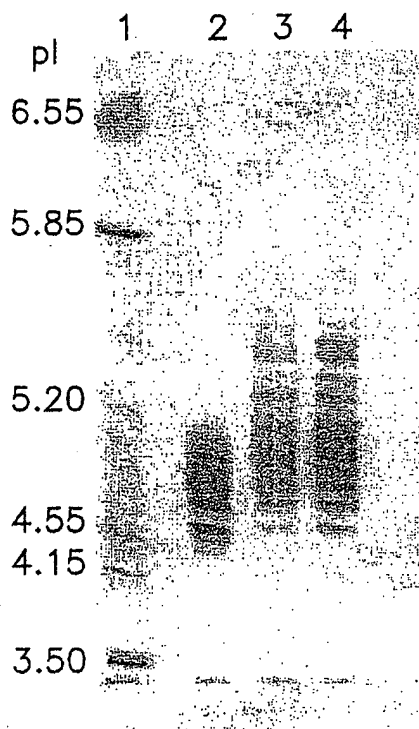


FIG. 8B

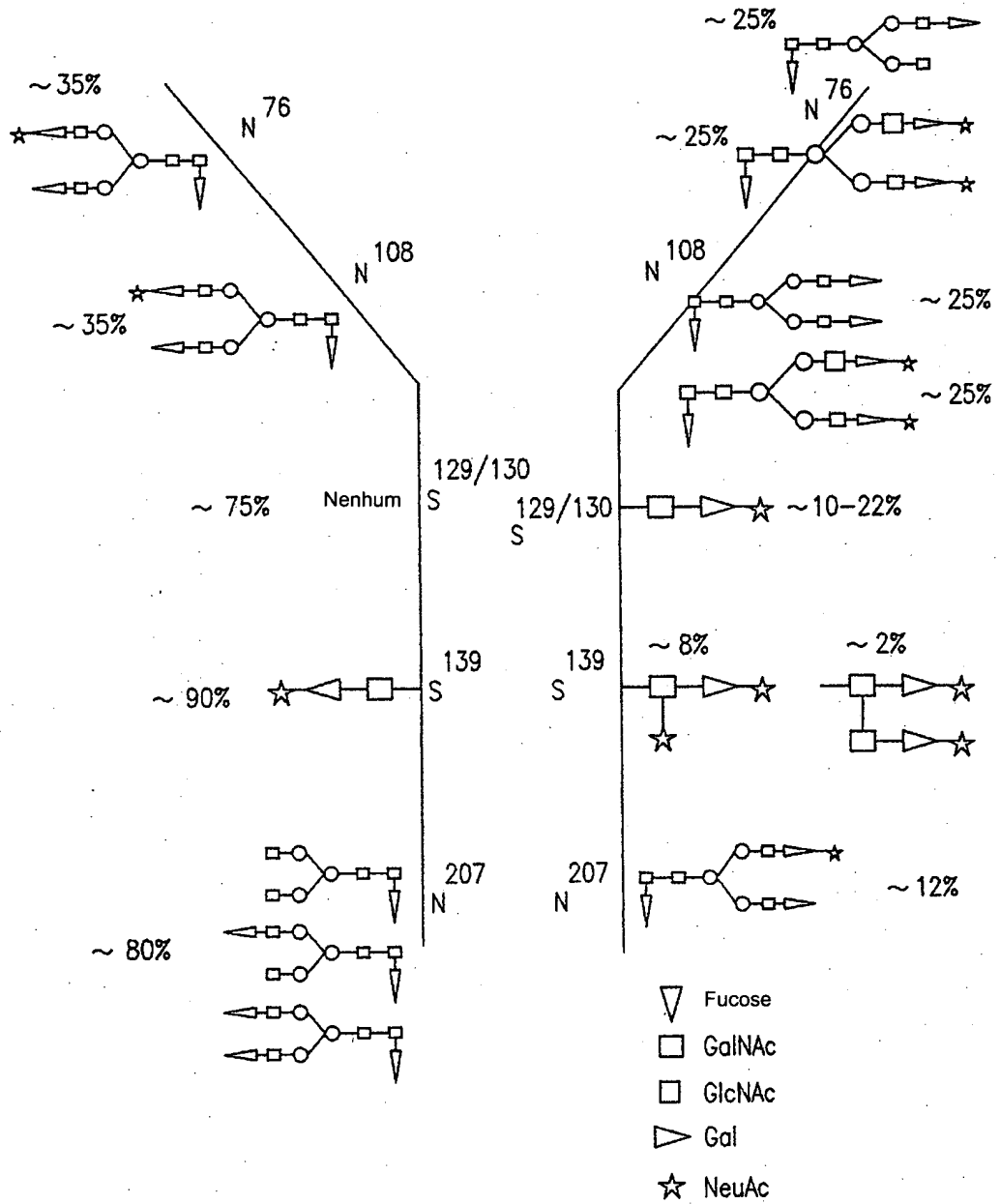


FIG. 9

PÁGINA INTENCIONALMENTE DEIXADA EM BRANCO

FIG. 10

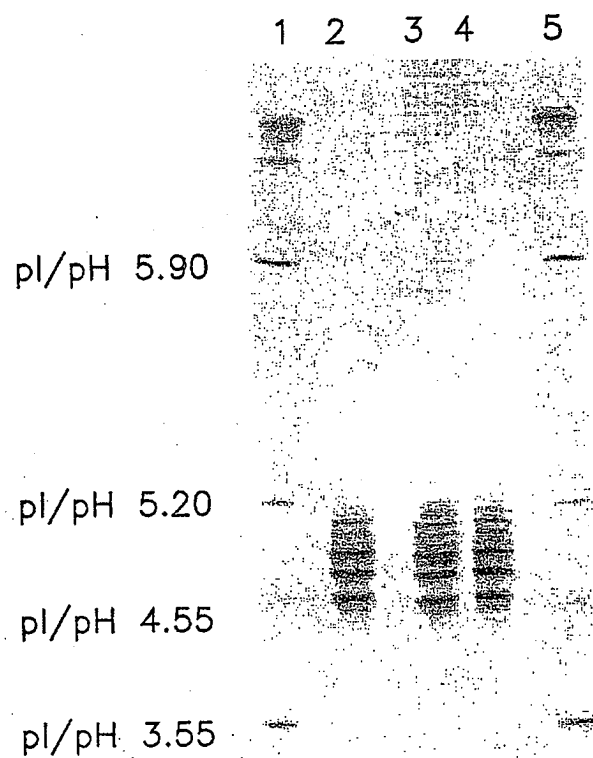


FIG. 11

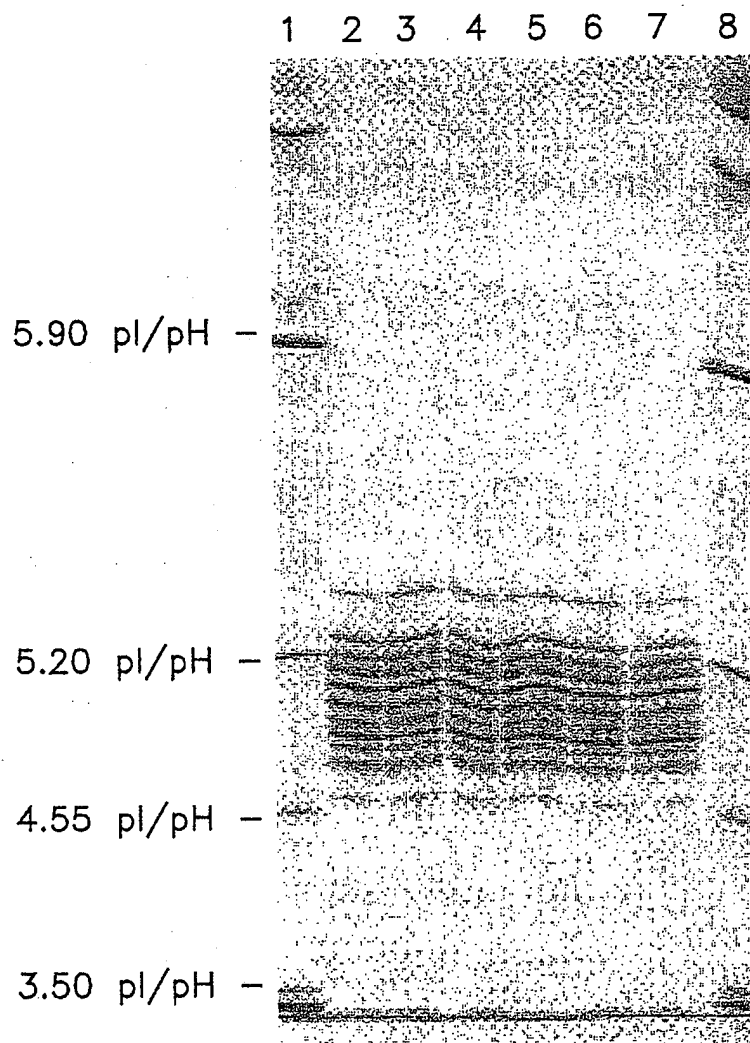


FIG. 12

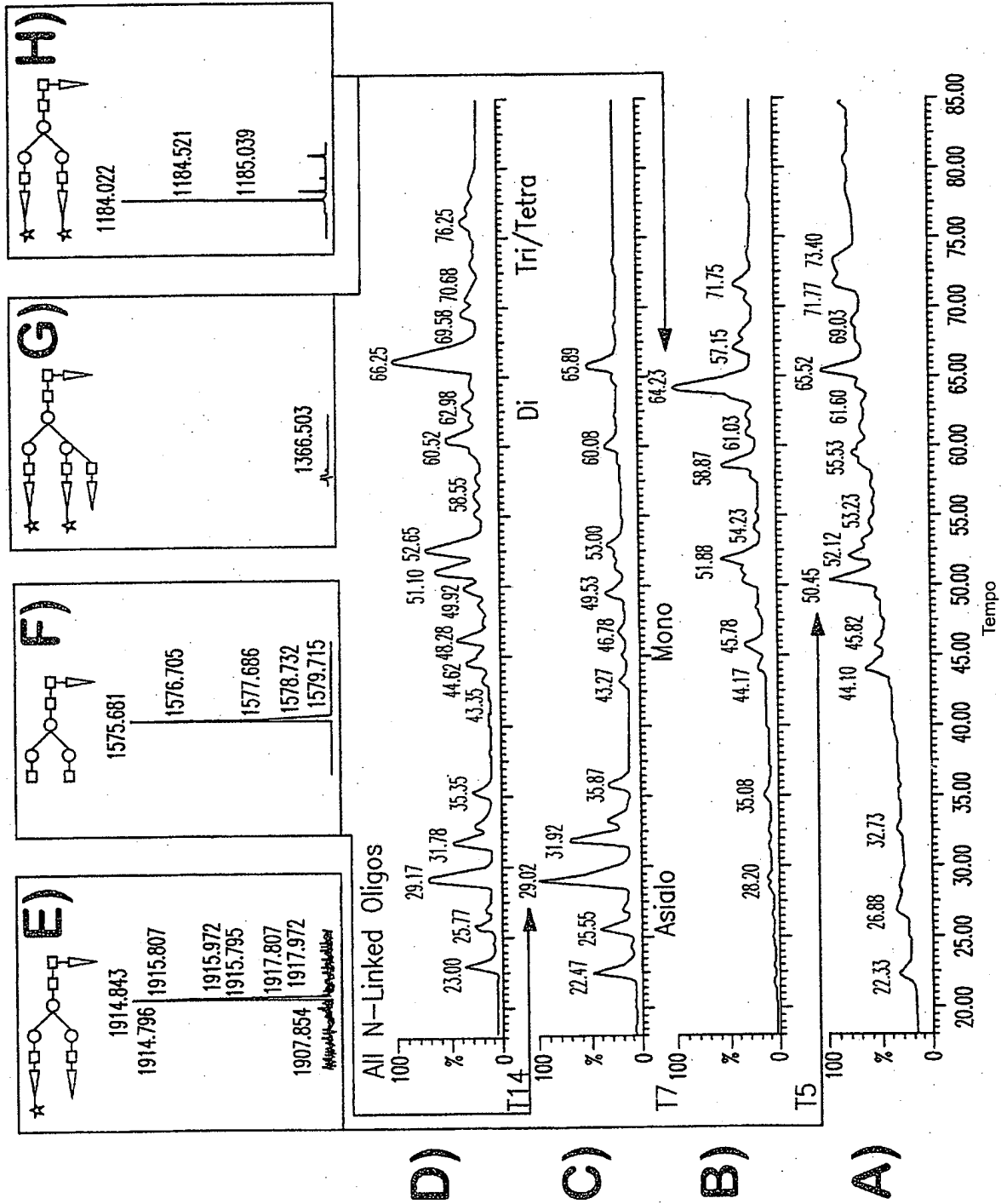


FIG. 13

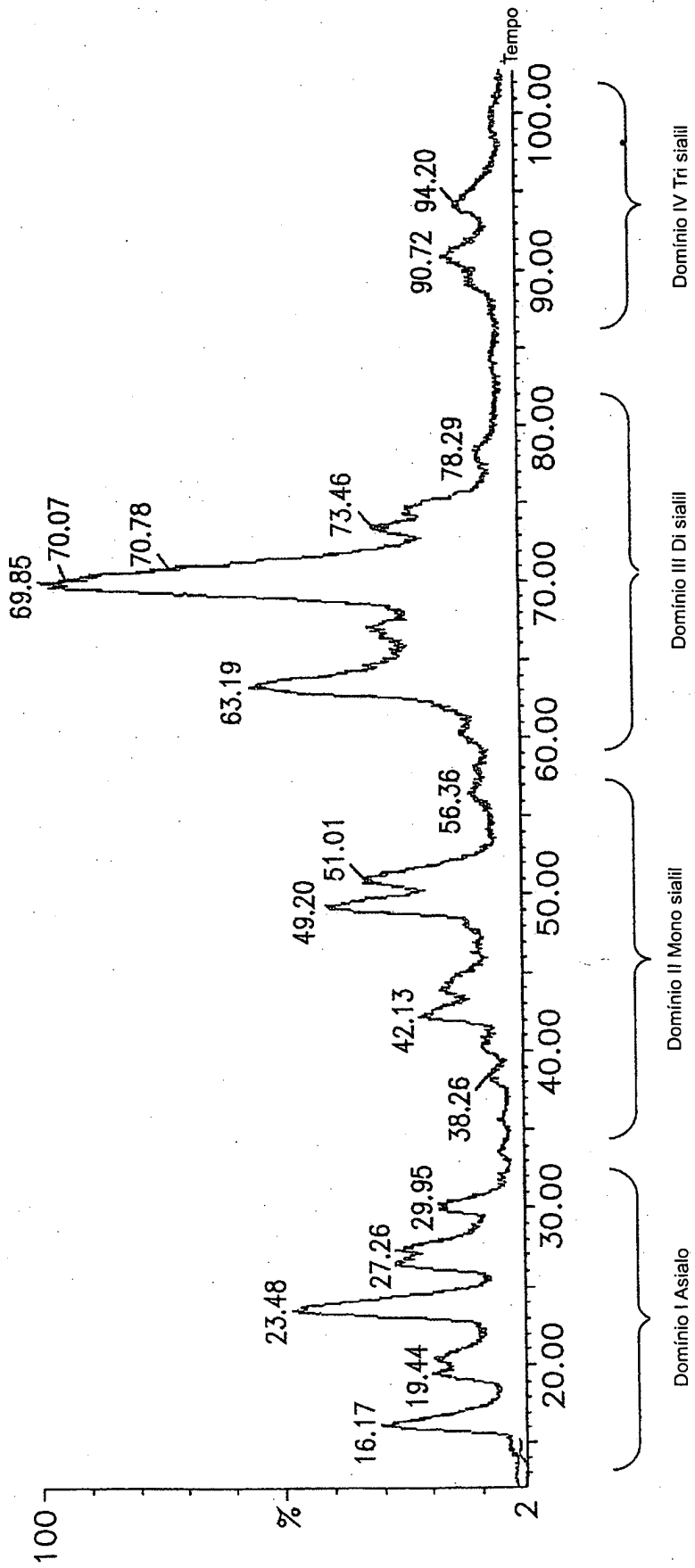


FIG. 14A

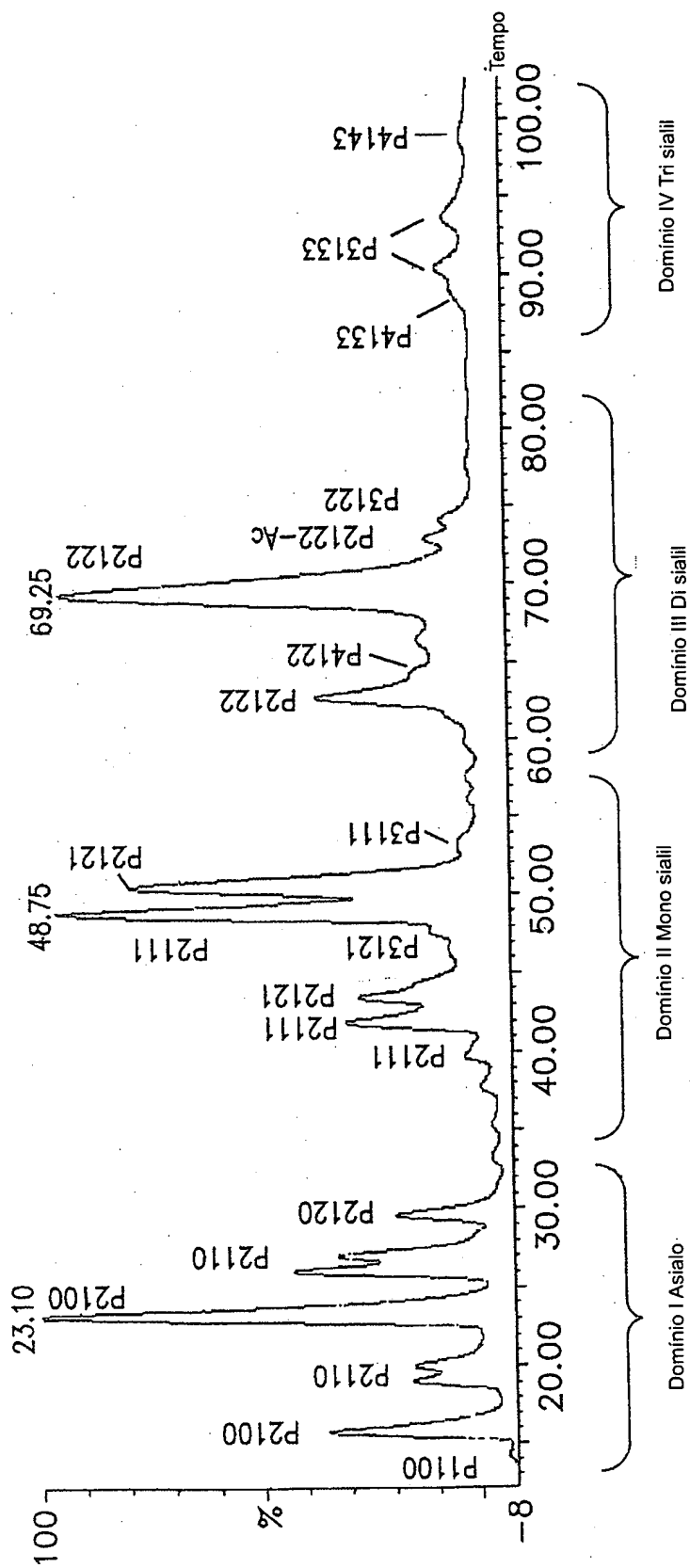


FIG. 14B

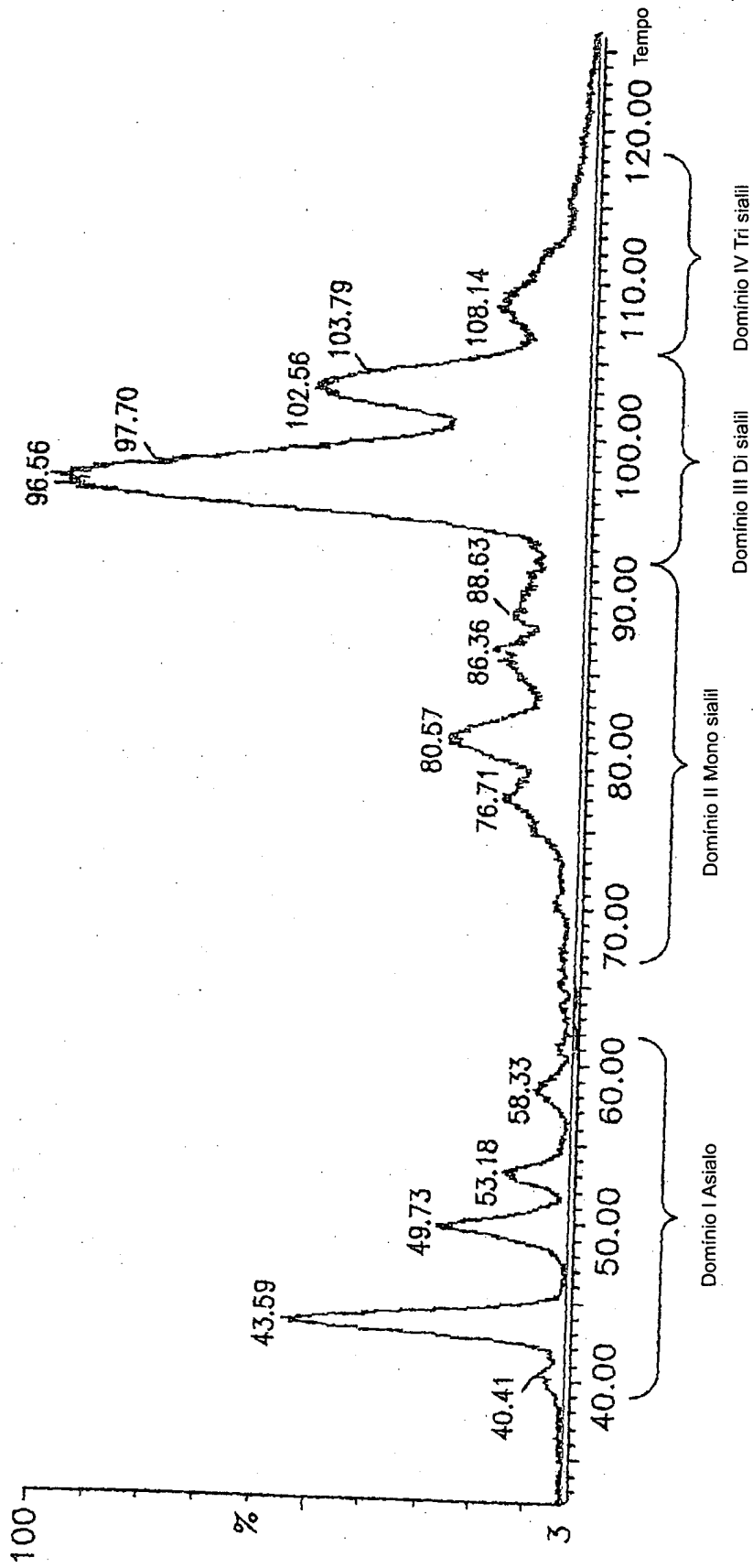


FIG. 15A

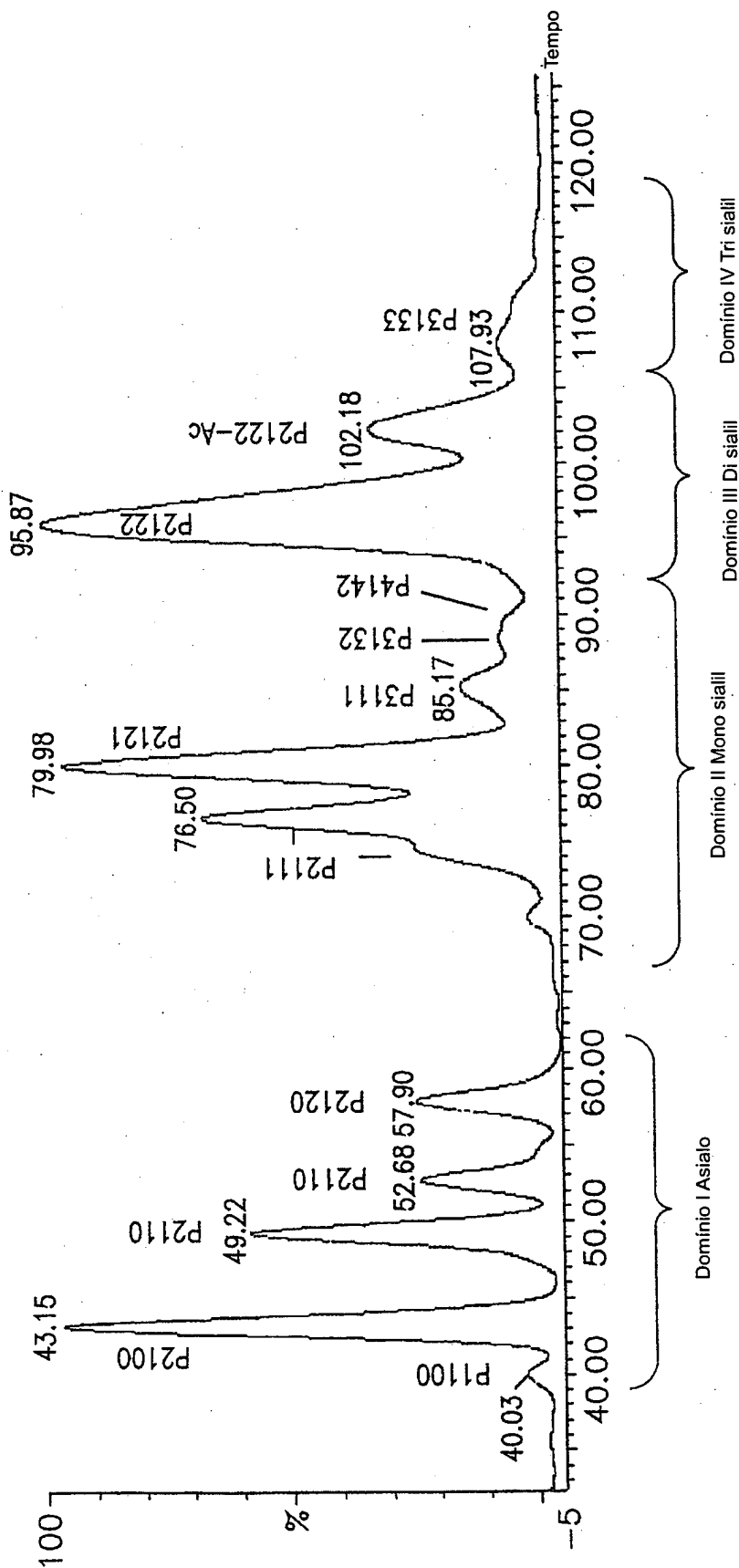
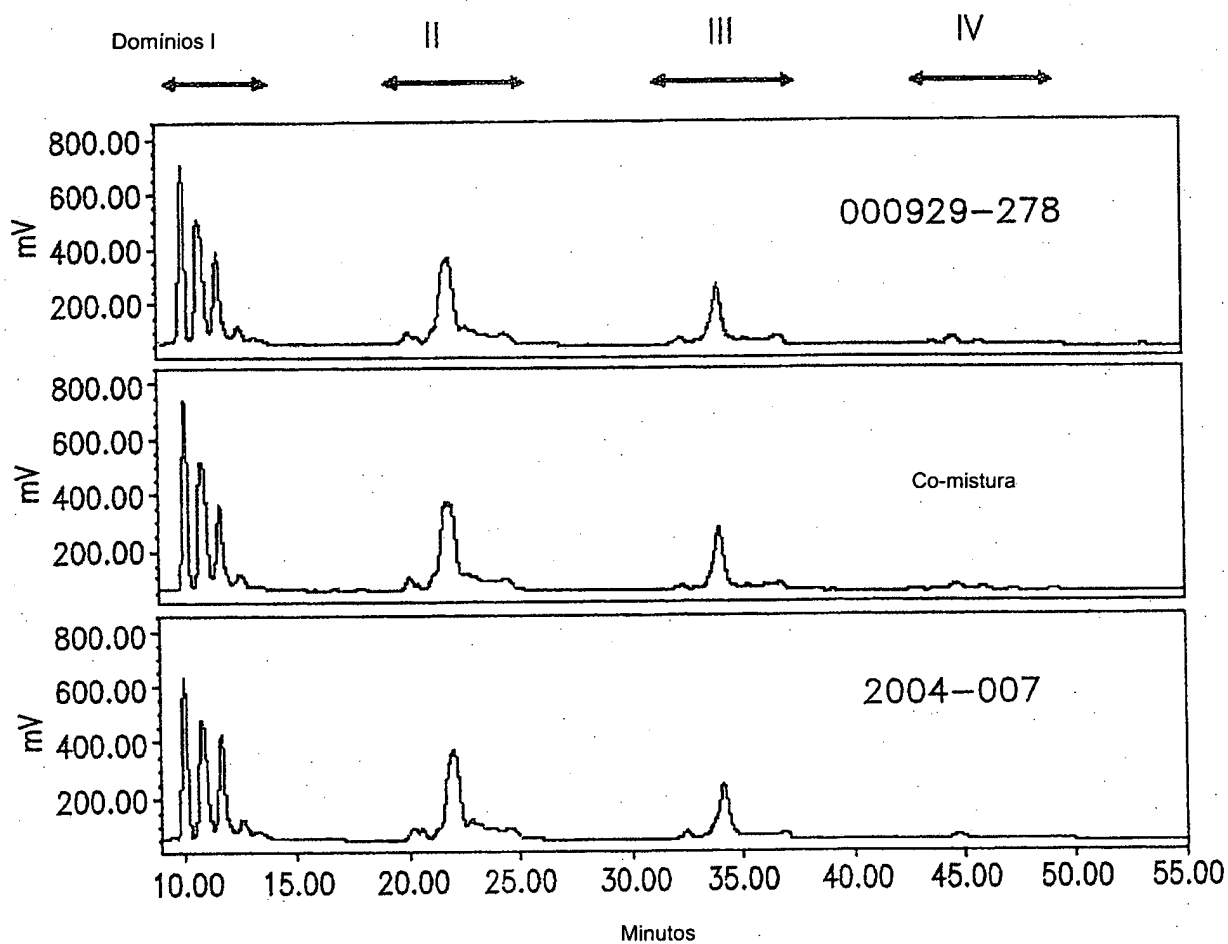


FIG. 15B



Lote	Área % domínio I	Área % domínio II	Área % domínio III	Área % domínio IV
Processo B - Lote 000929-278	45.8	34.1	17.8	2.4
Lote de co-mistura 55128-162	46.7	33.6	17.5	2.2
Processo C - Lote 224818-2004-007	47.5	33.4	17.4	1.8

FIG. 16

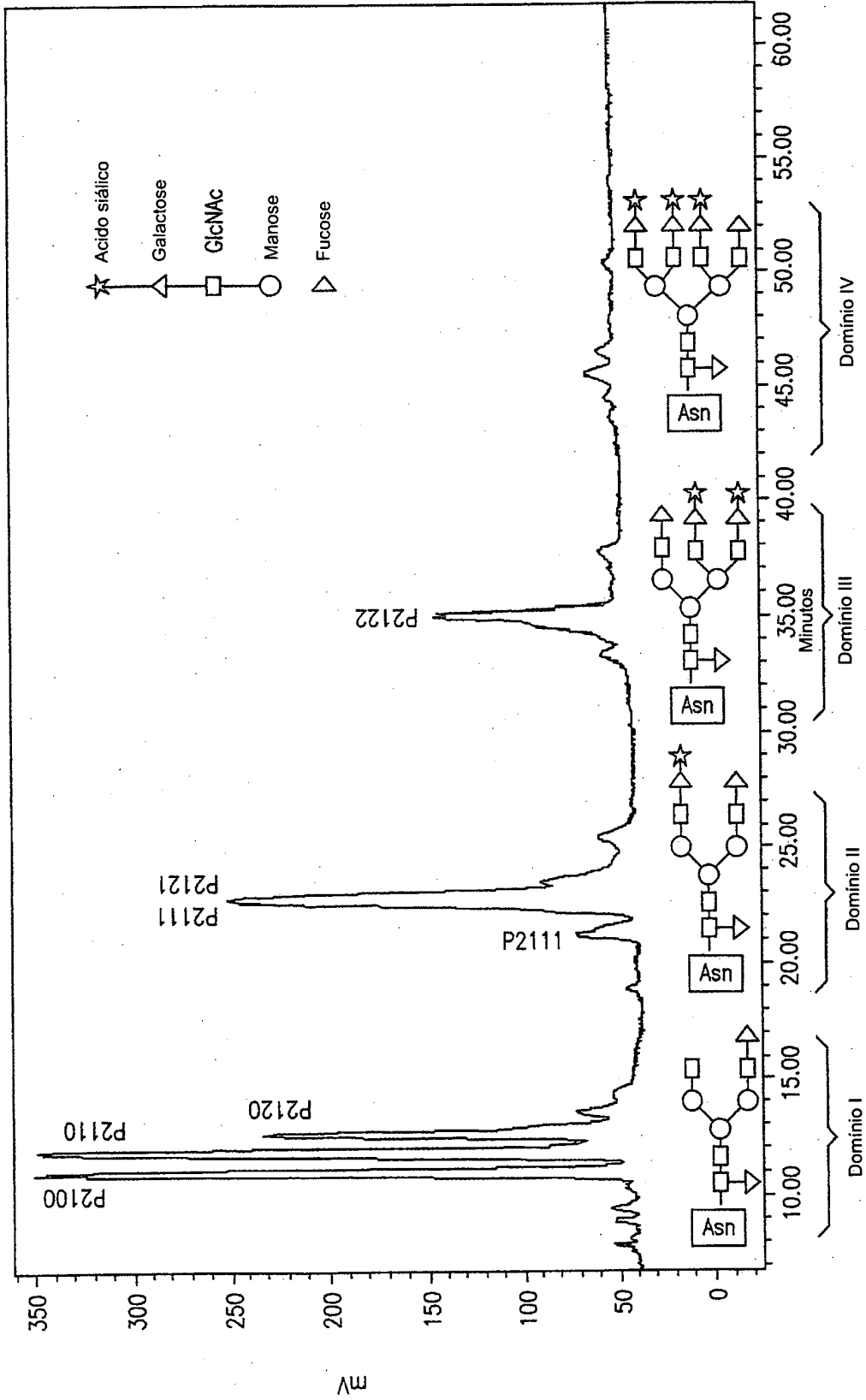


FIG. 17

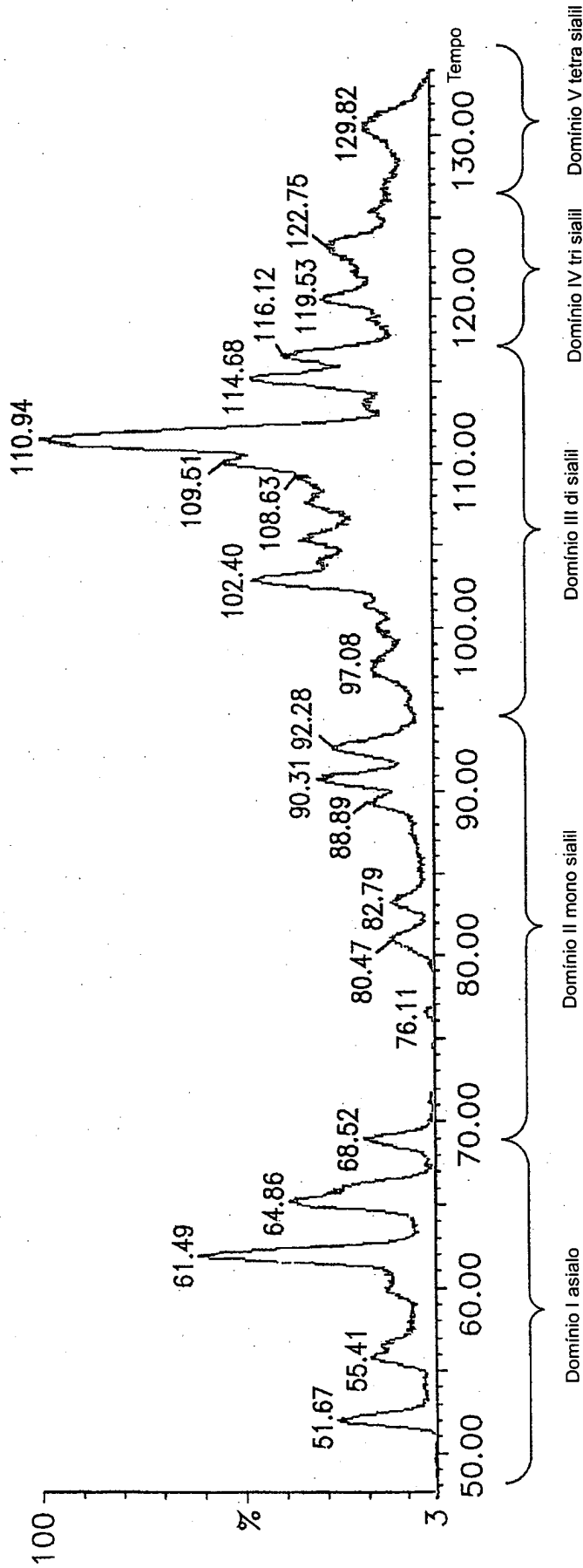


FIG. 18A

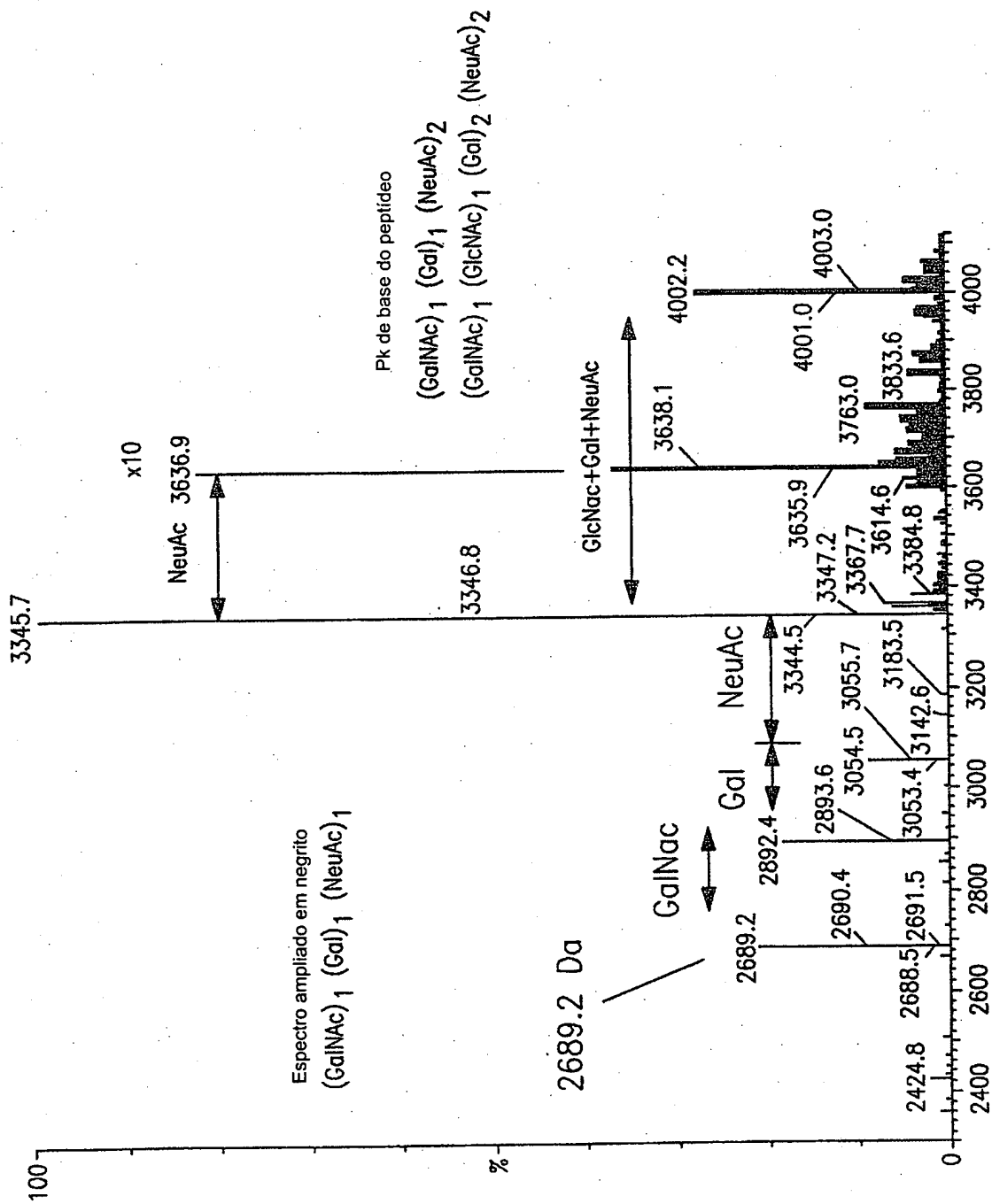


FIG. 19

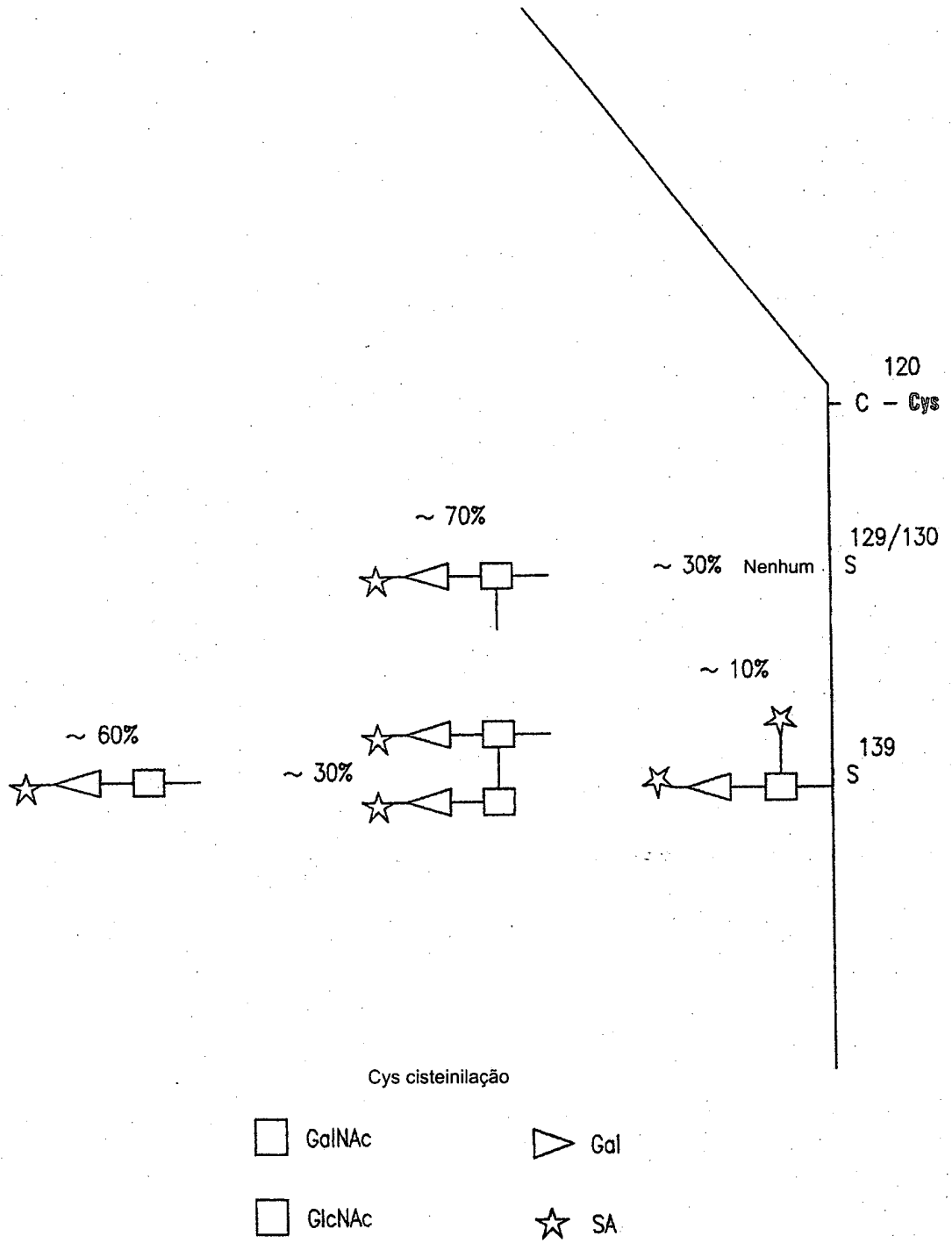


FIG. 20

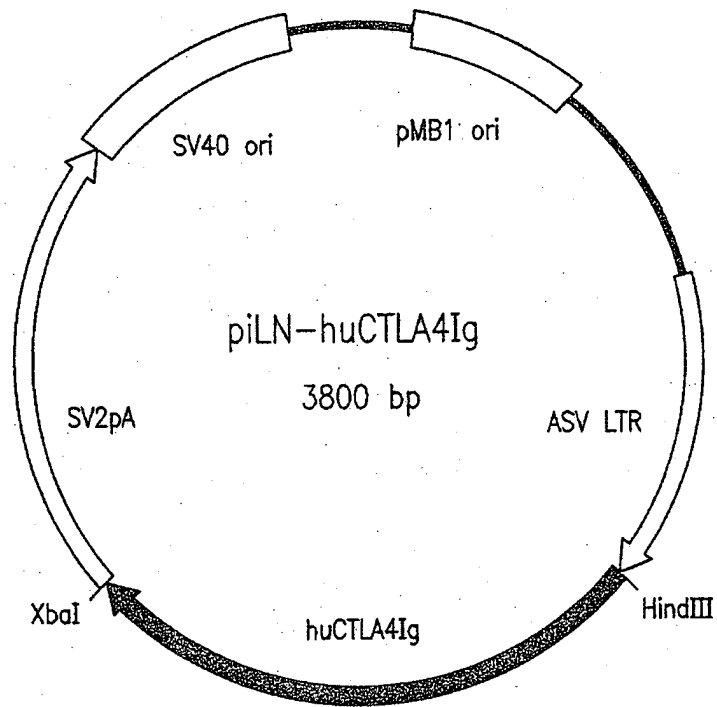


FIG. 21

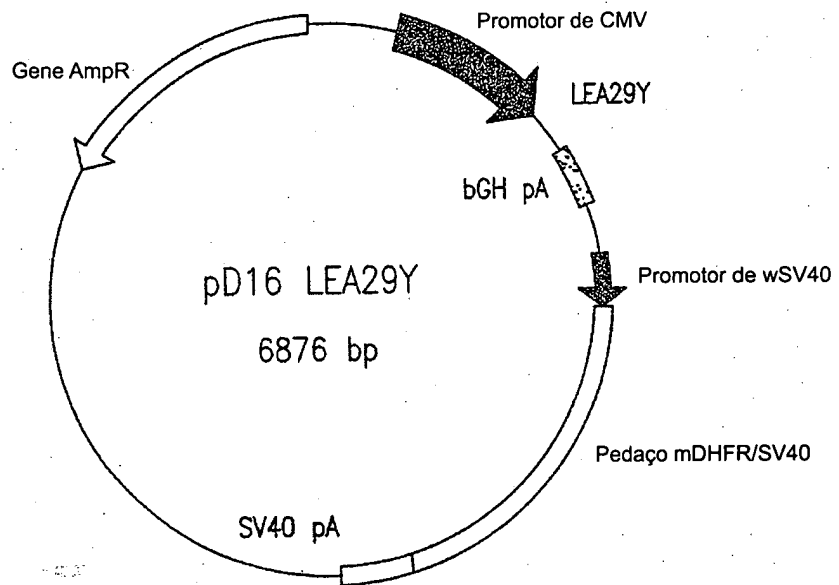


FIG. 22

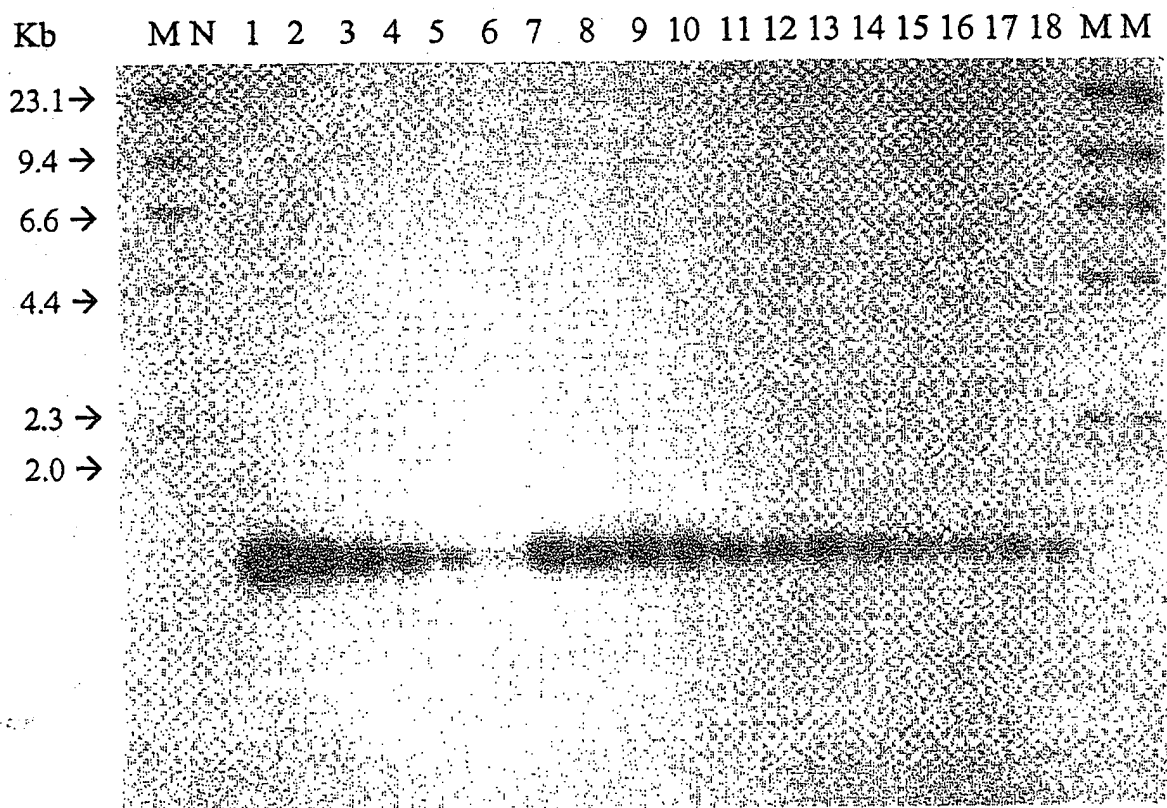


FIG. 23

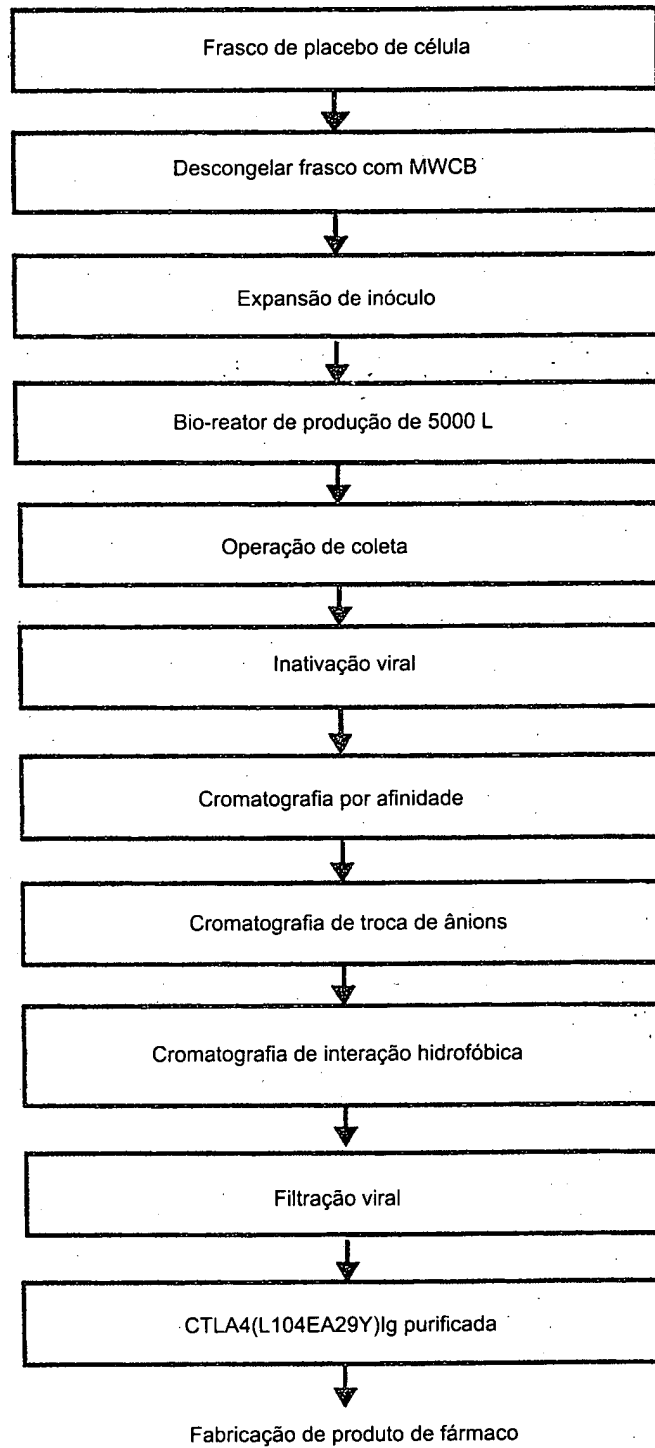


FIG. 24

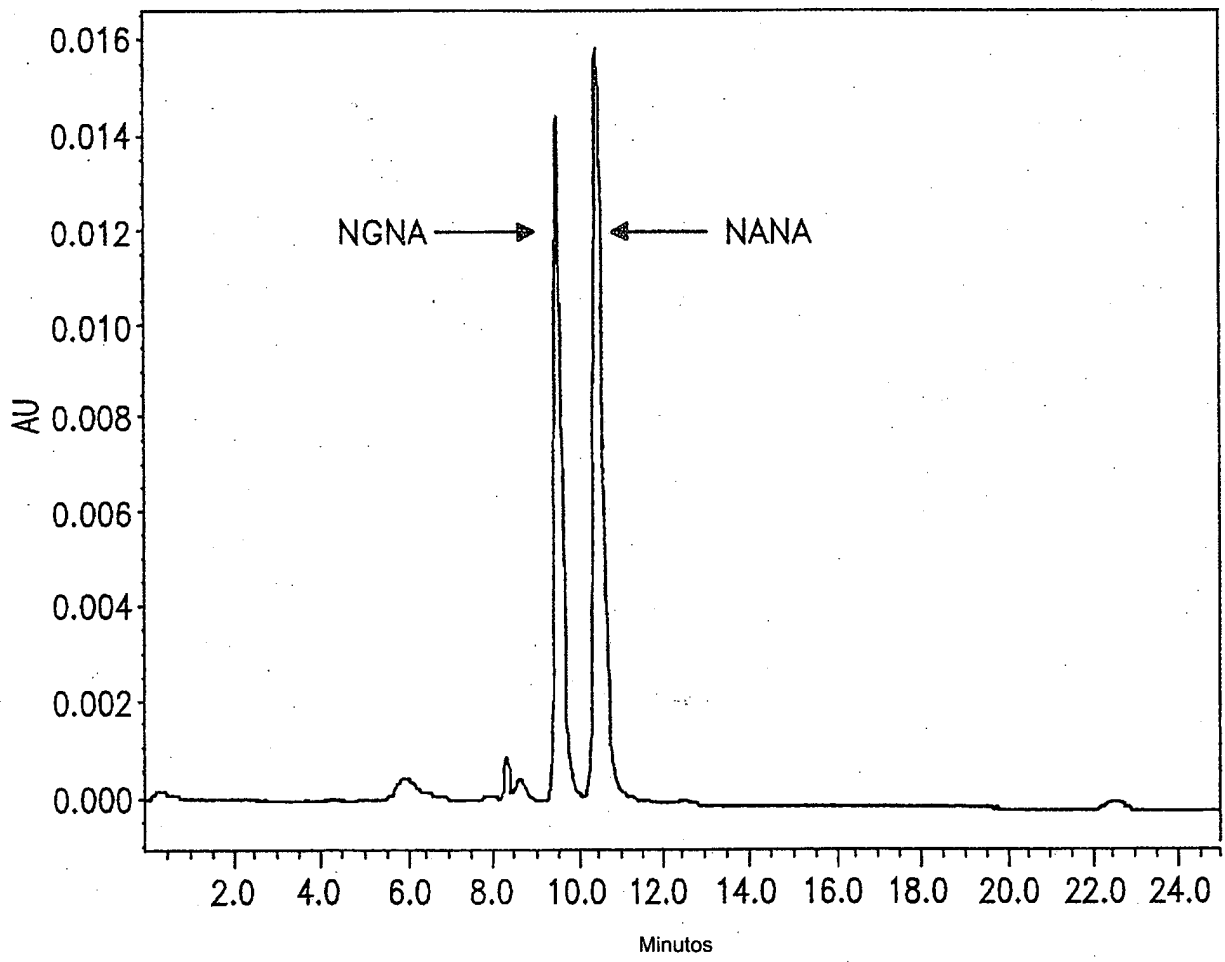


FIG. 25

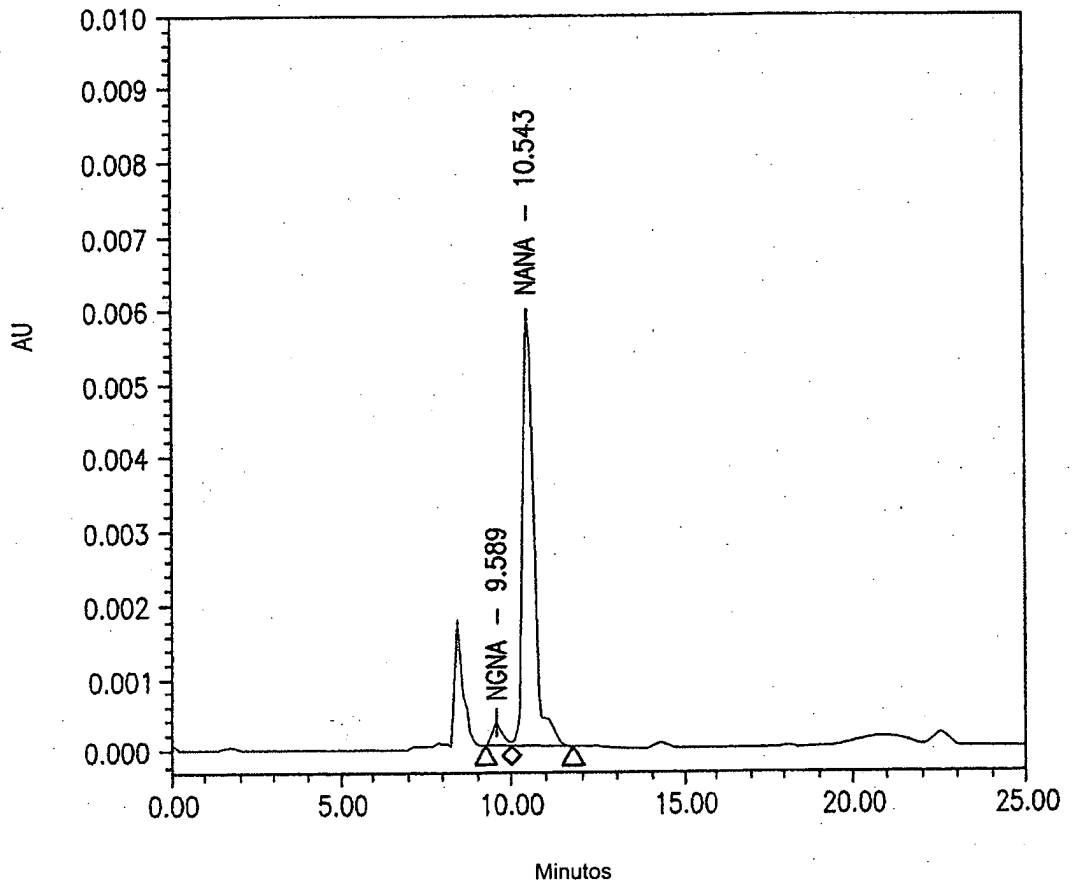


FIG. 26

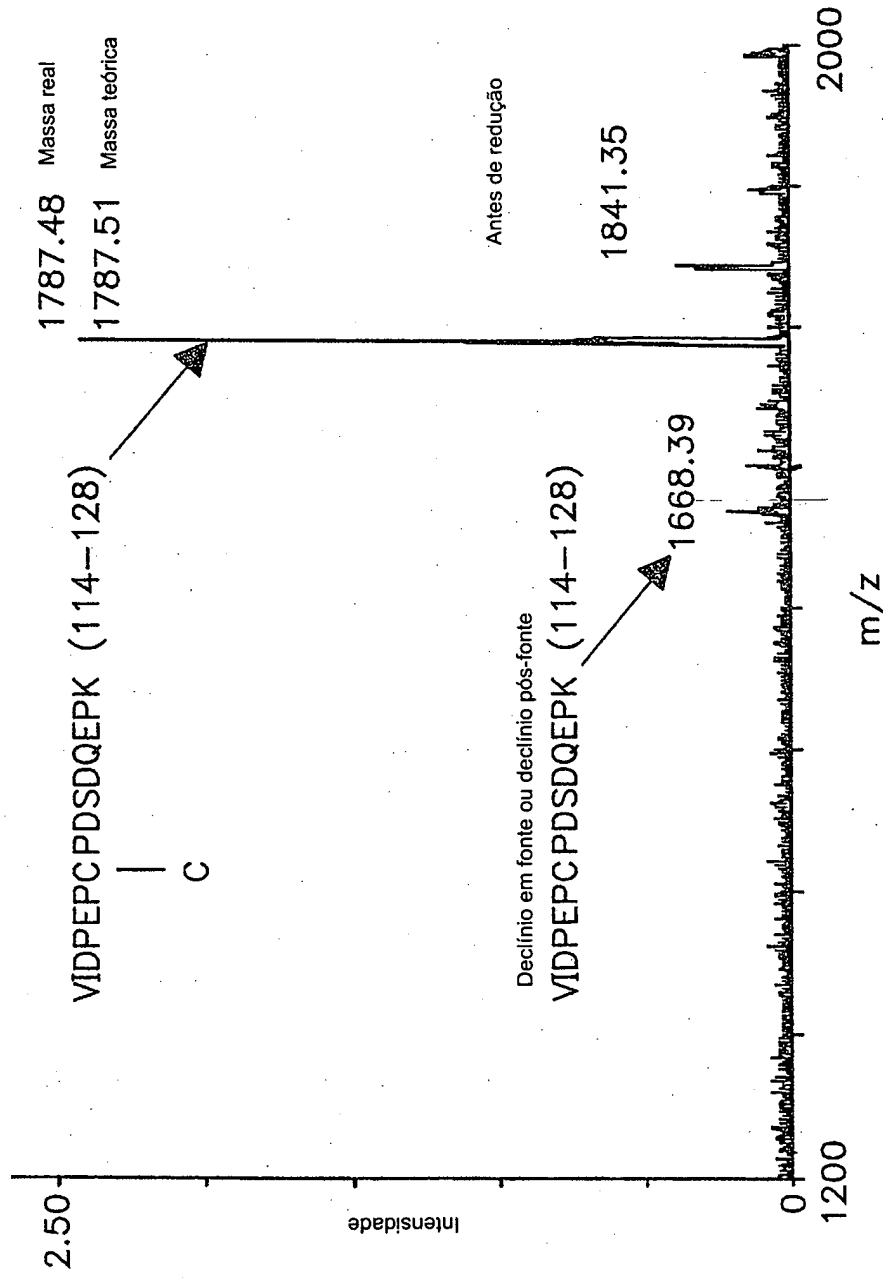


FIG. 27A

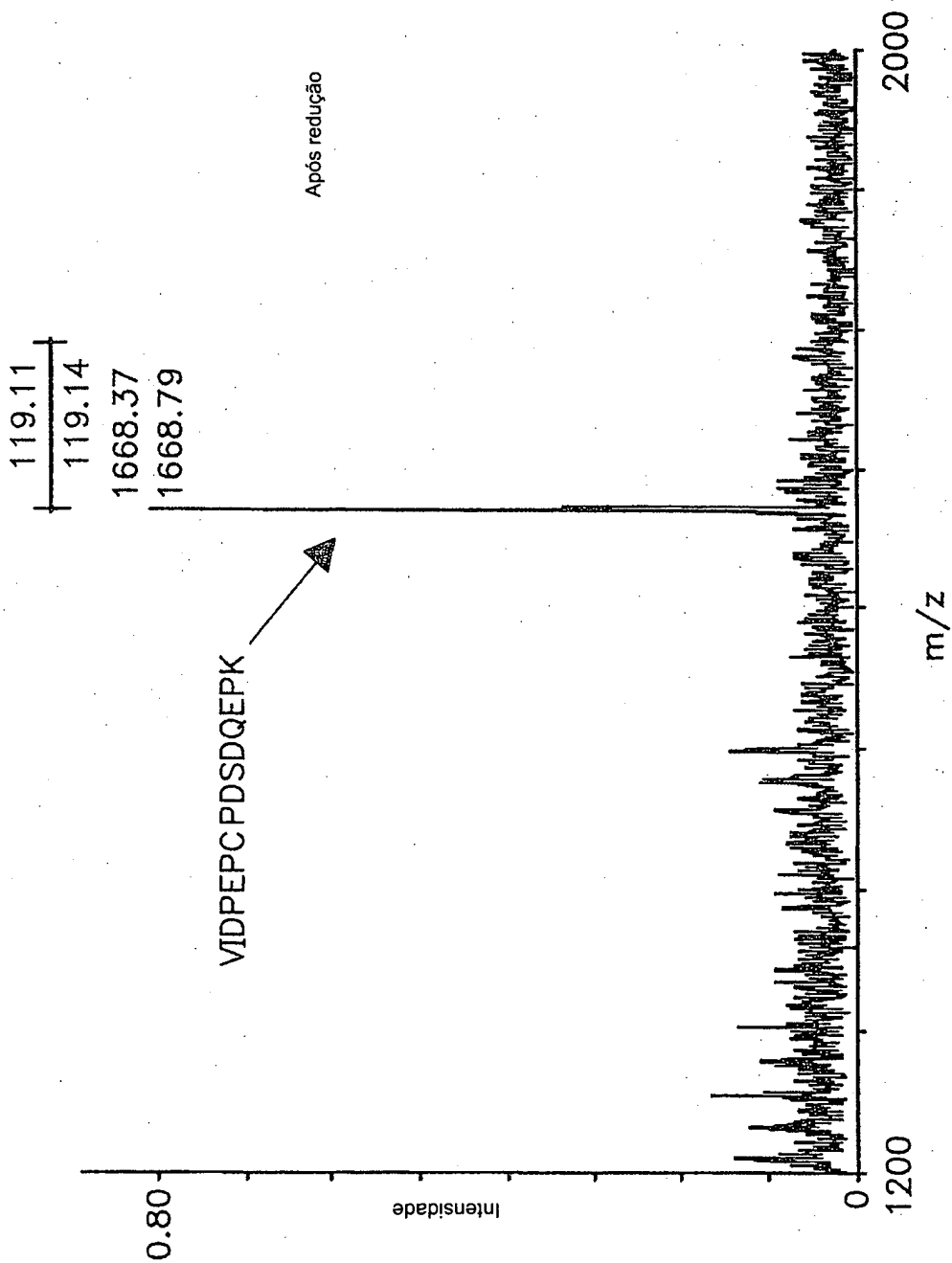


FIG. 27B

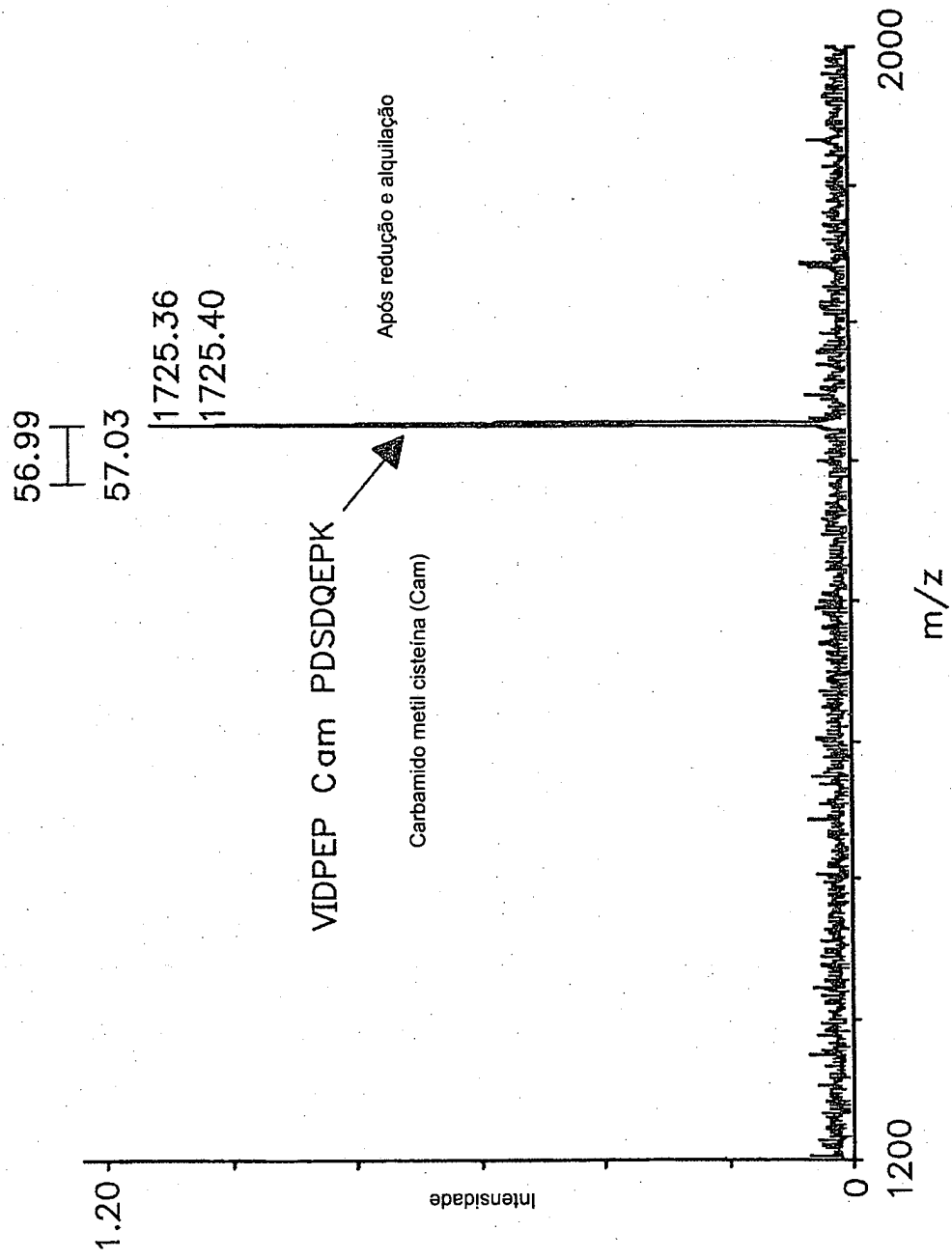


FIG. 27C

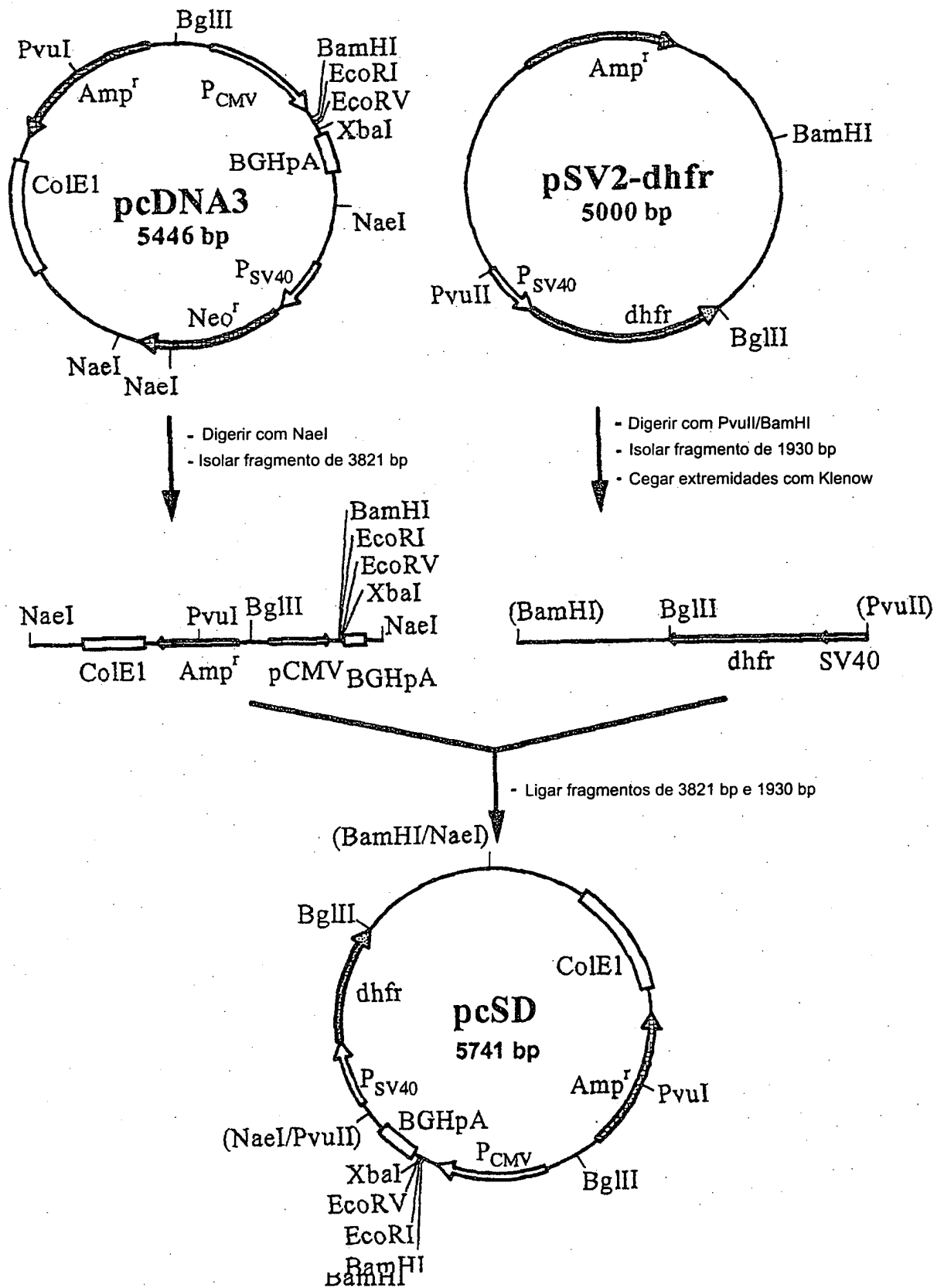


FIG. 28

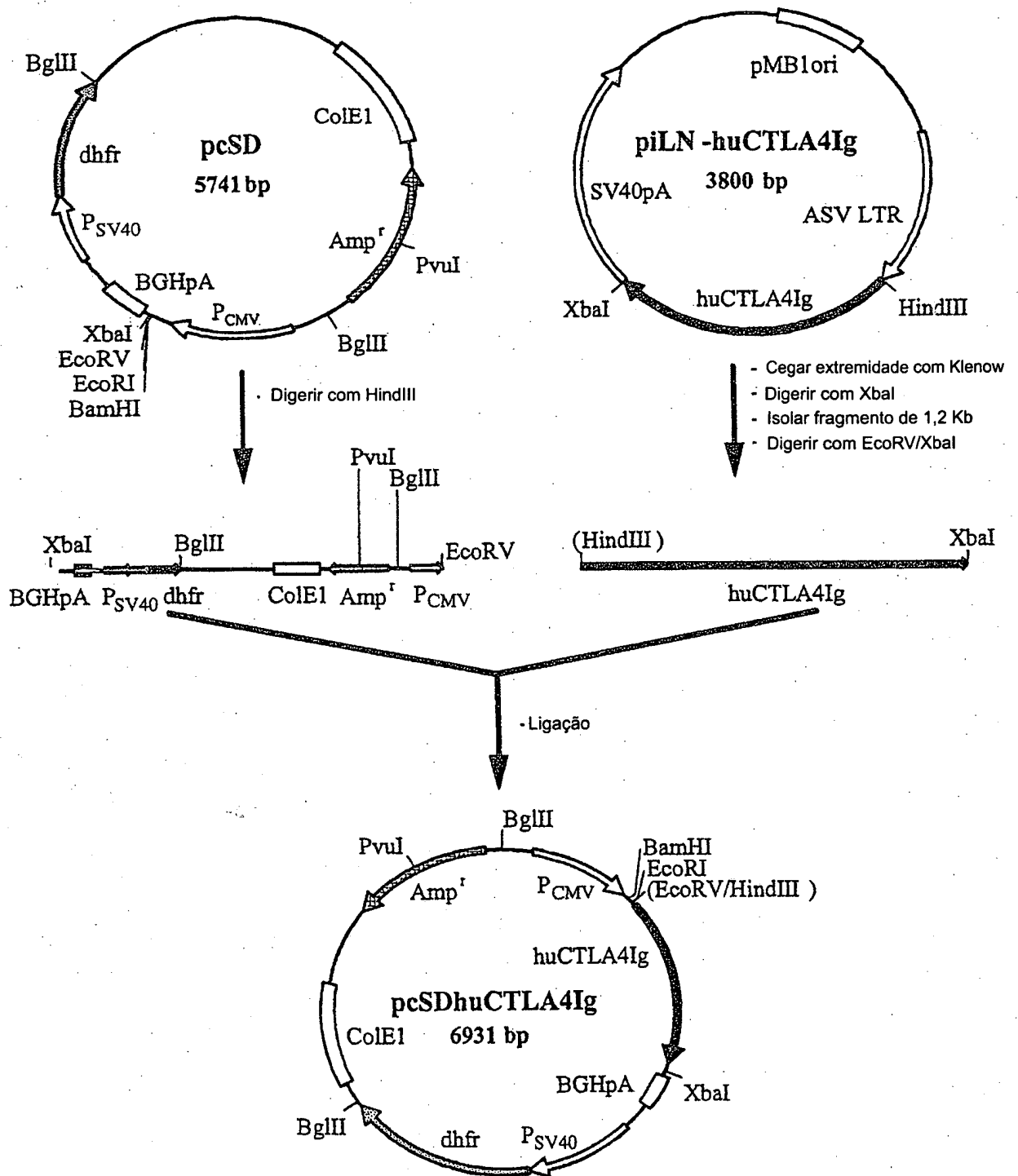


FIG. 29

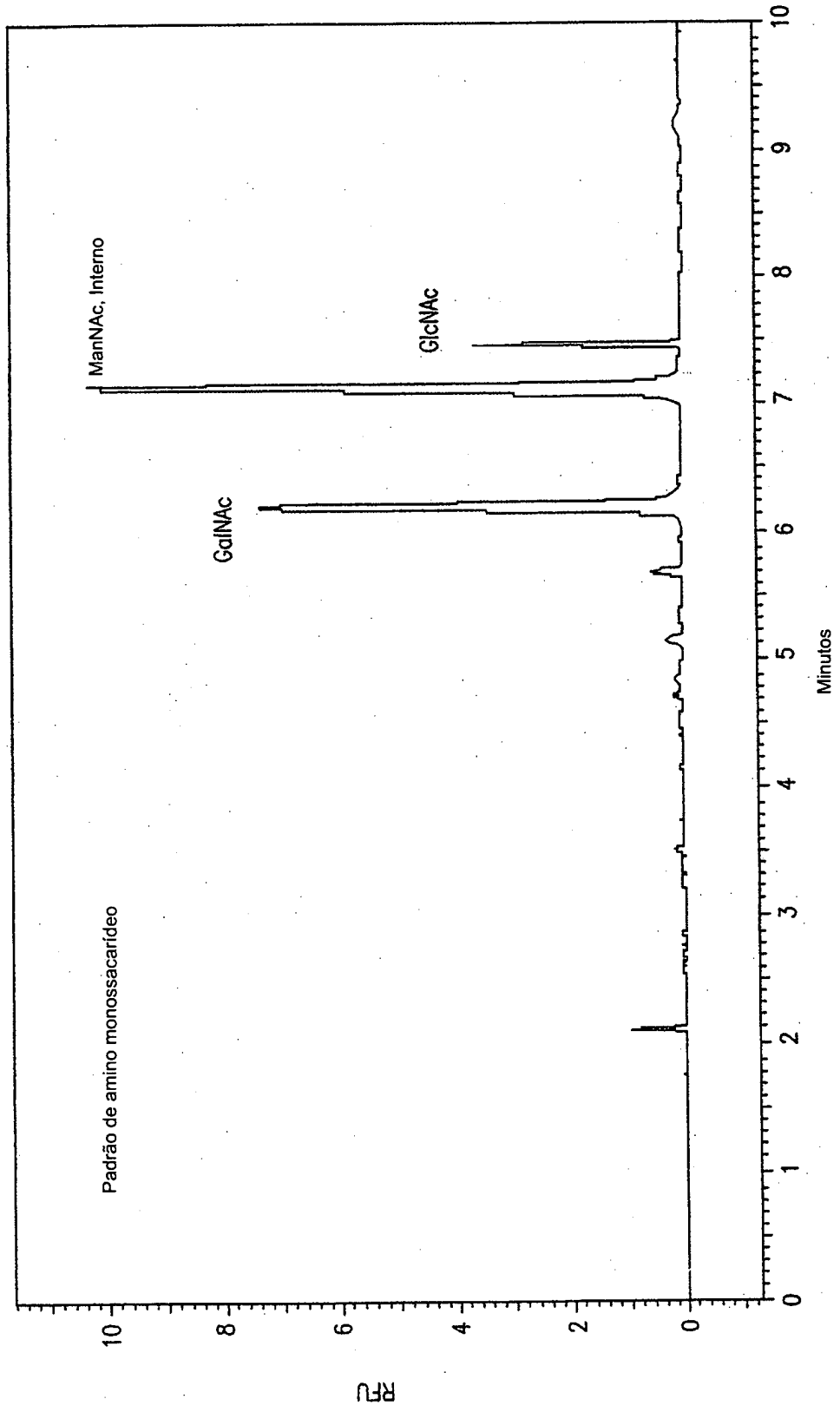


FIG. 30

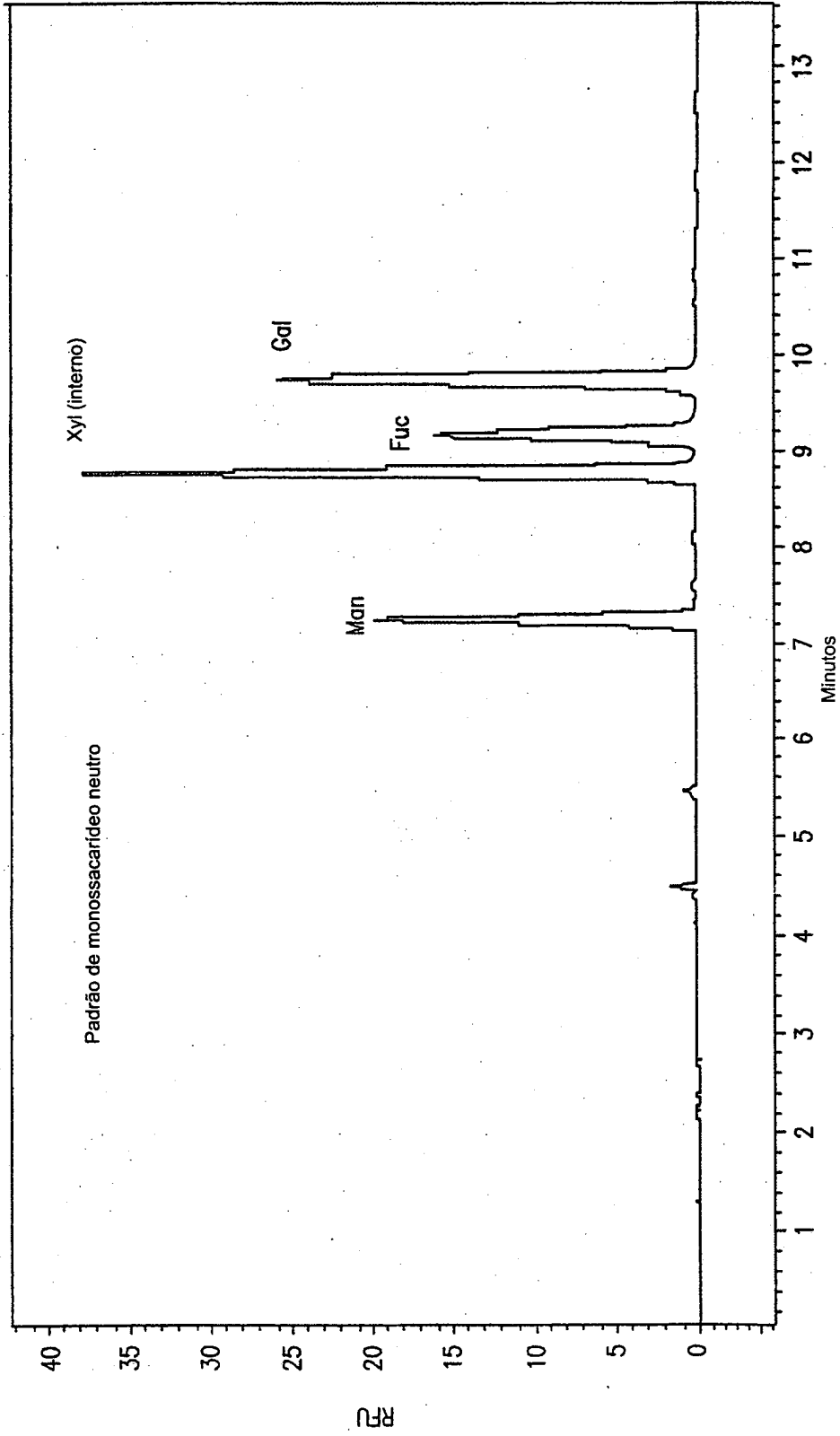


FIG. 31

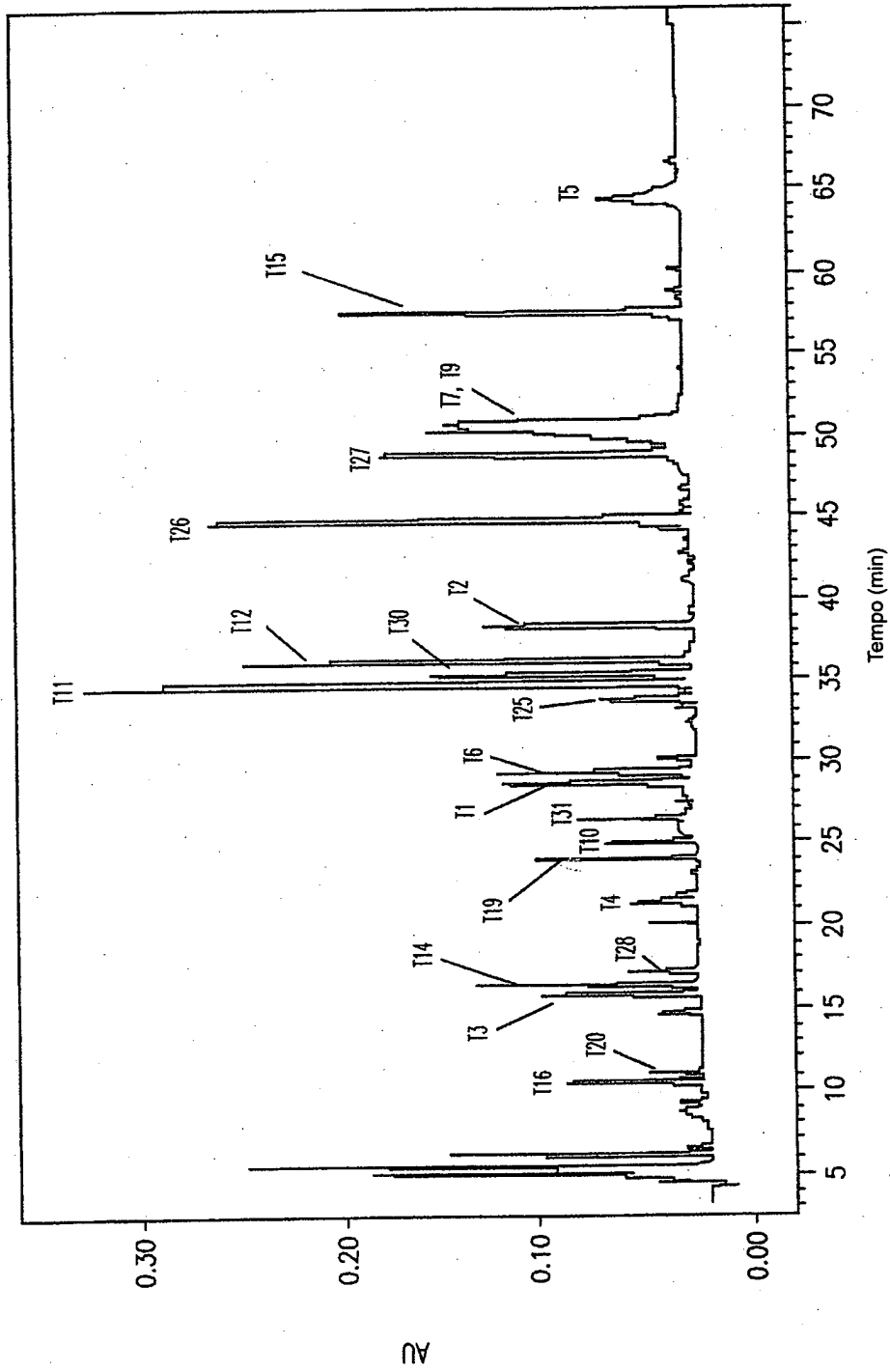


FIG. 32

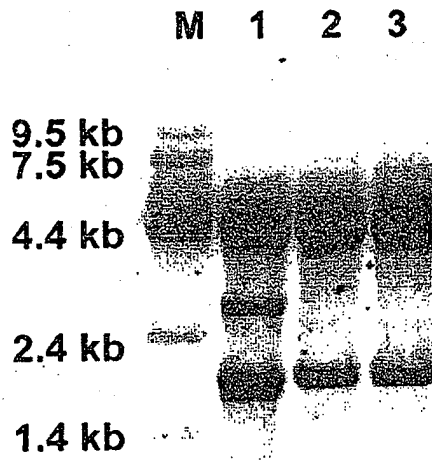


FIG. 33A

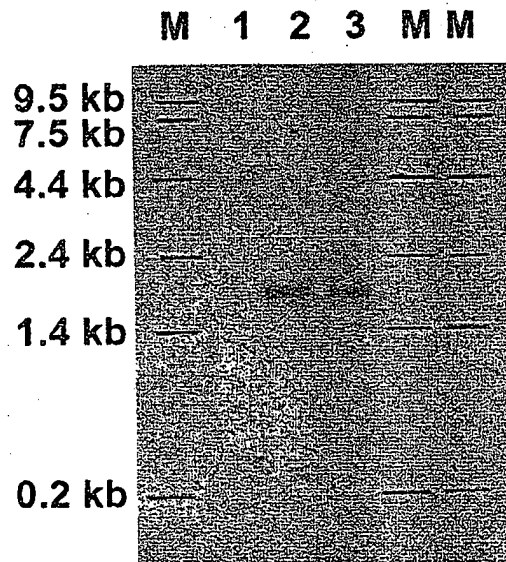


FIG. 33B

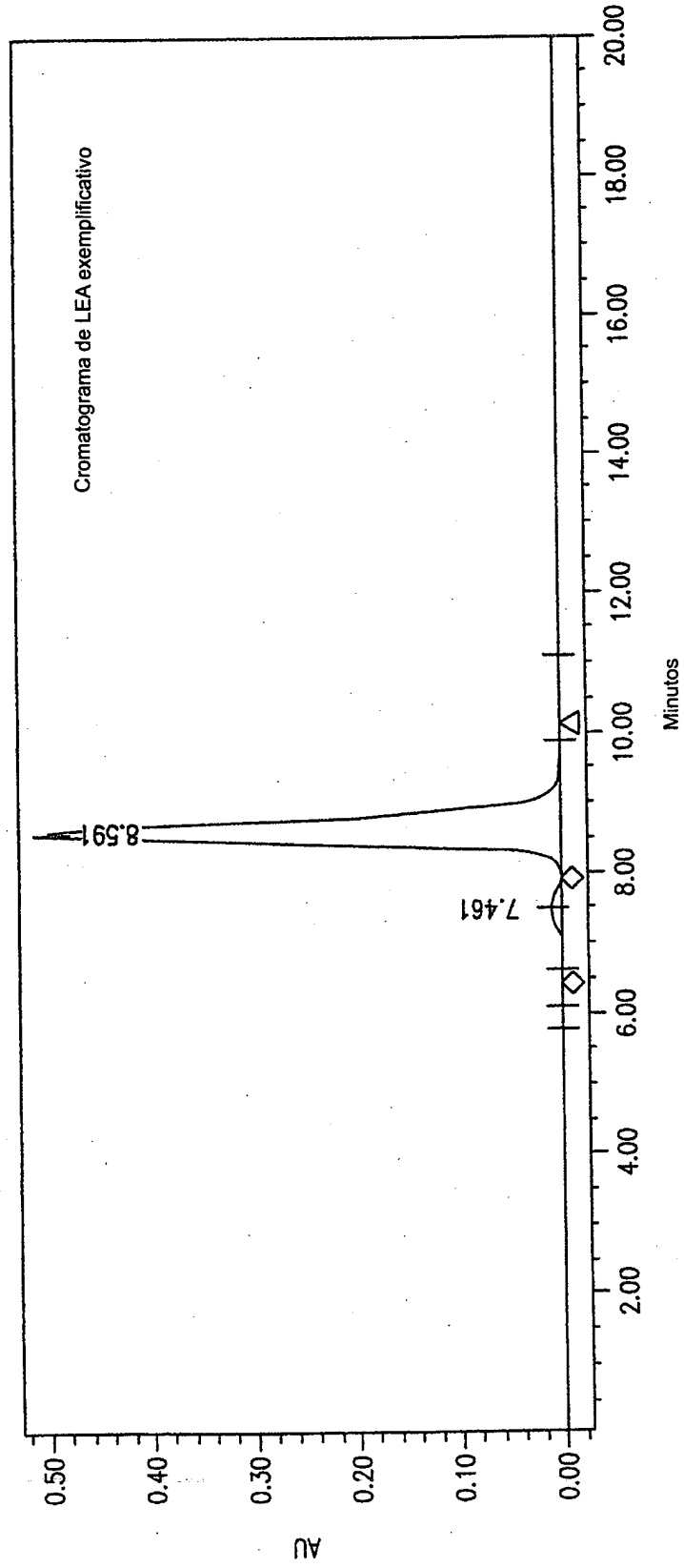


FIG. 34A

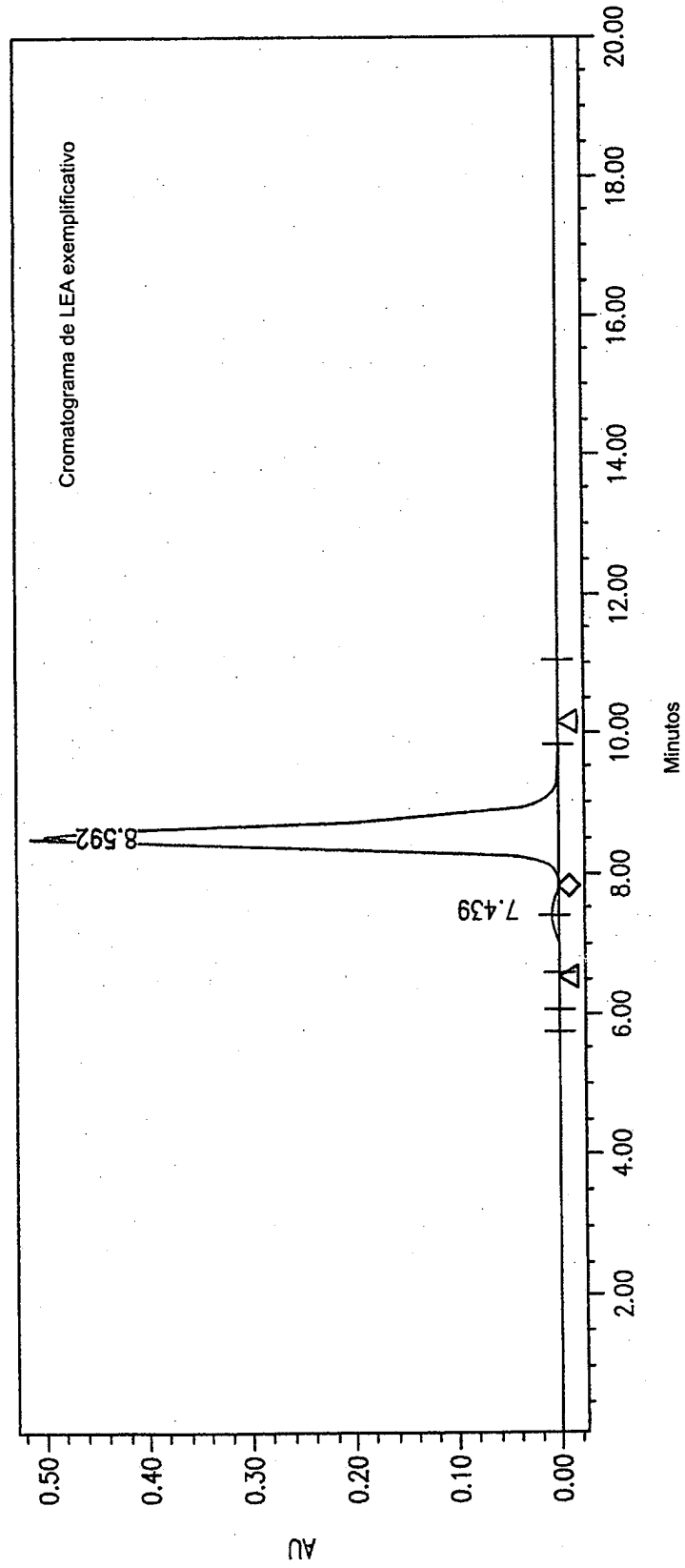


FIG. 34B

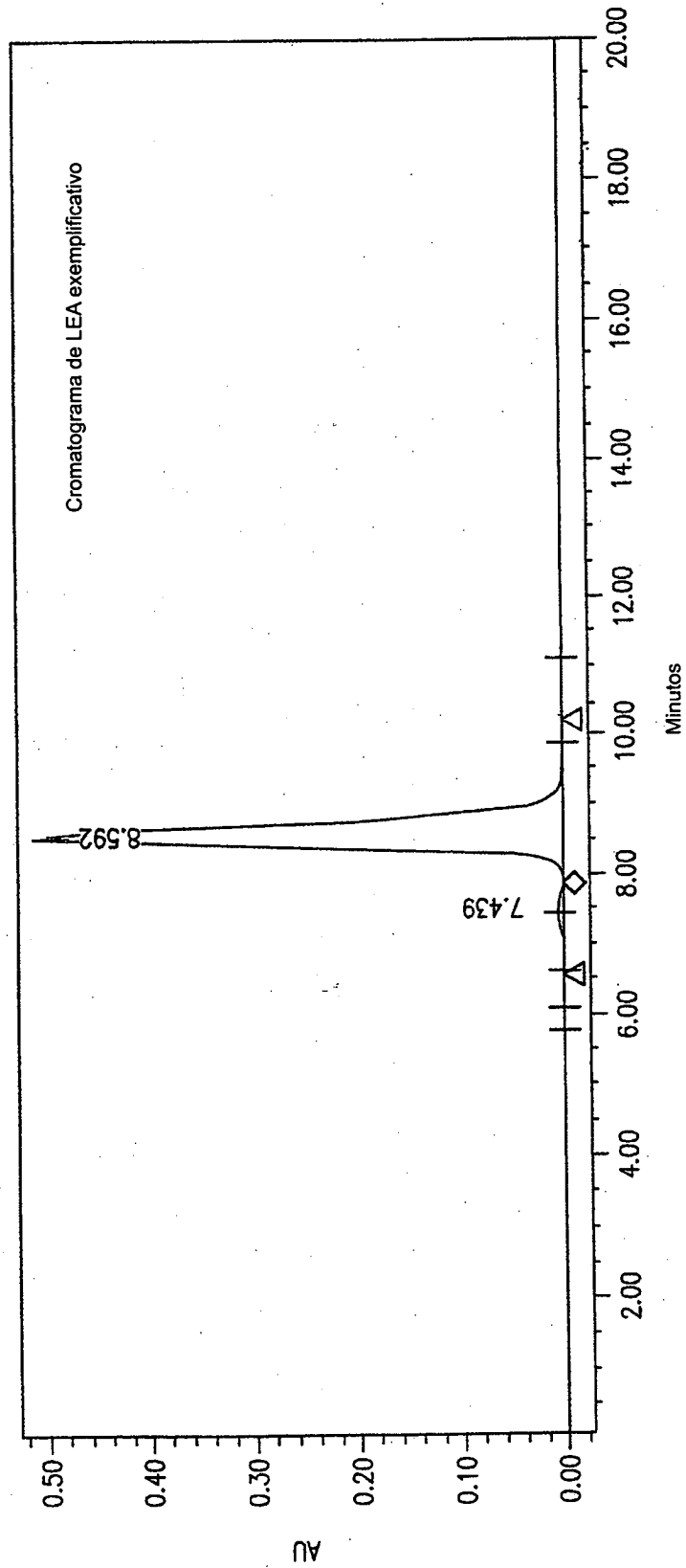


FIG. 34C

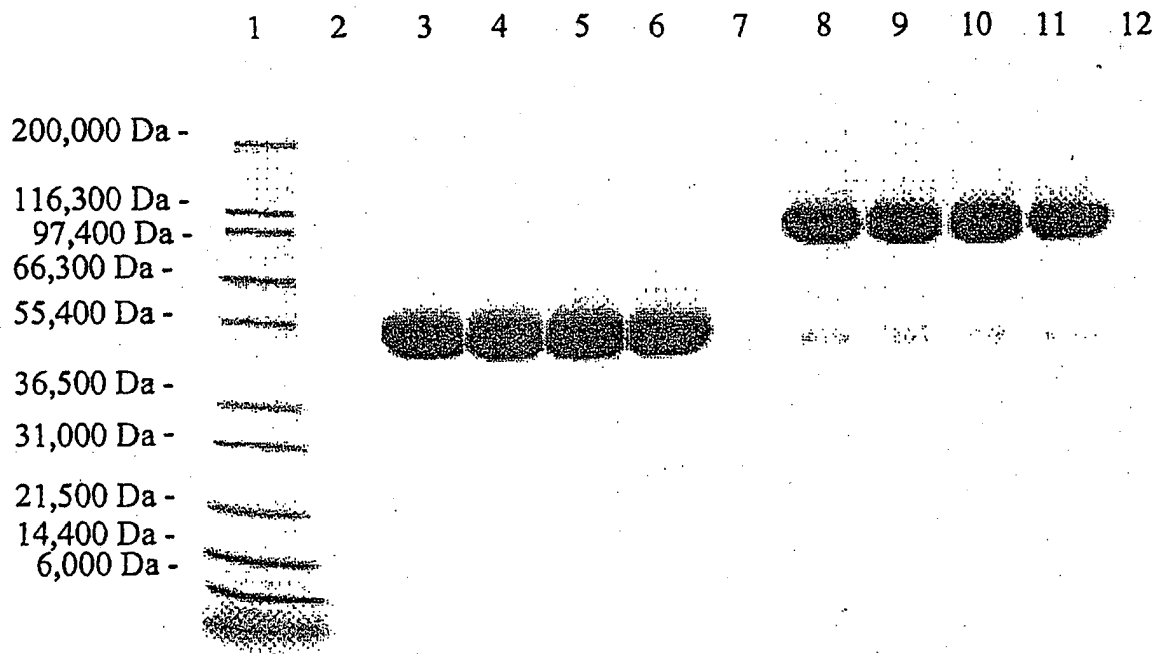


FIG. 35

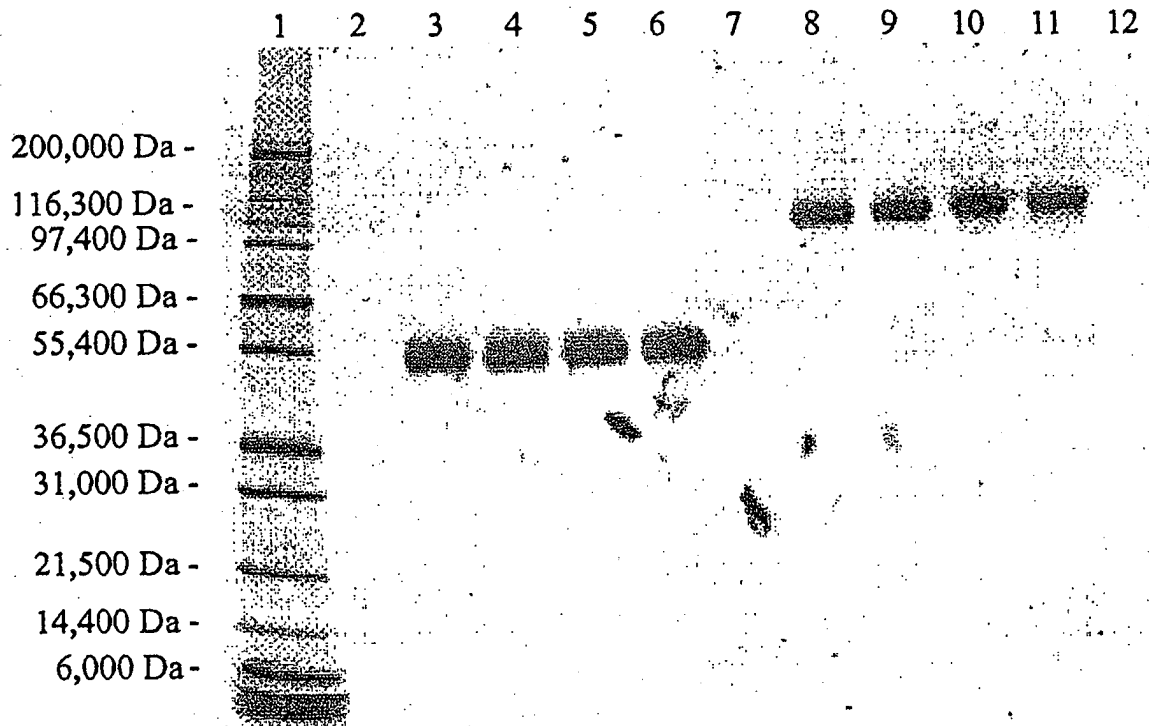


FIG. 36

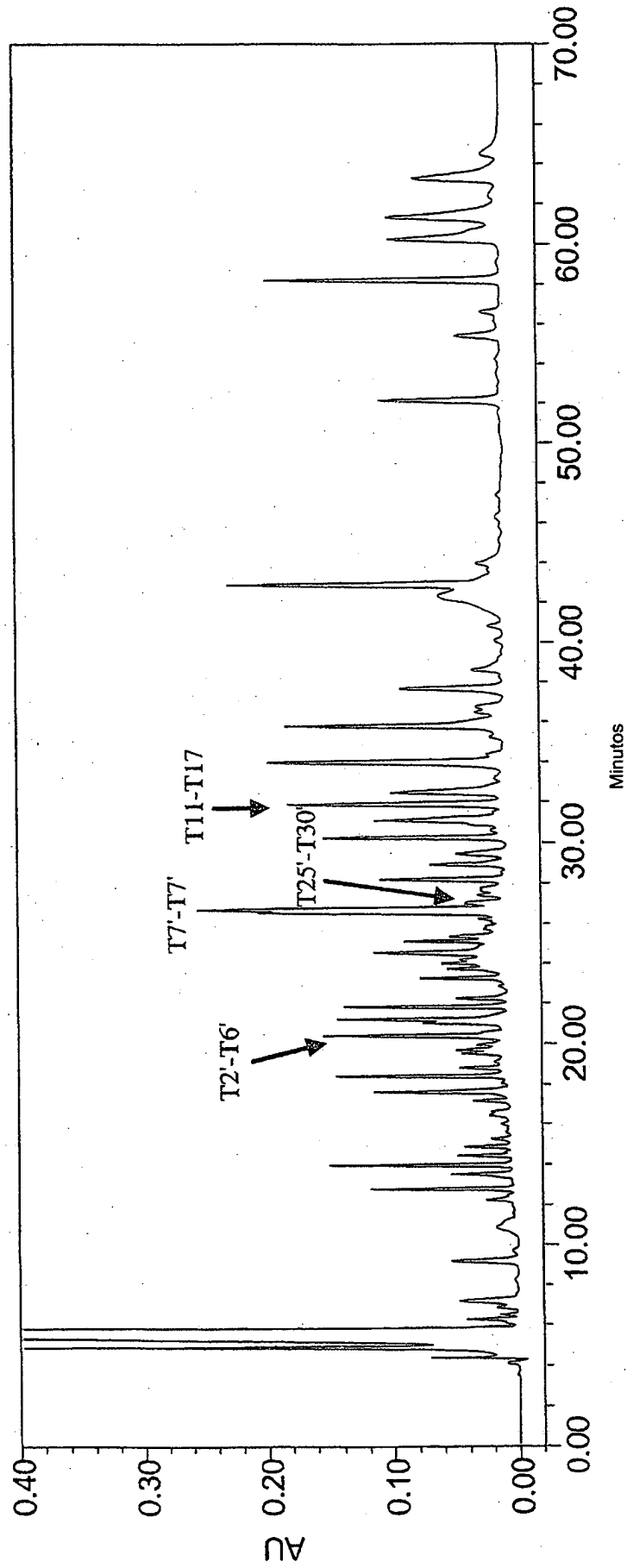


FIG. 37

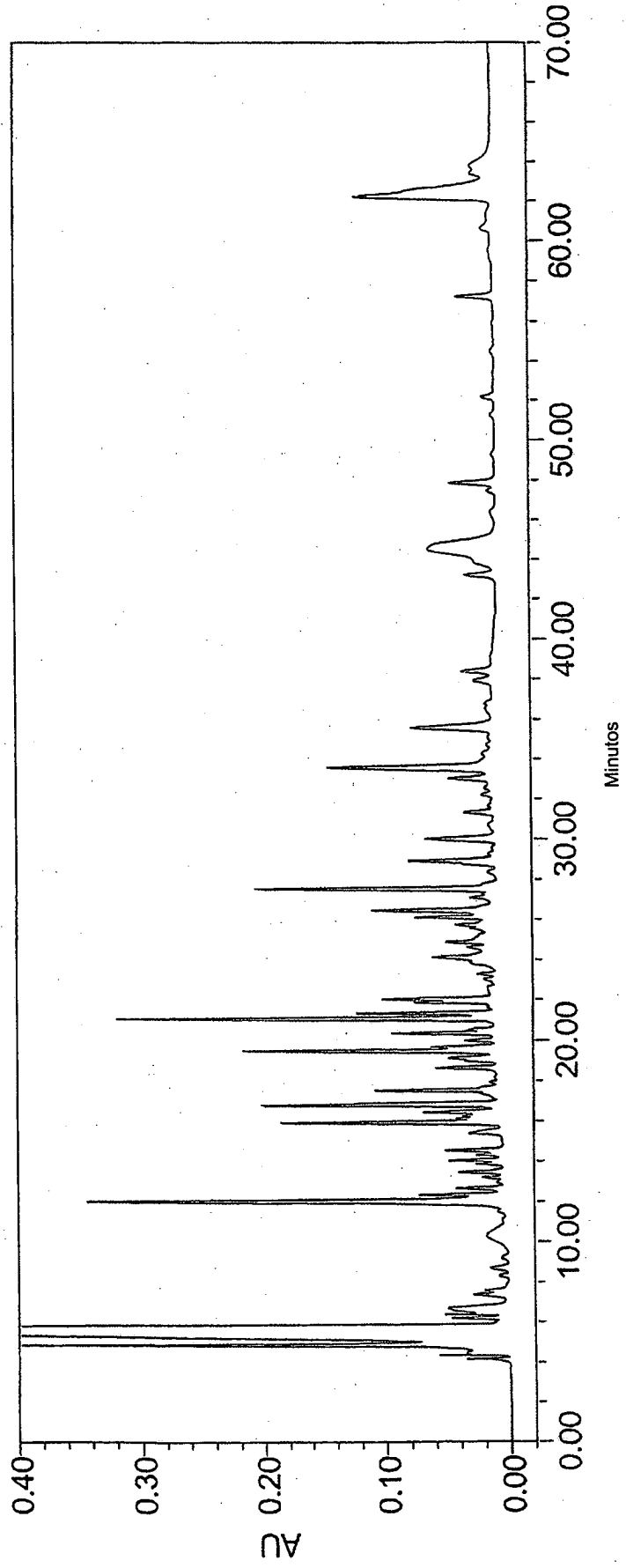


FIG. 38

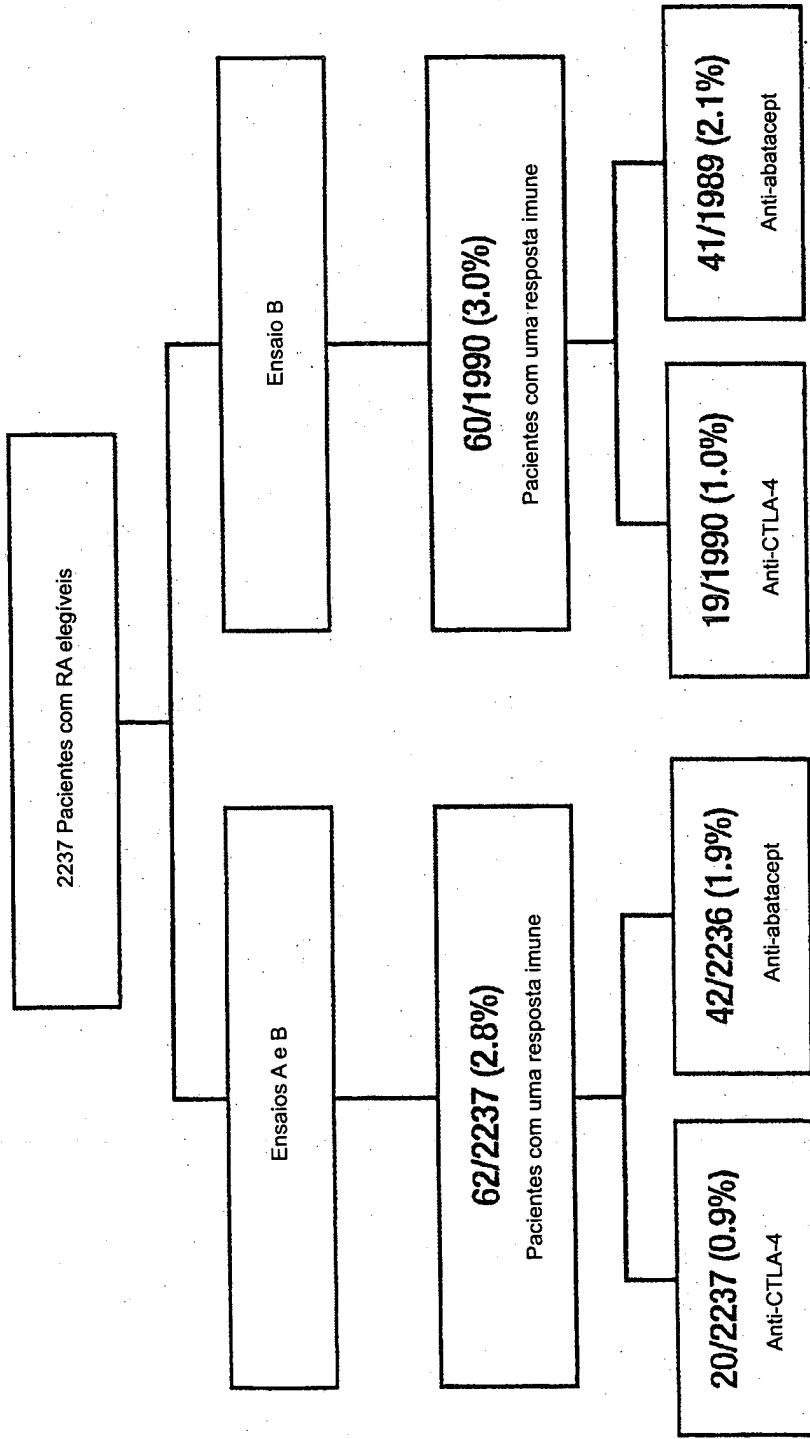


FIG. 39

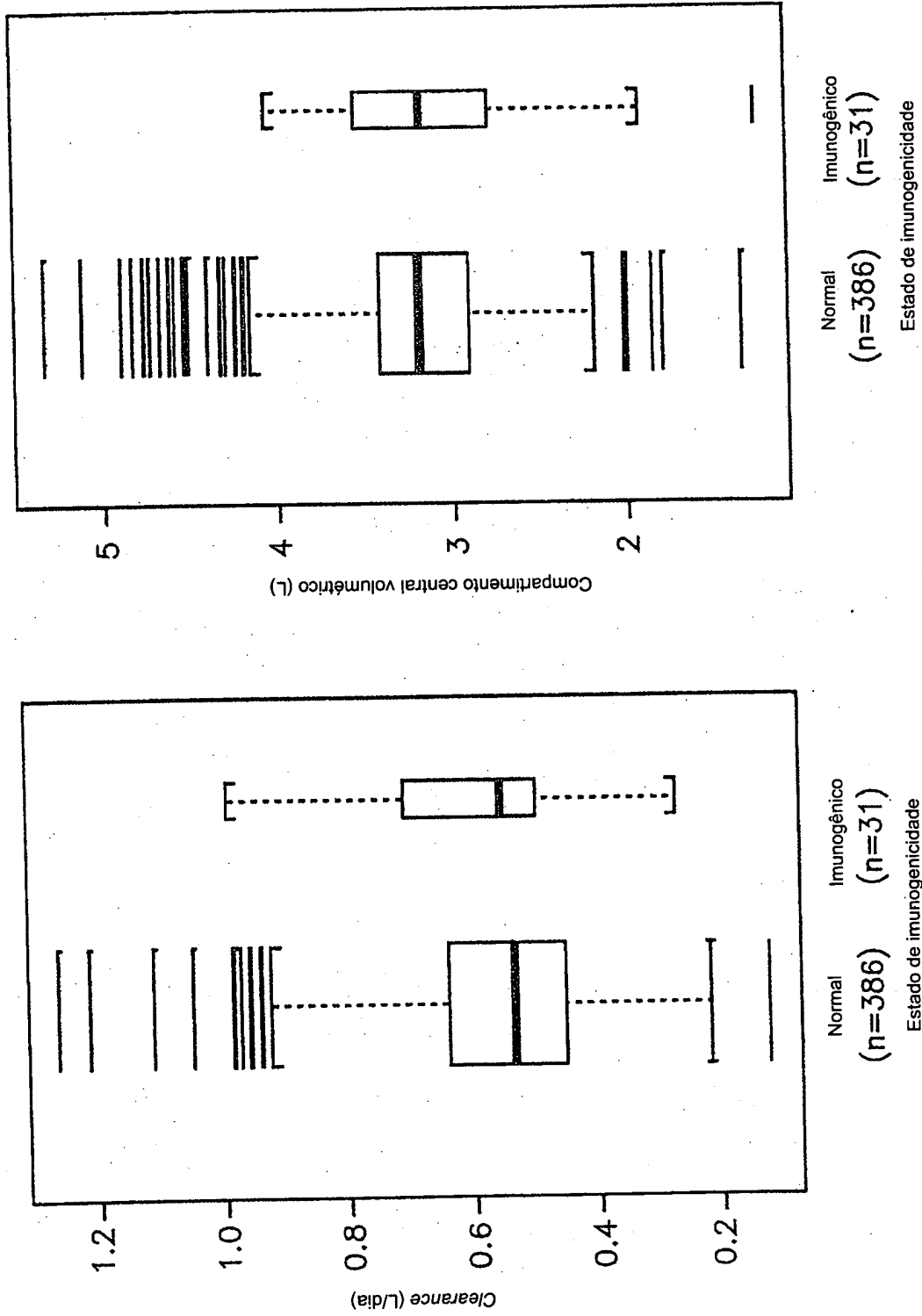


FIG. 40

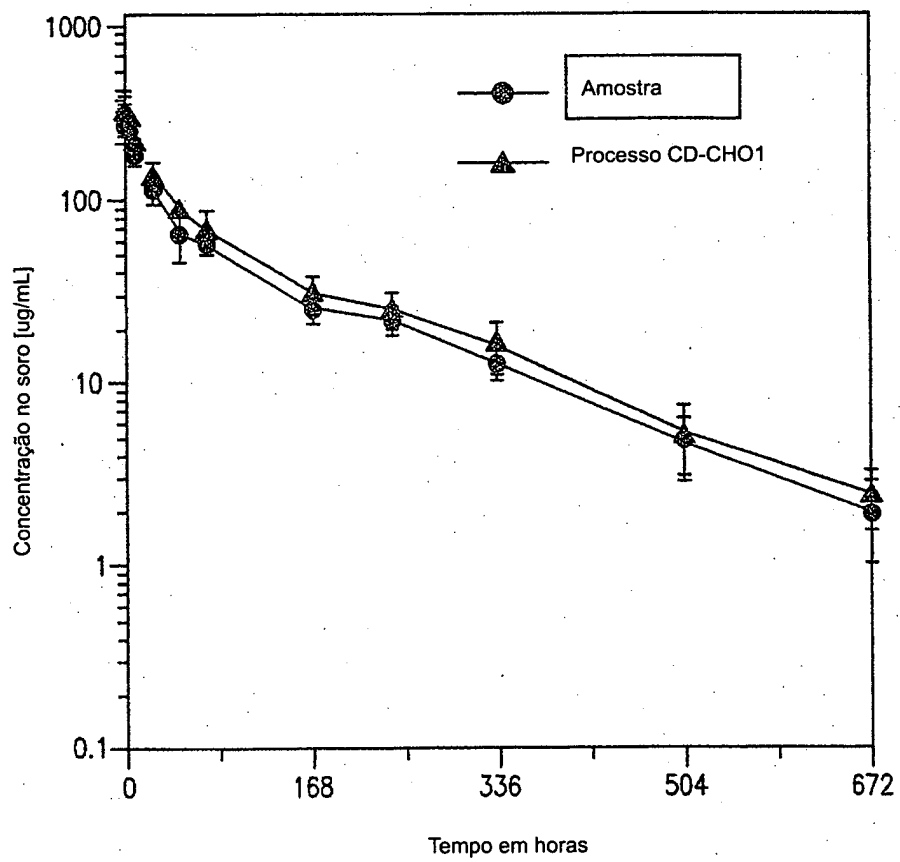


FIG. 41

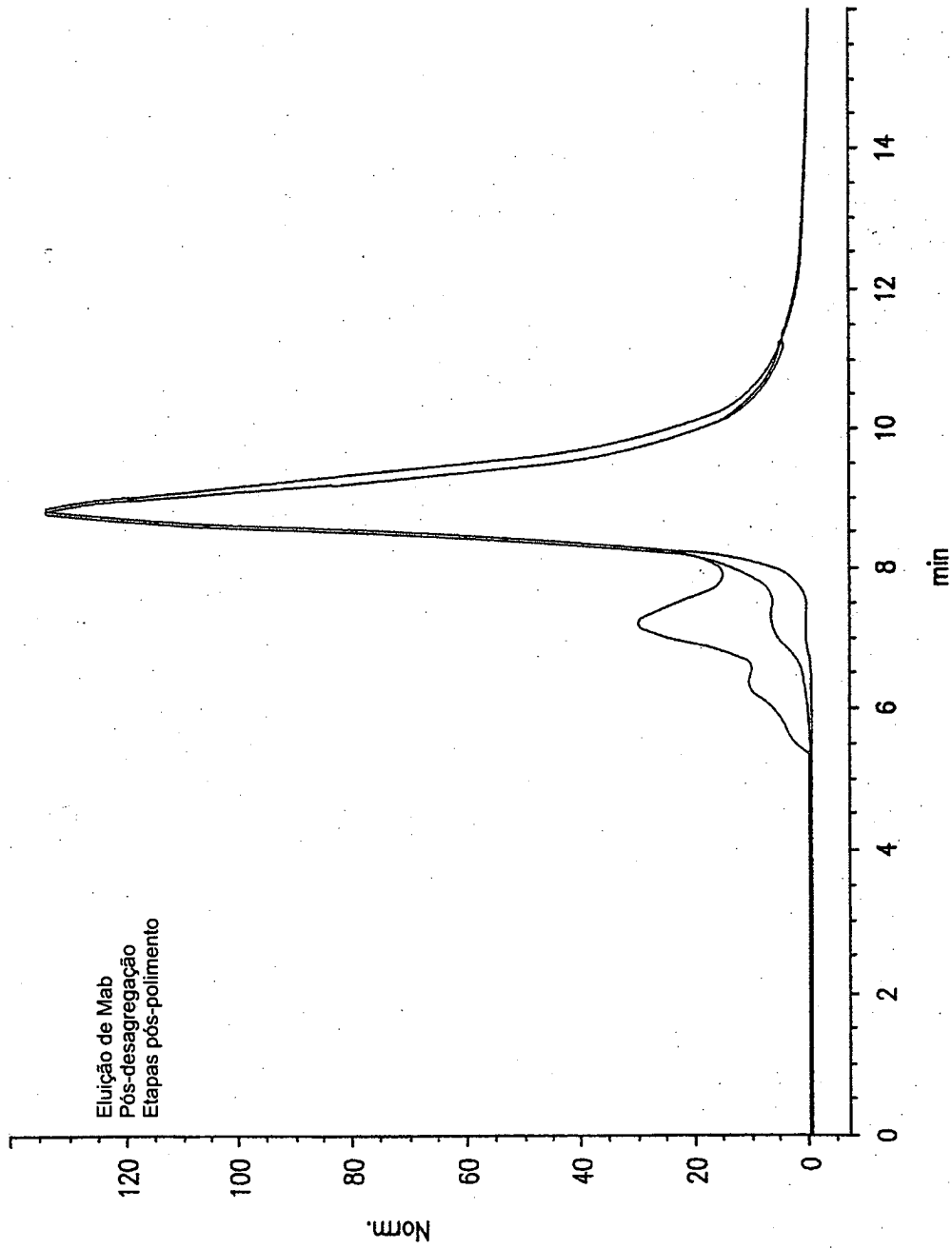


FIG. 42

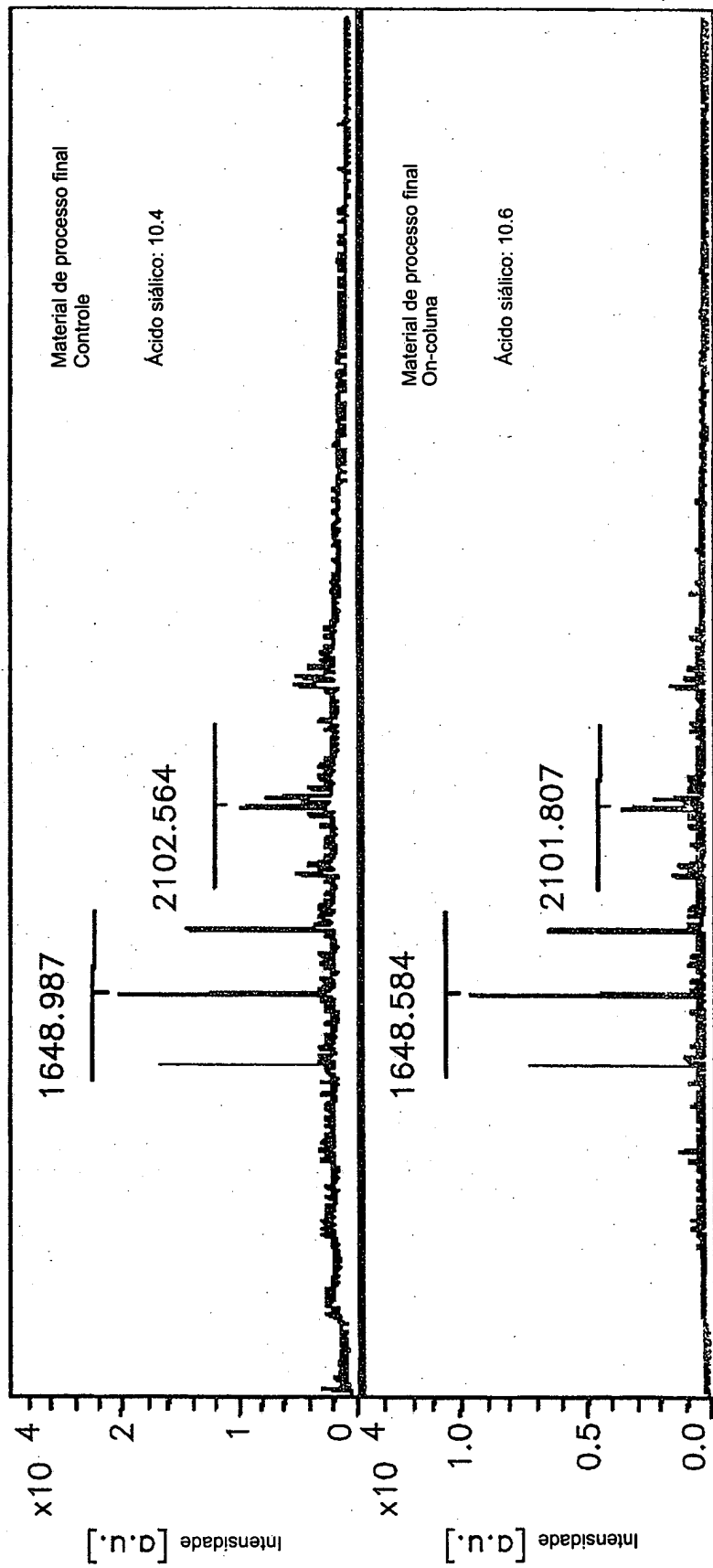


FIG. 43

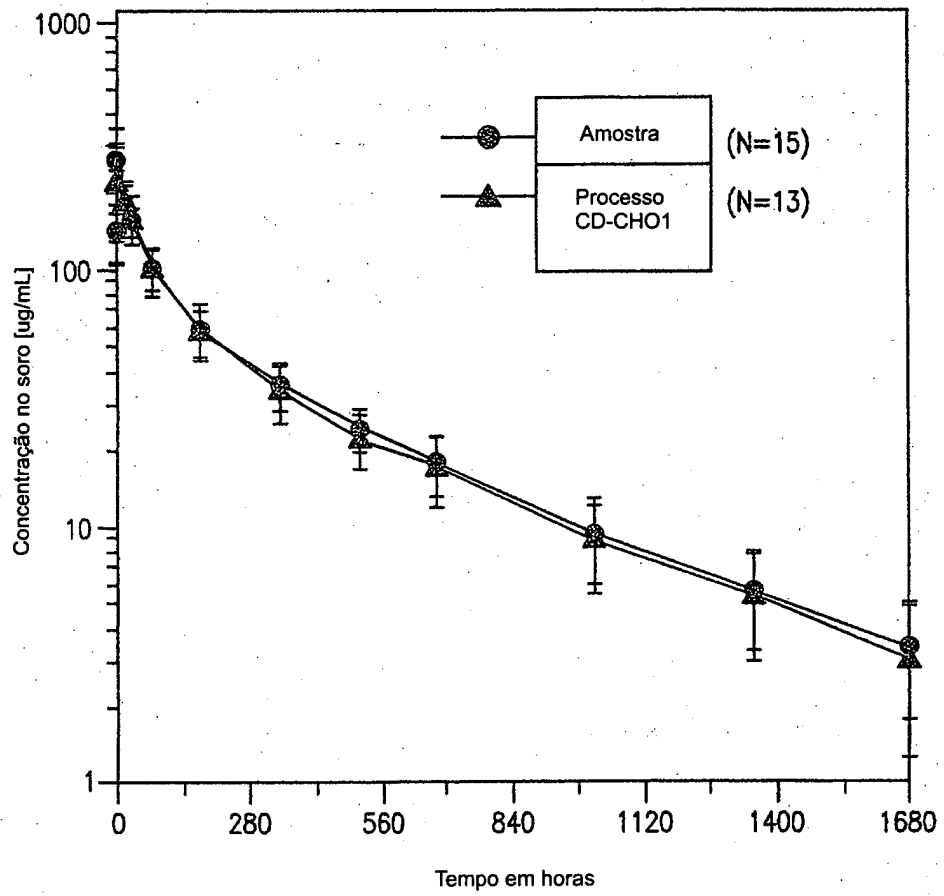


FIG. 44

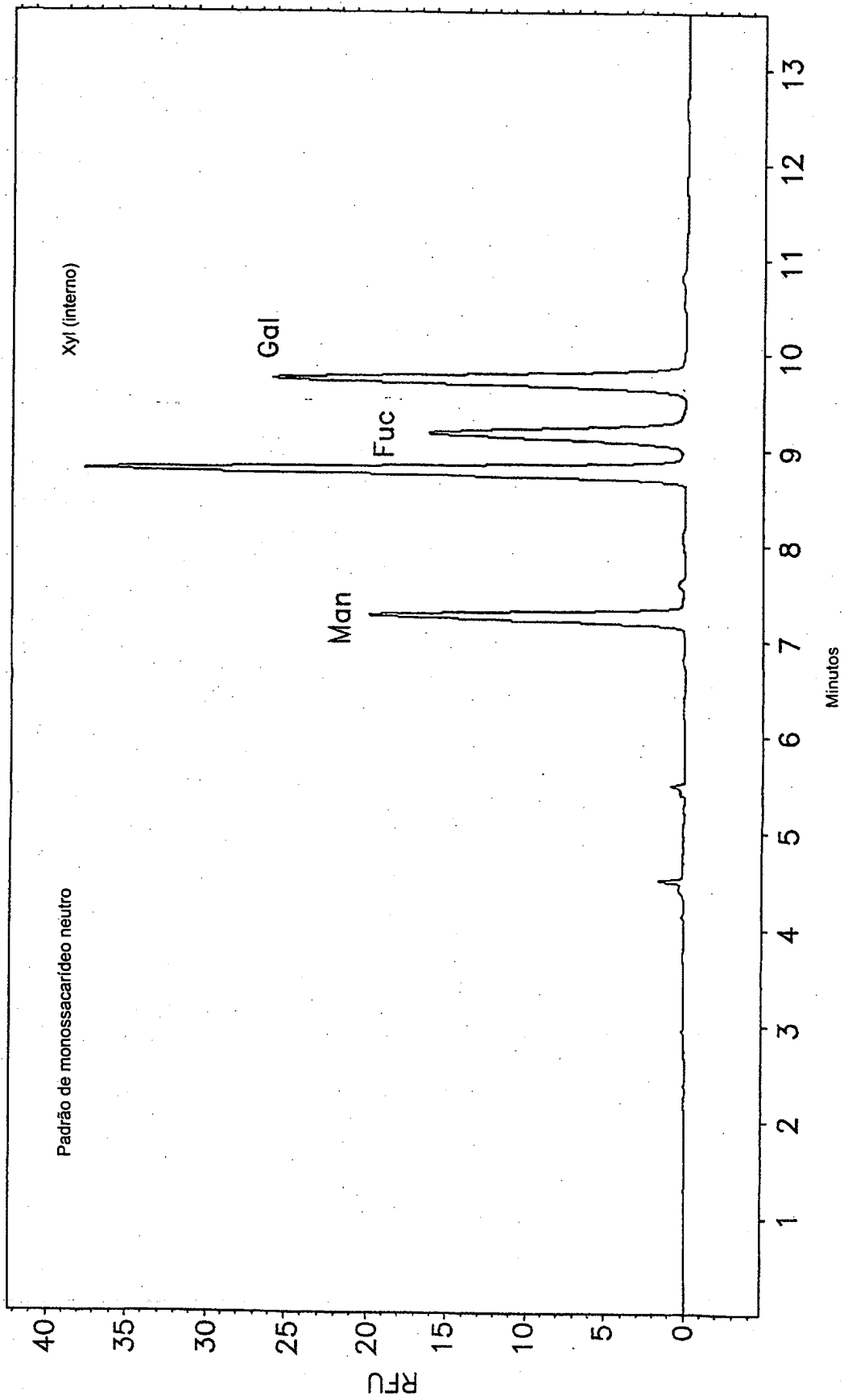


FIG. 45

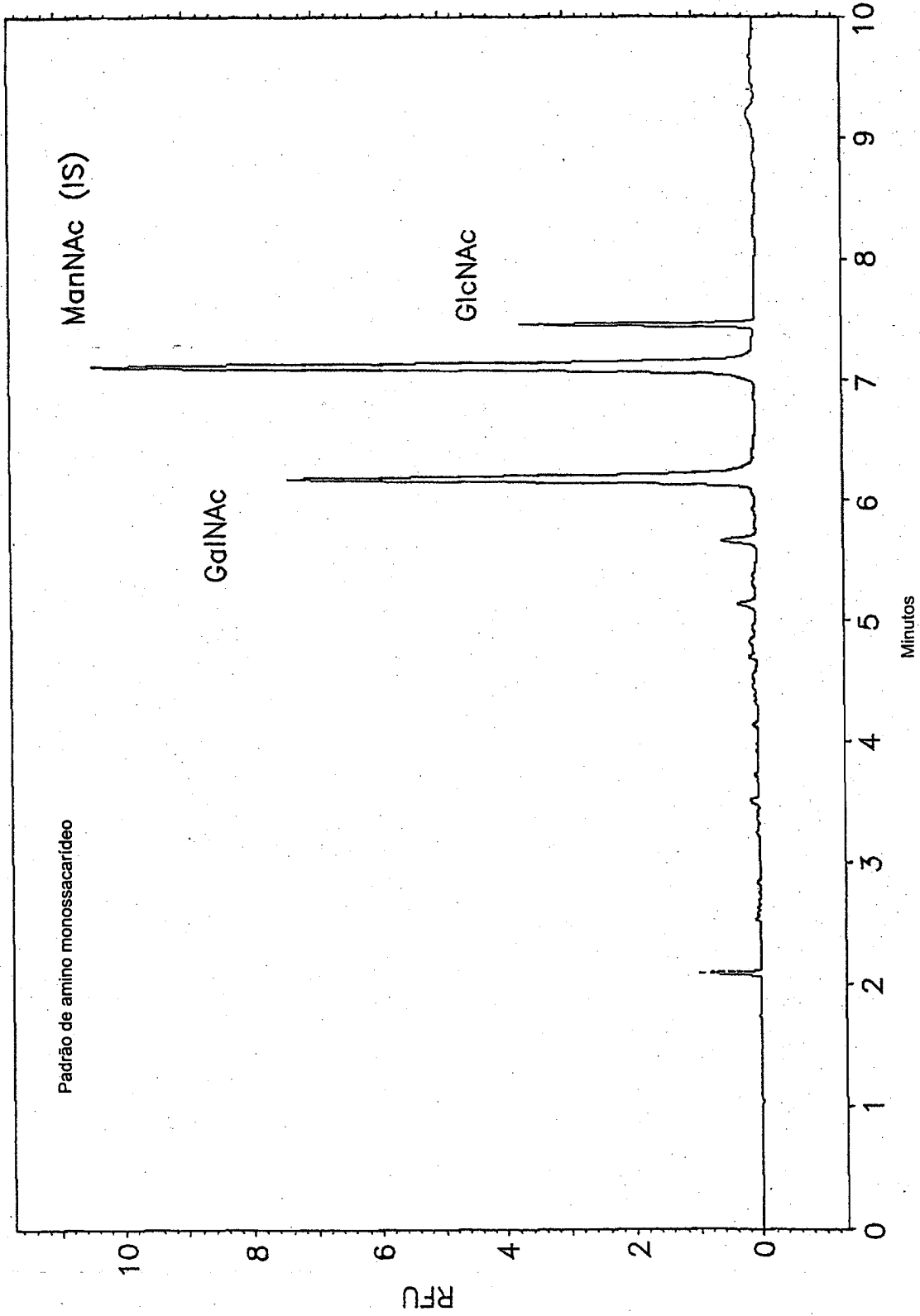


FIG. 46

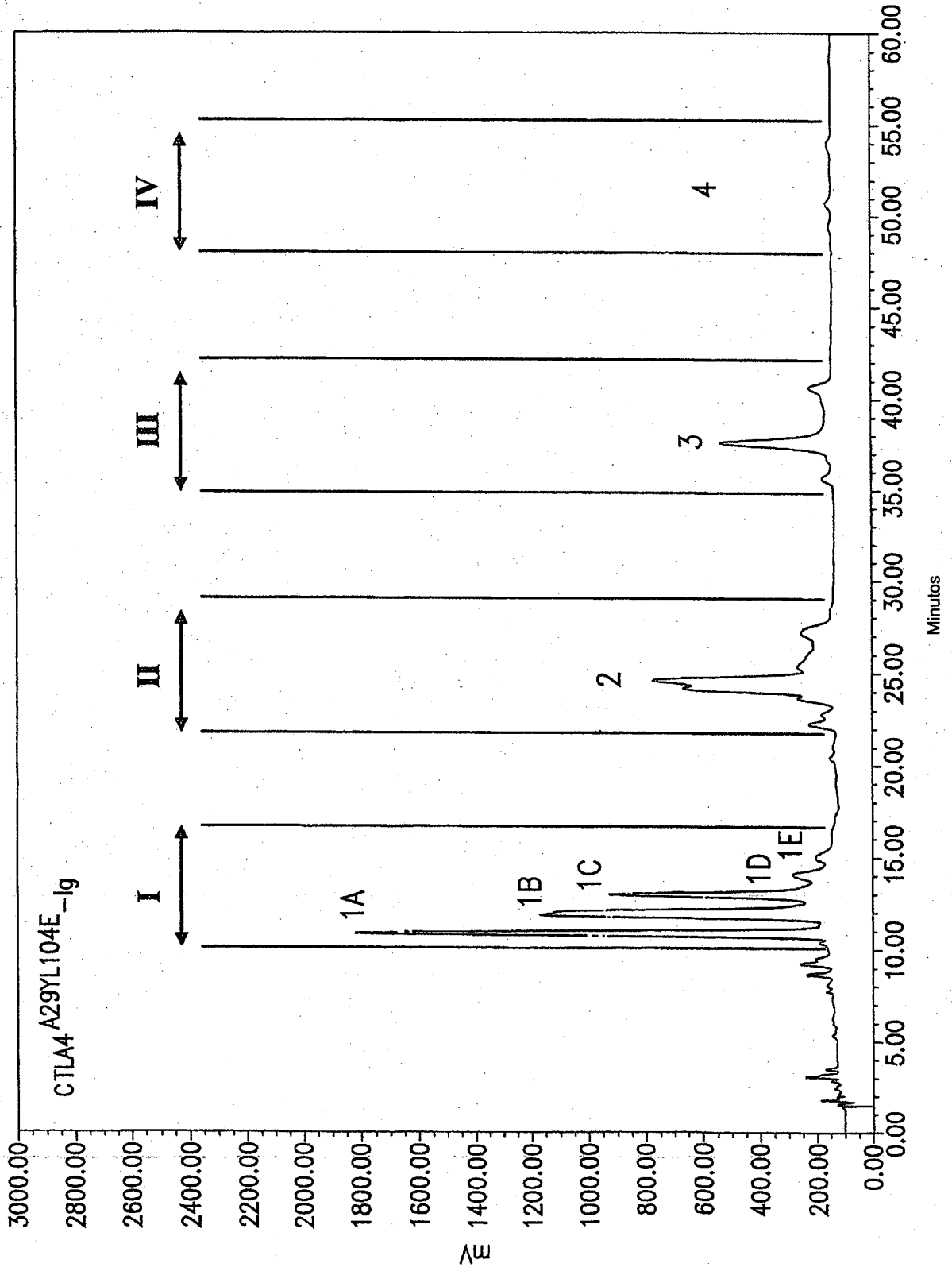


FIG. 47

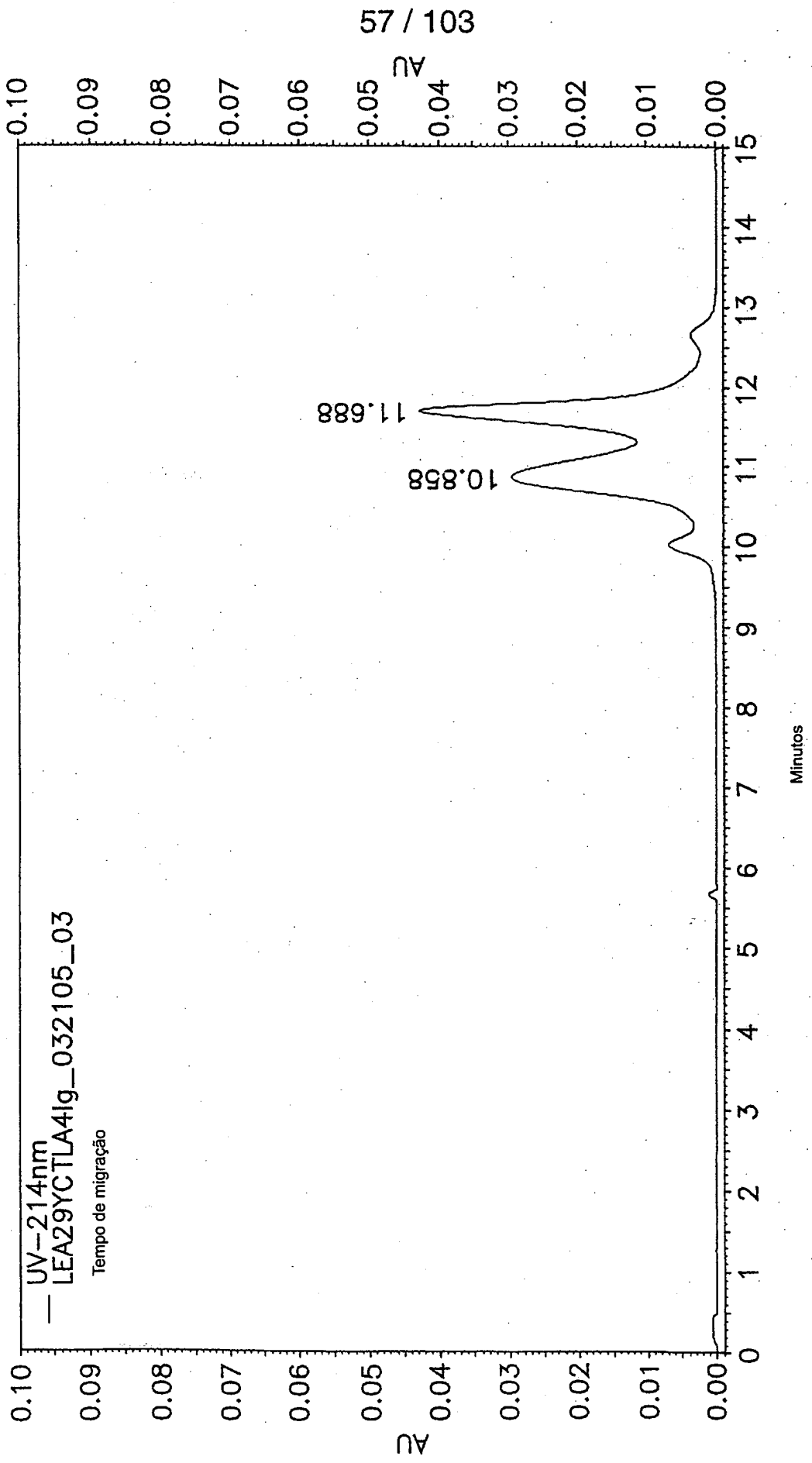


FIG. 48

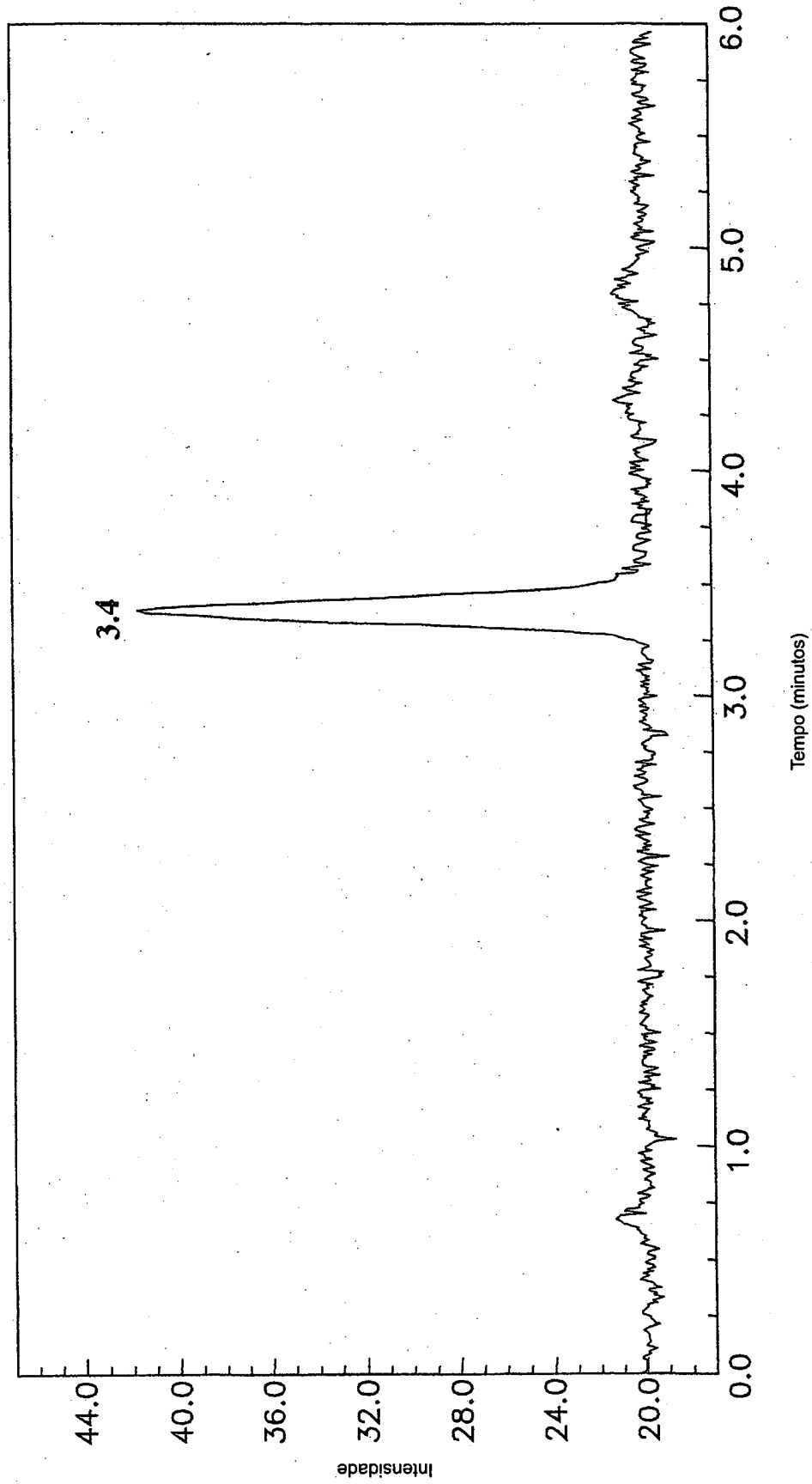


FIG. 49

Glicosilação N-ligada em células CHO

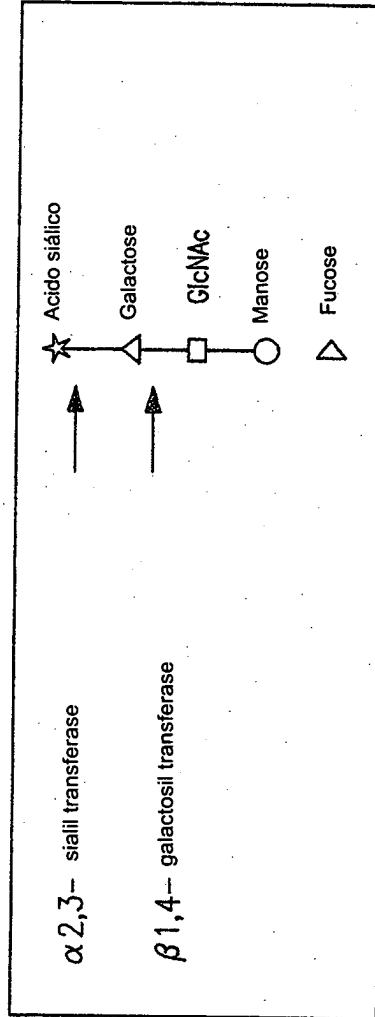
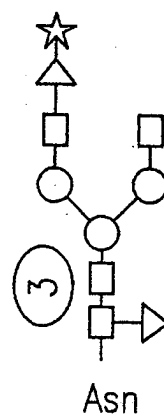
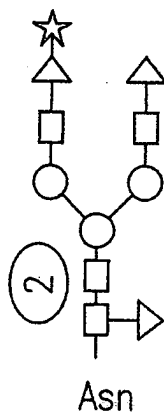
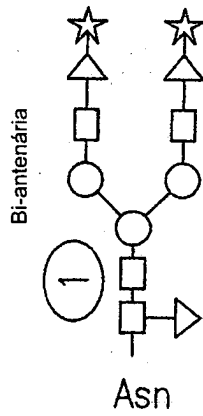
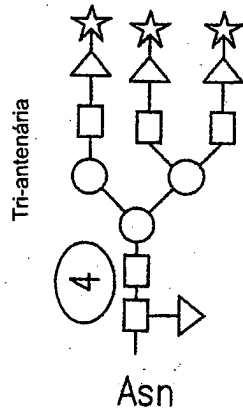
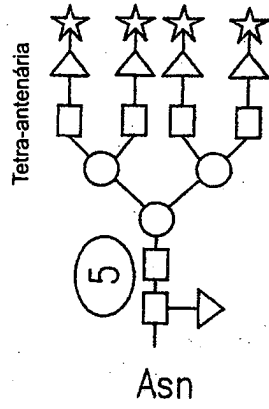


FIG. 50

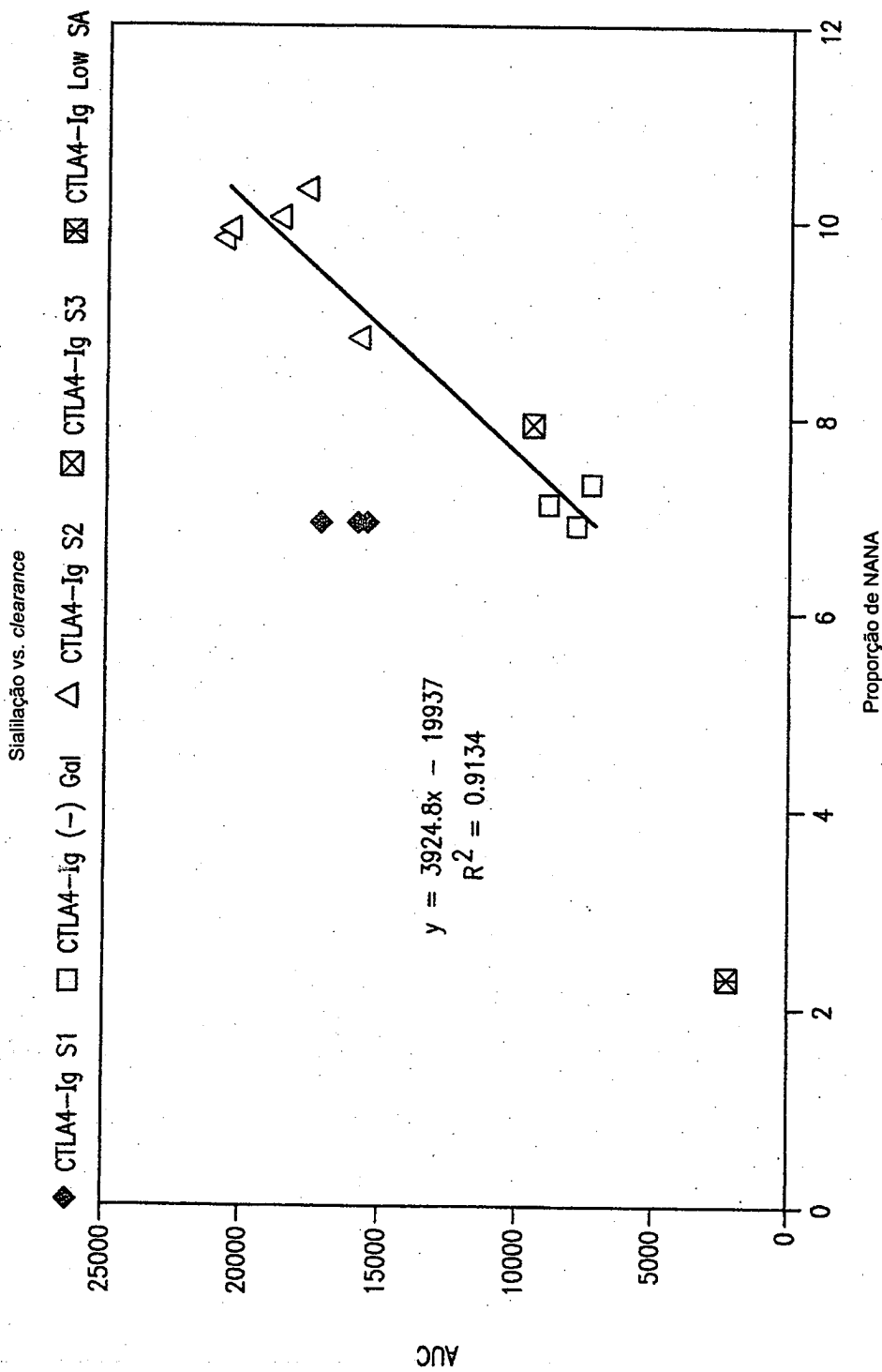


FIG. 51

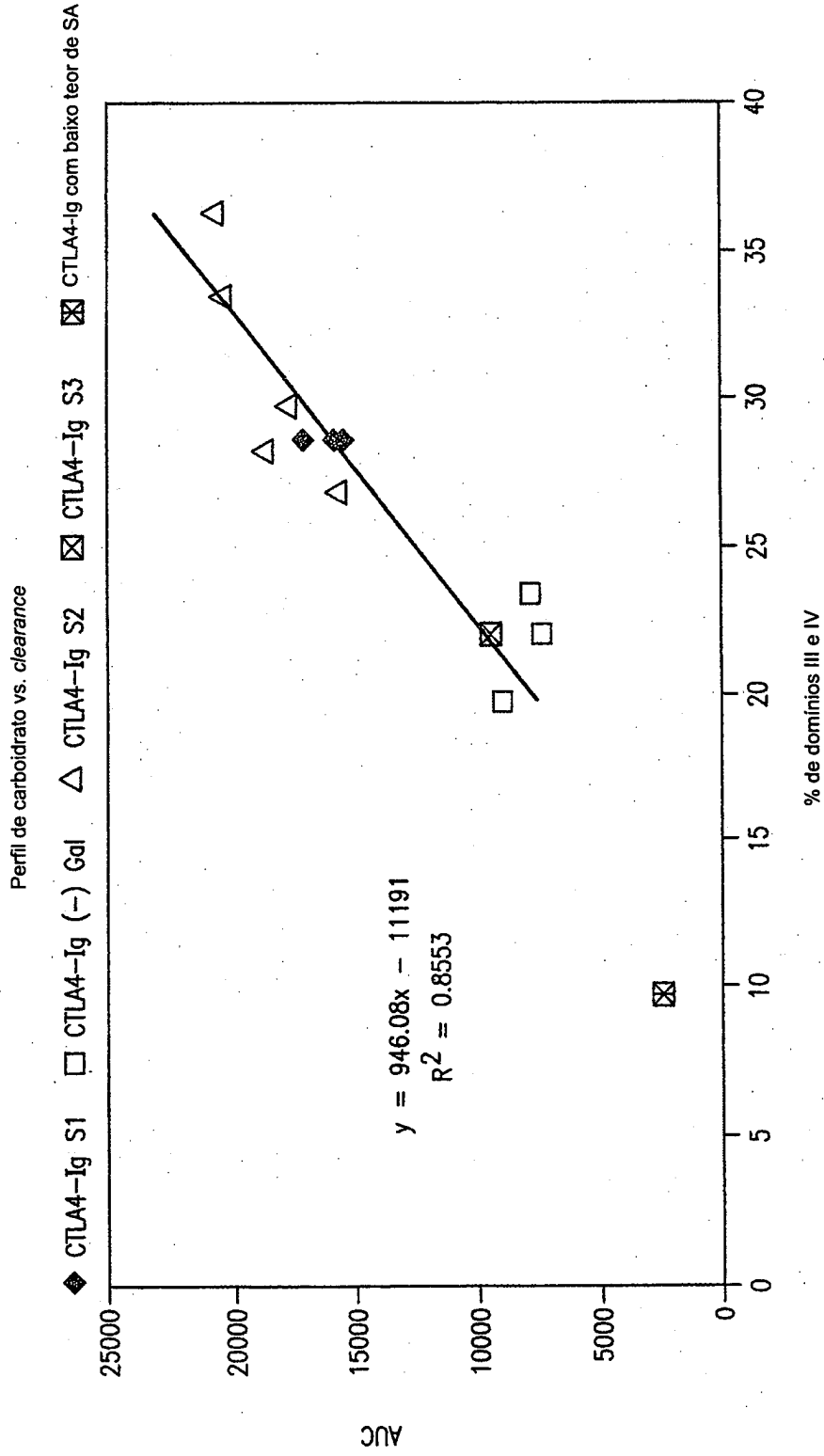


FIG. 52

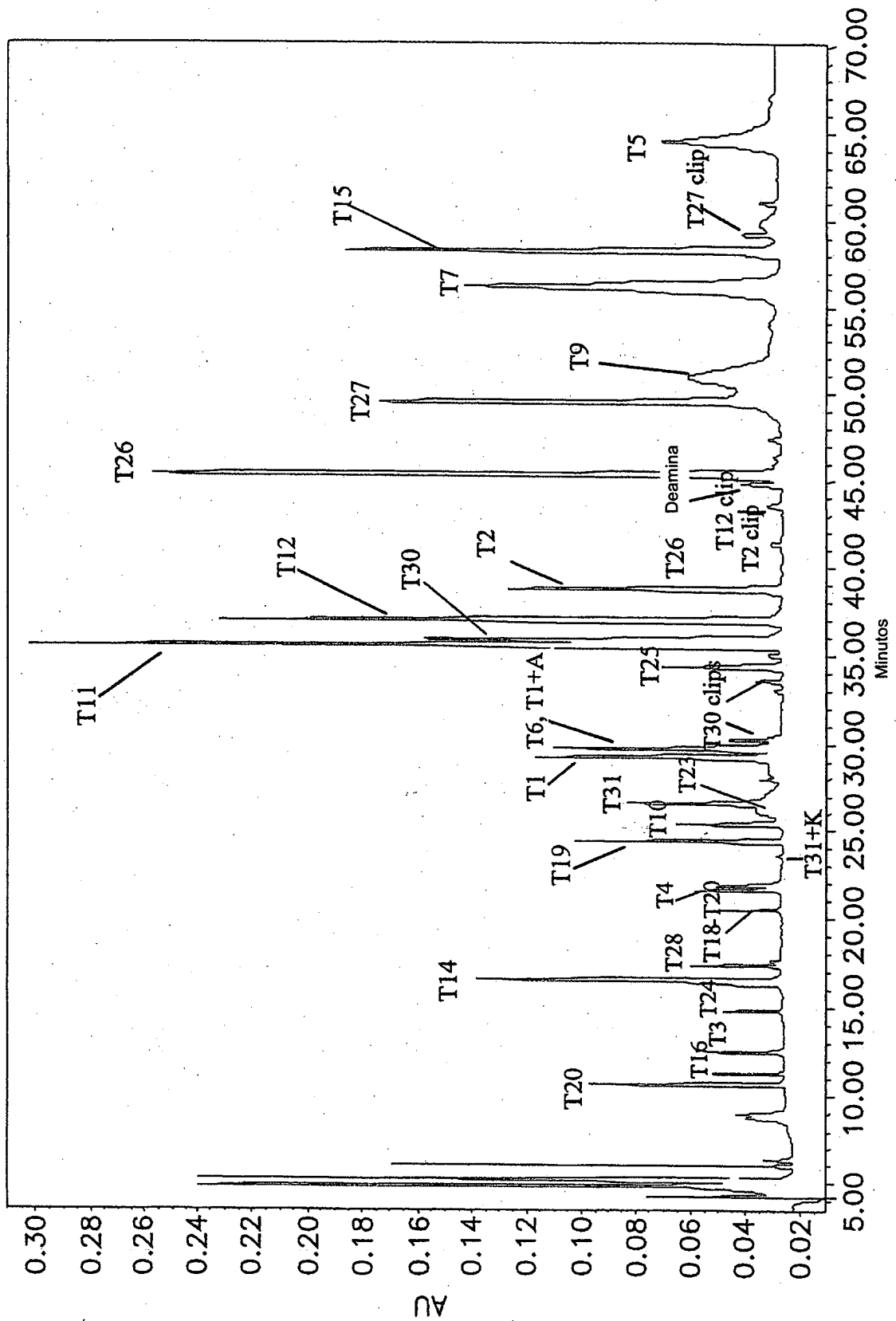


FIG. 53

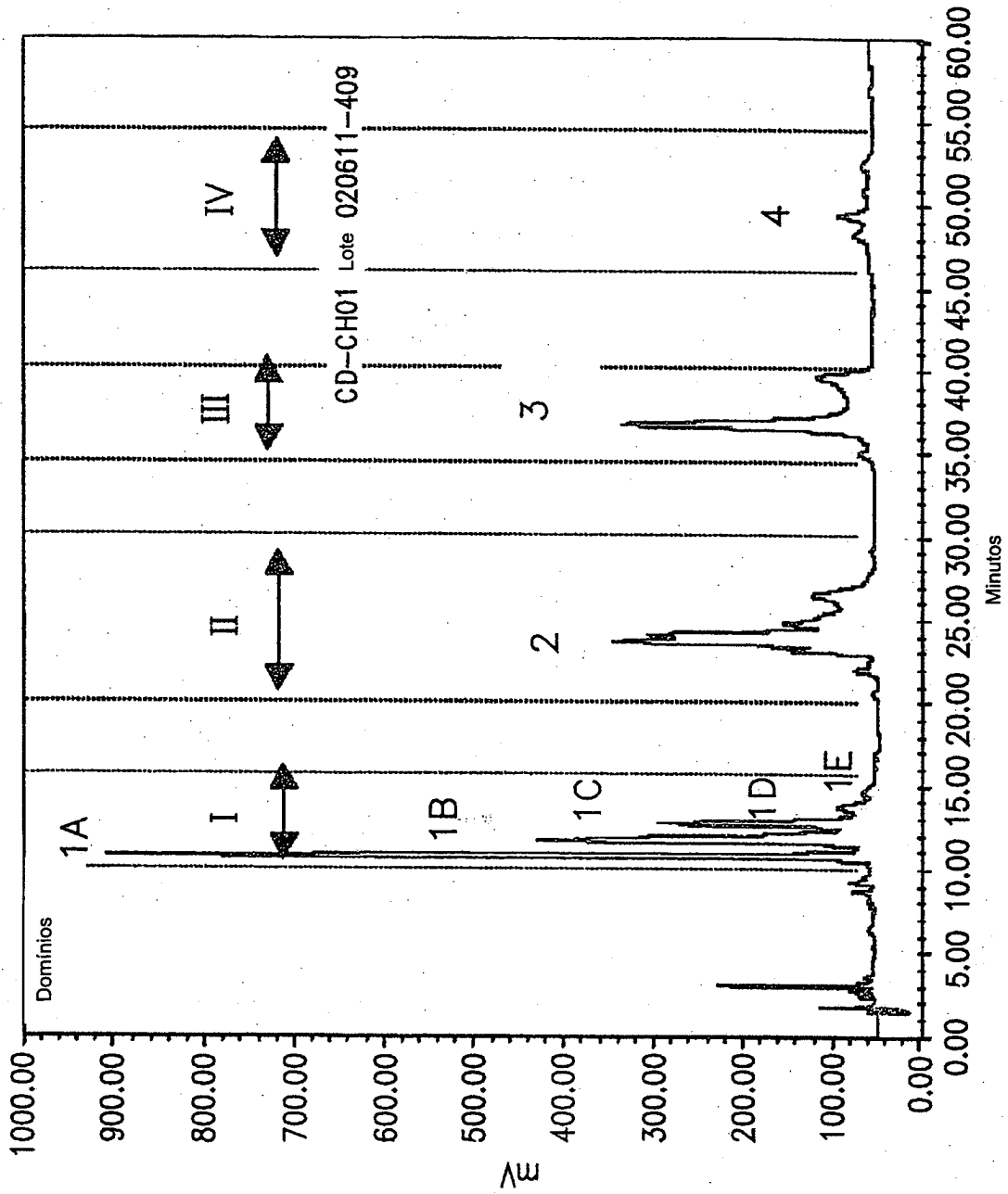


FIG. 54

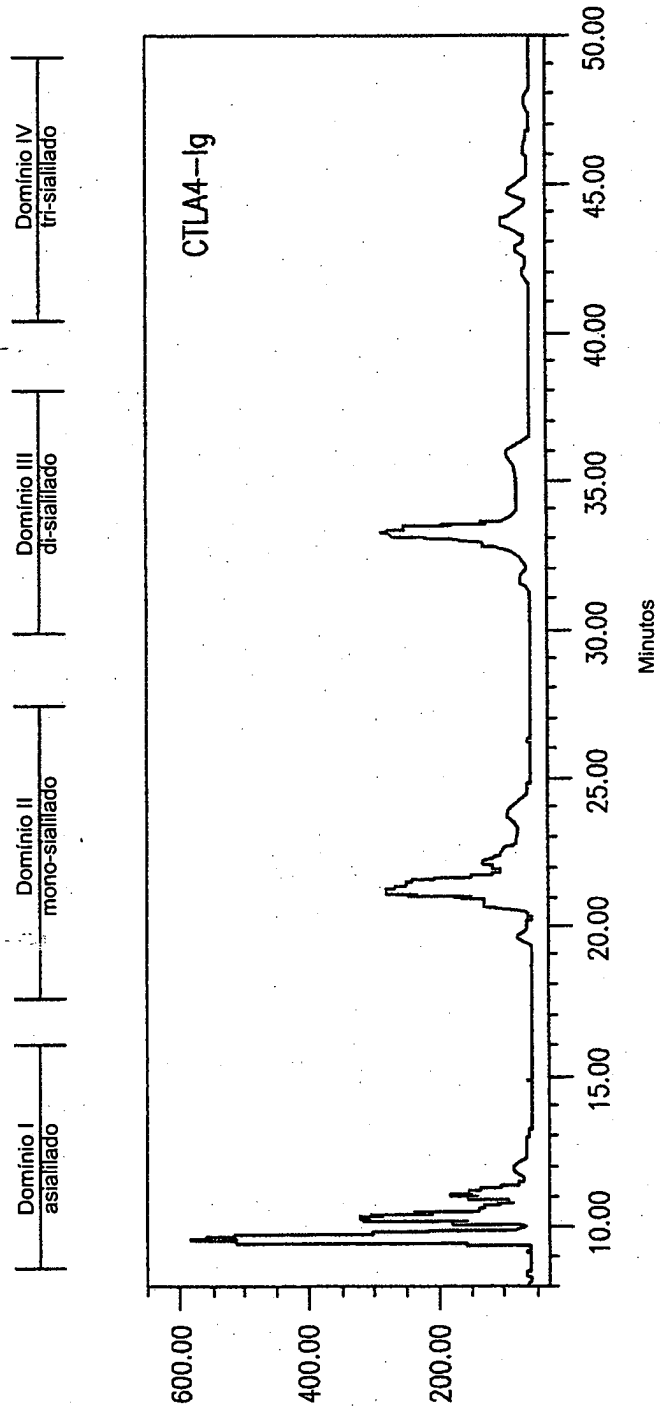


FIG. 55A

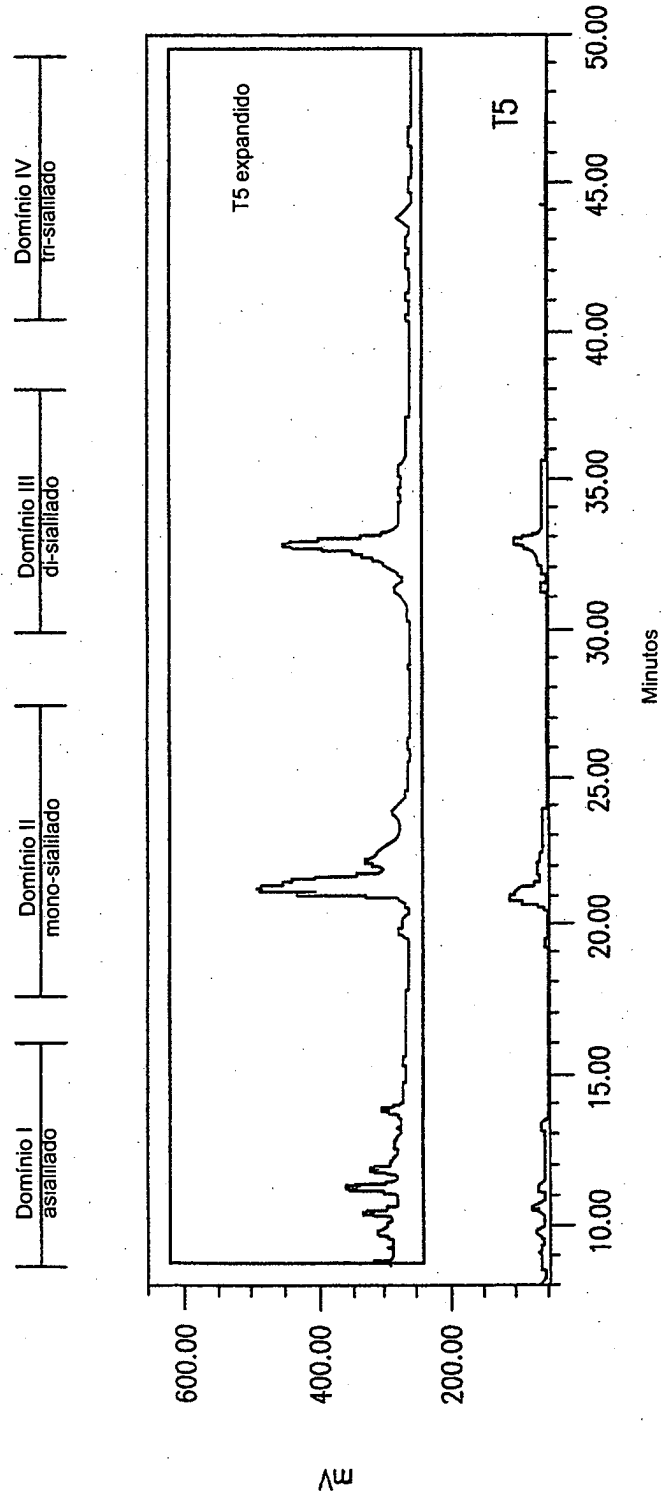


FIG. 55B

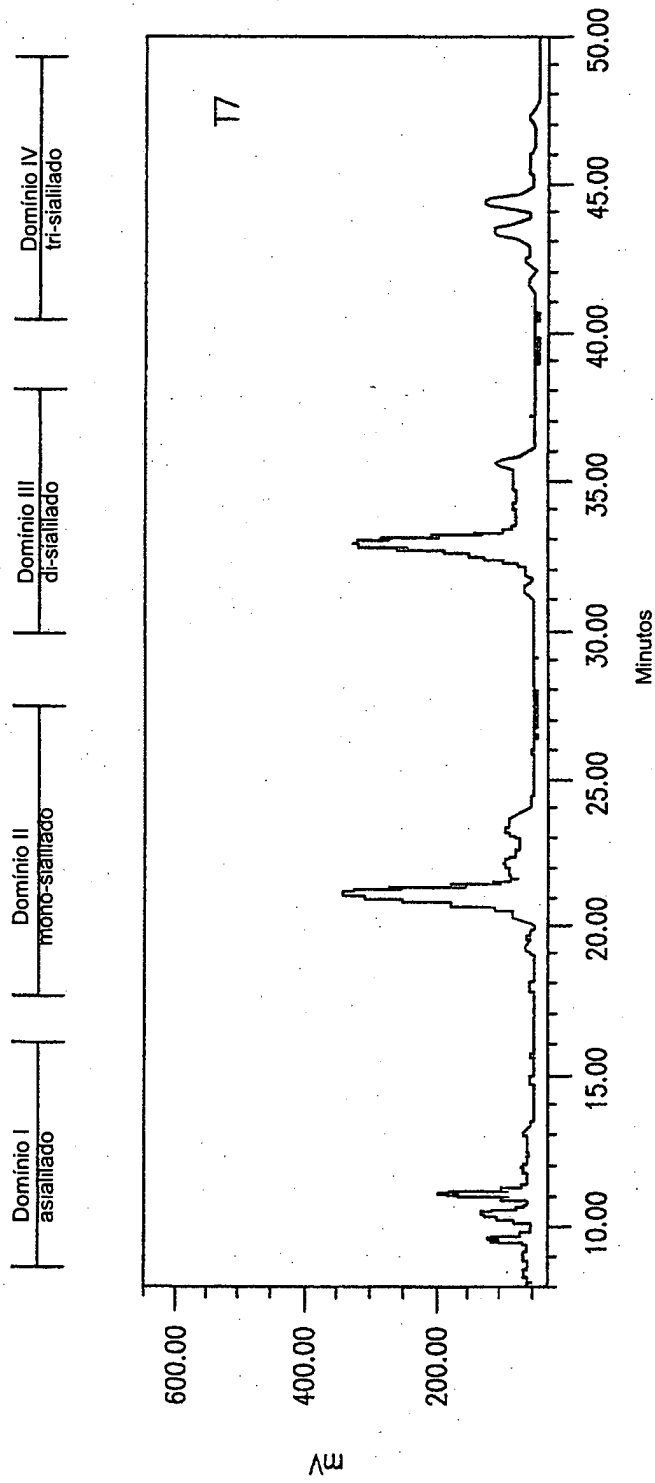


FIG. 55C

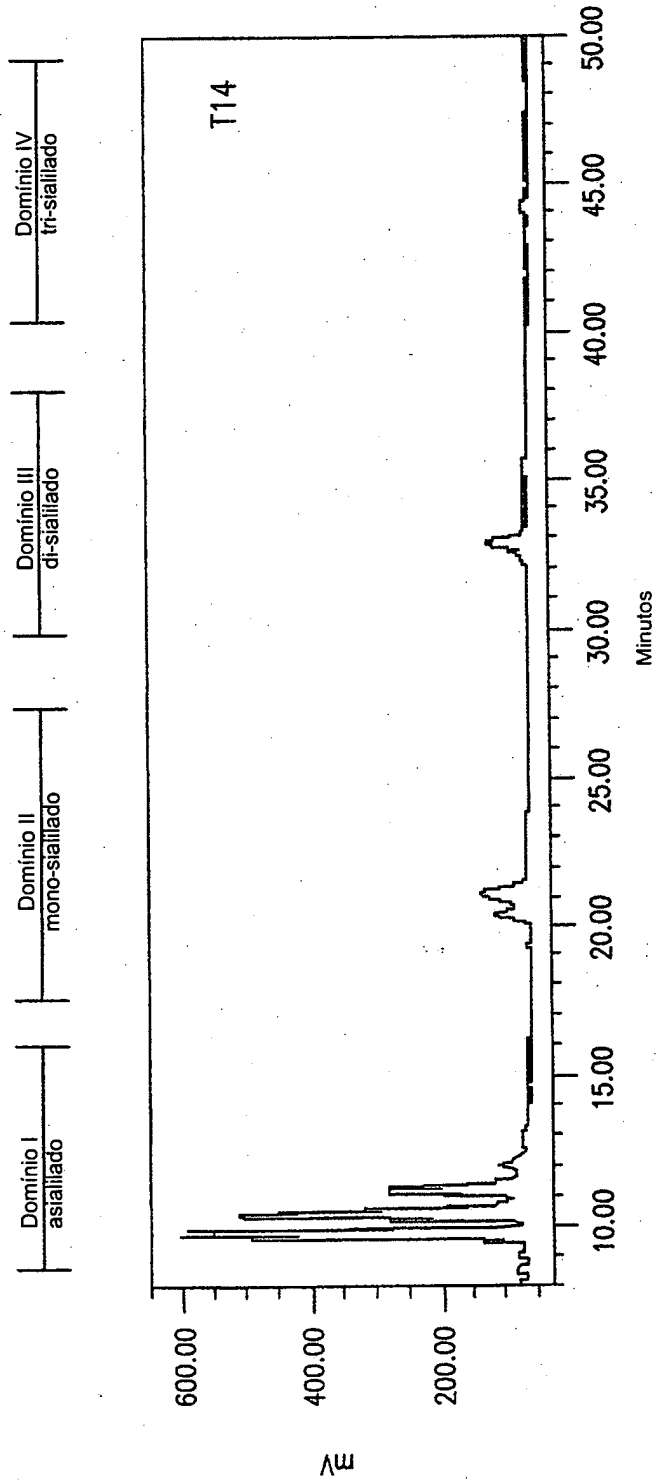


FIG. 55D

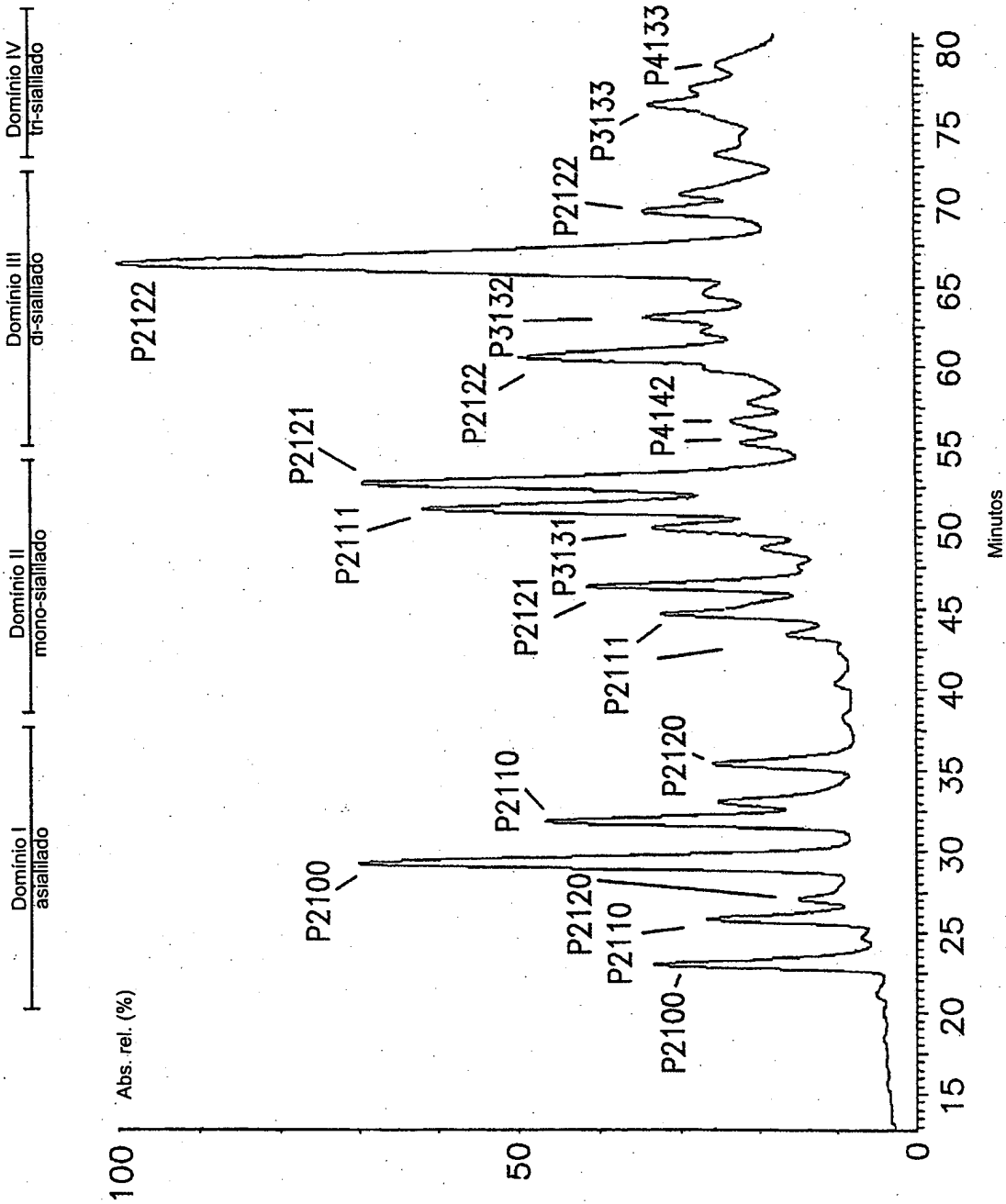


FIG. 56

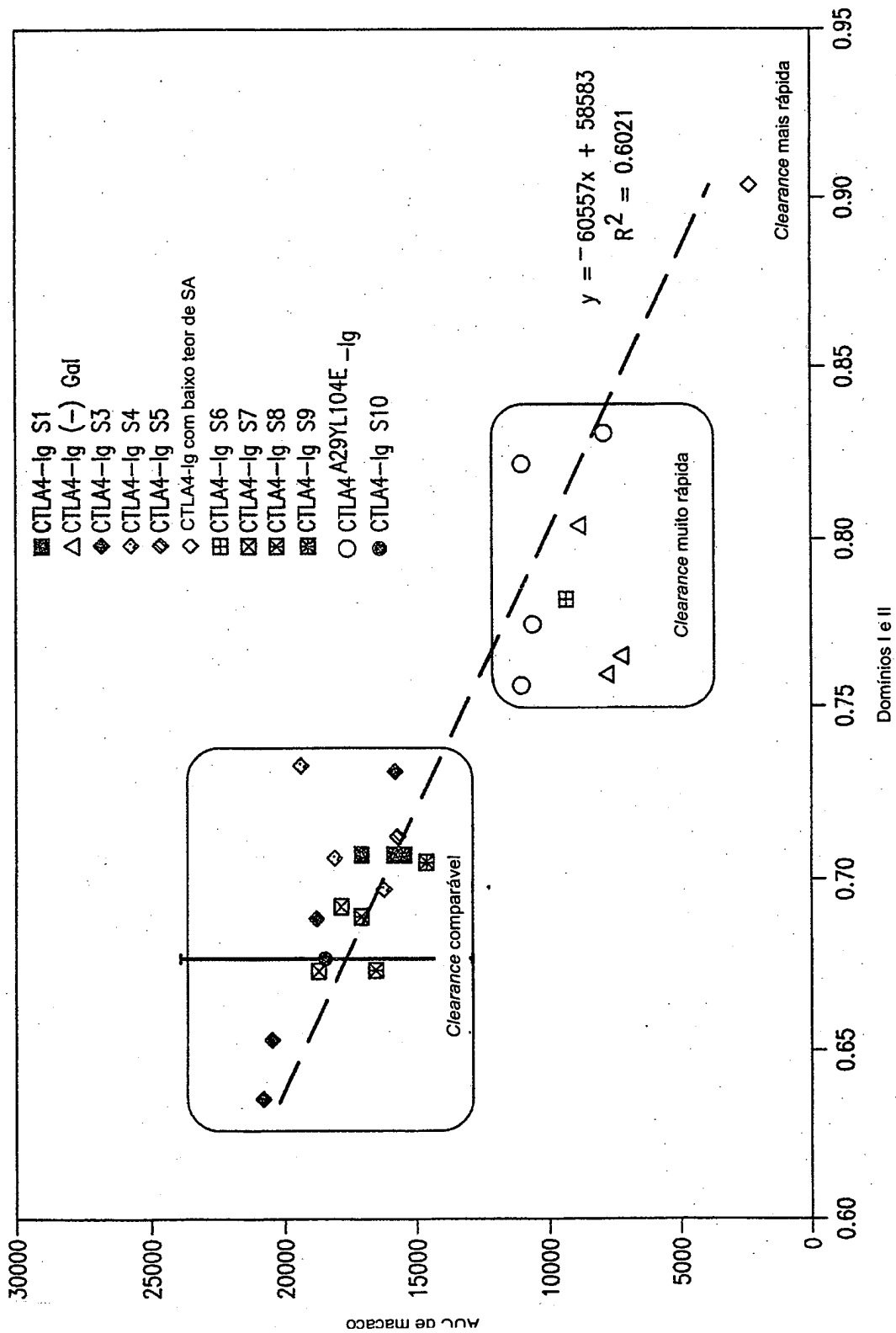


FIG. 57

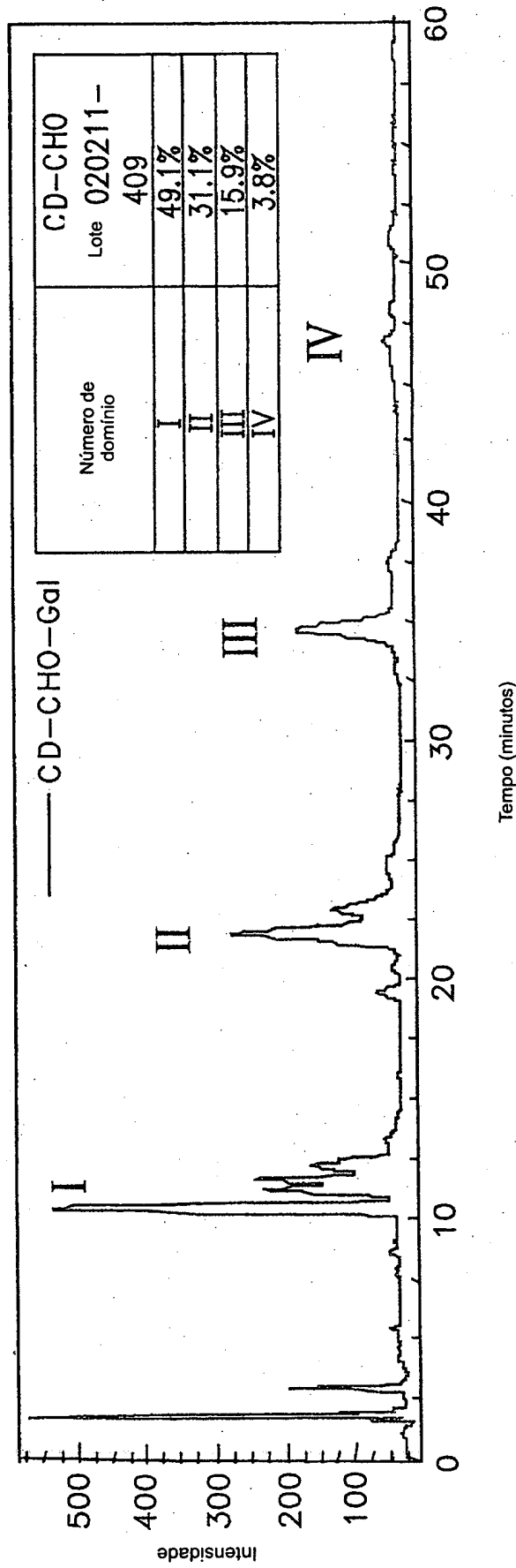


FIG. 58A

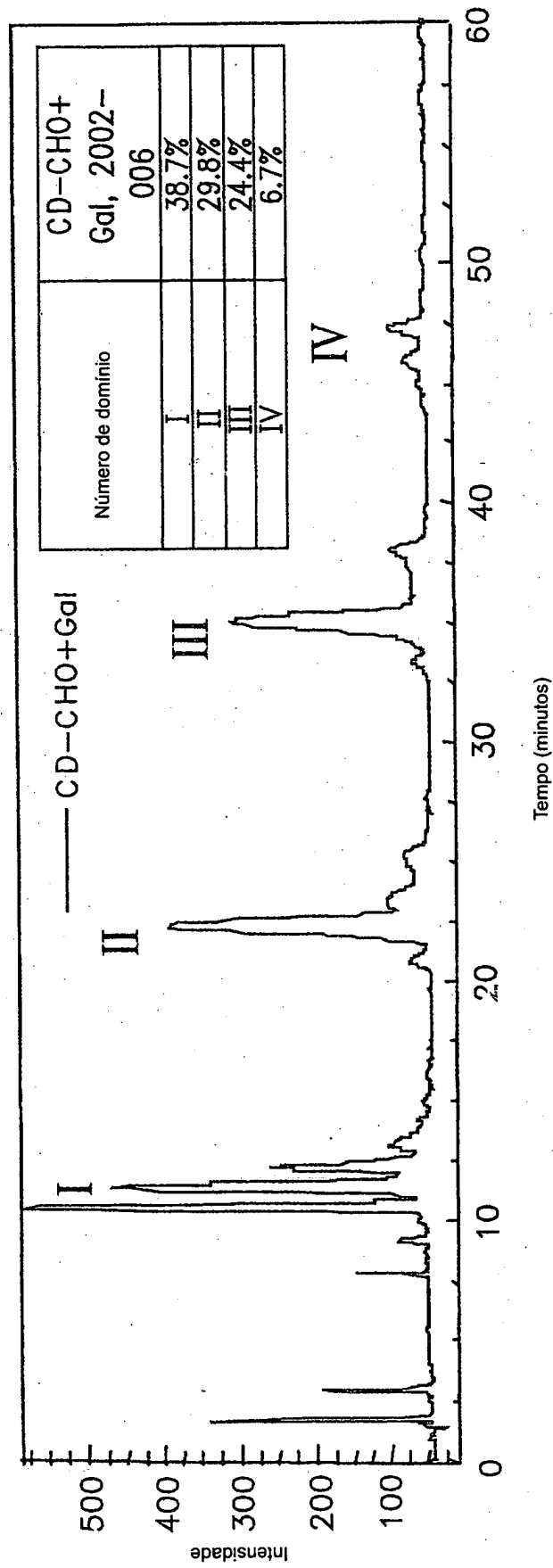


FIG. 58B

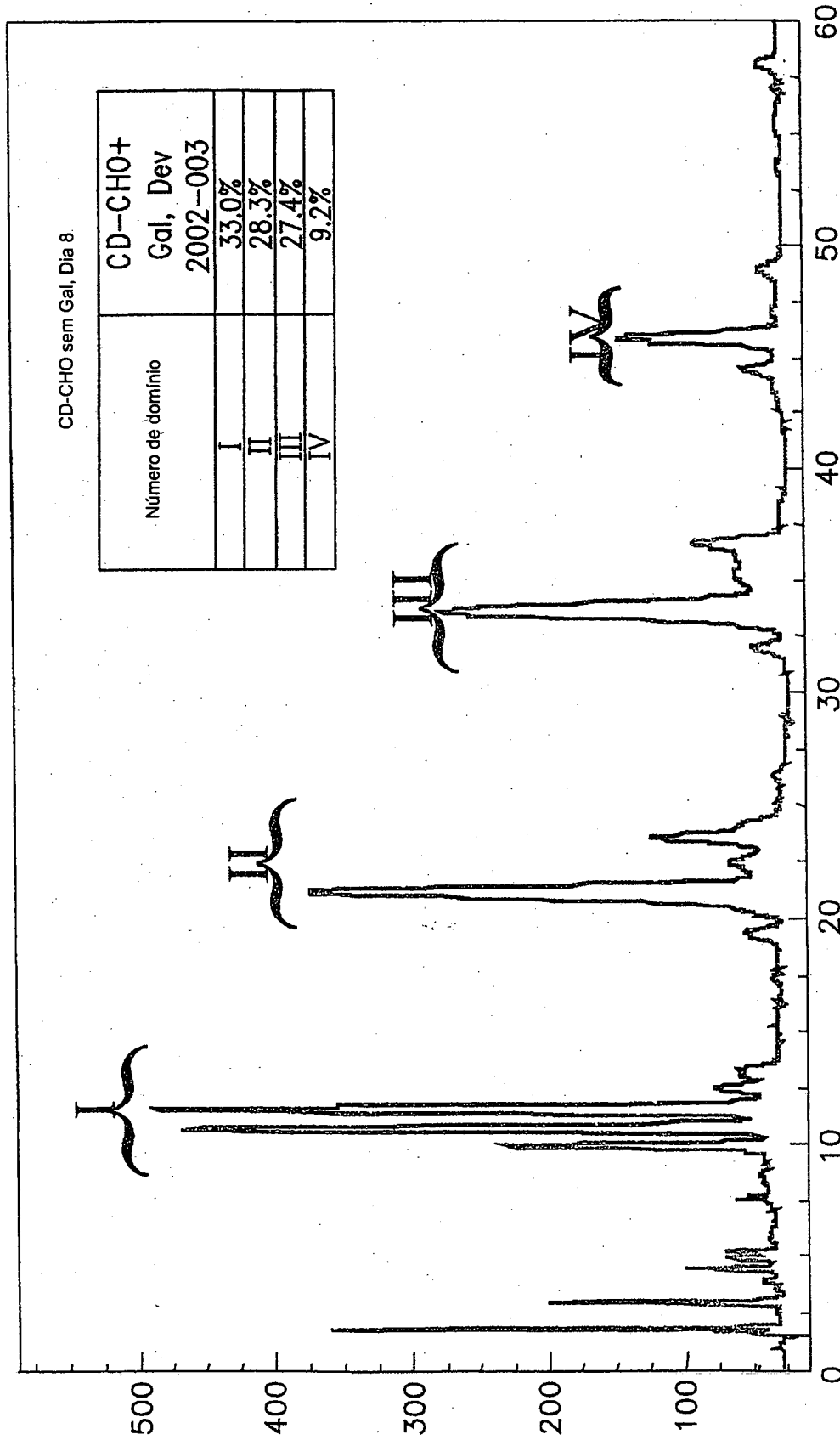


FIG. 59

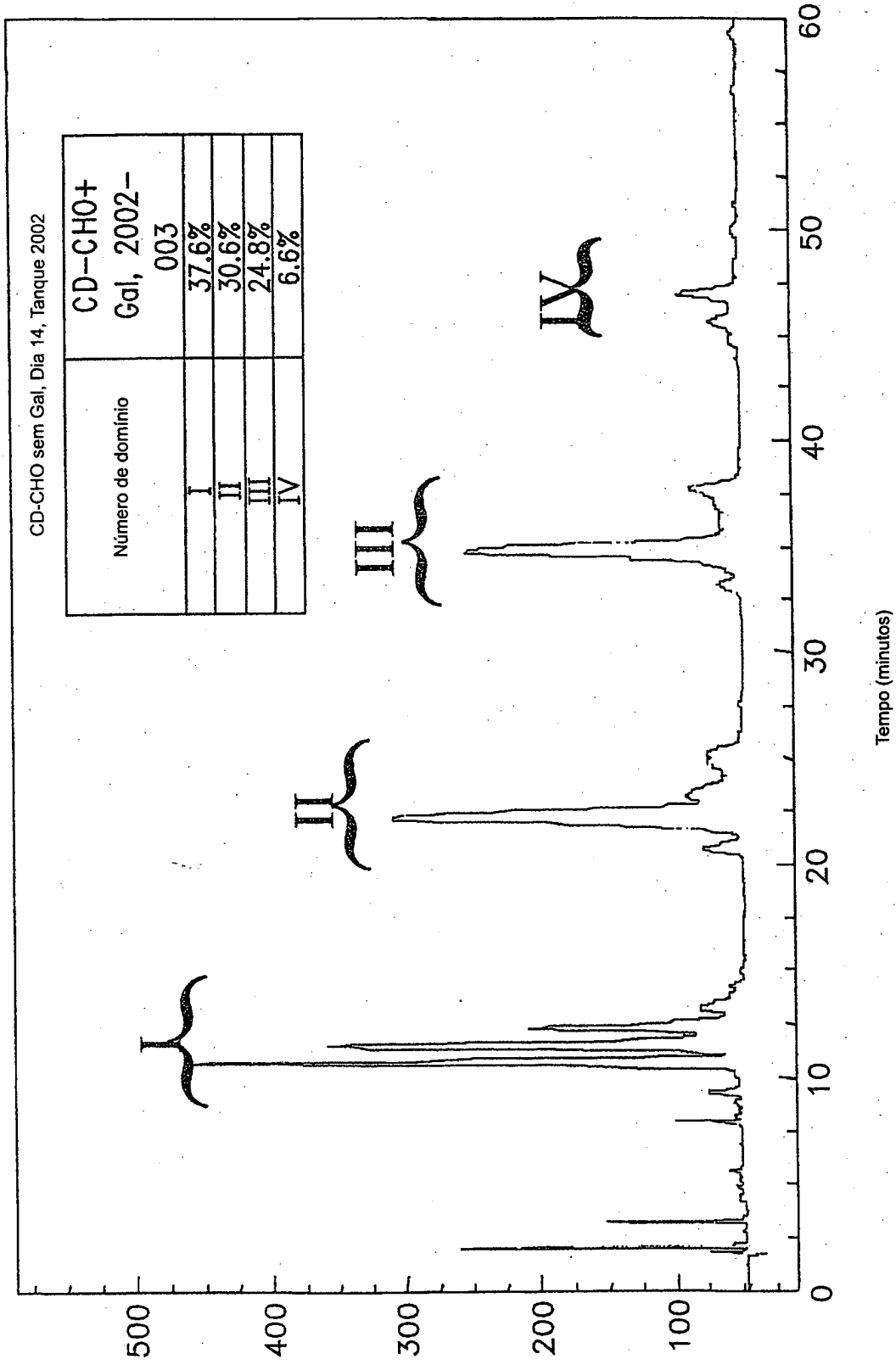


FIG. 60

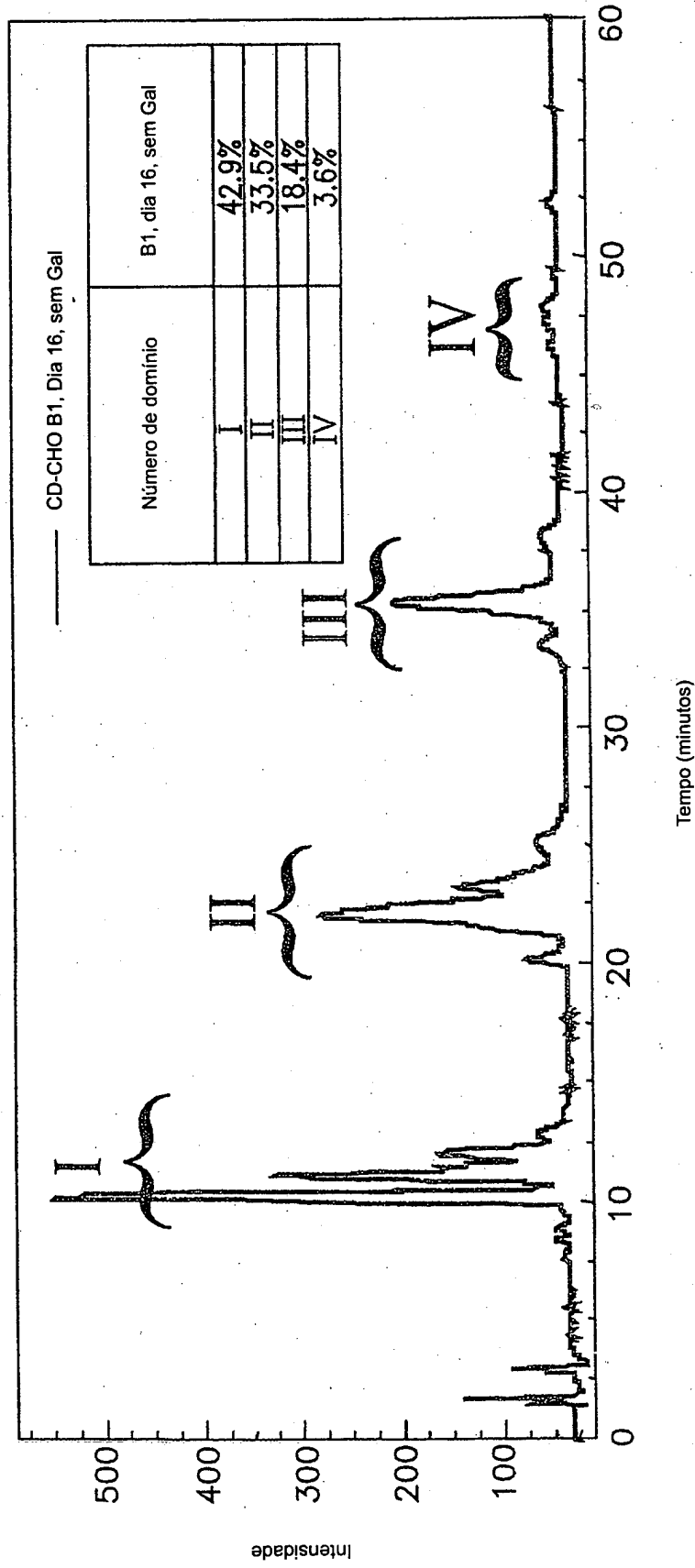


FIG. 61A

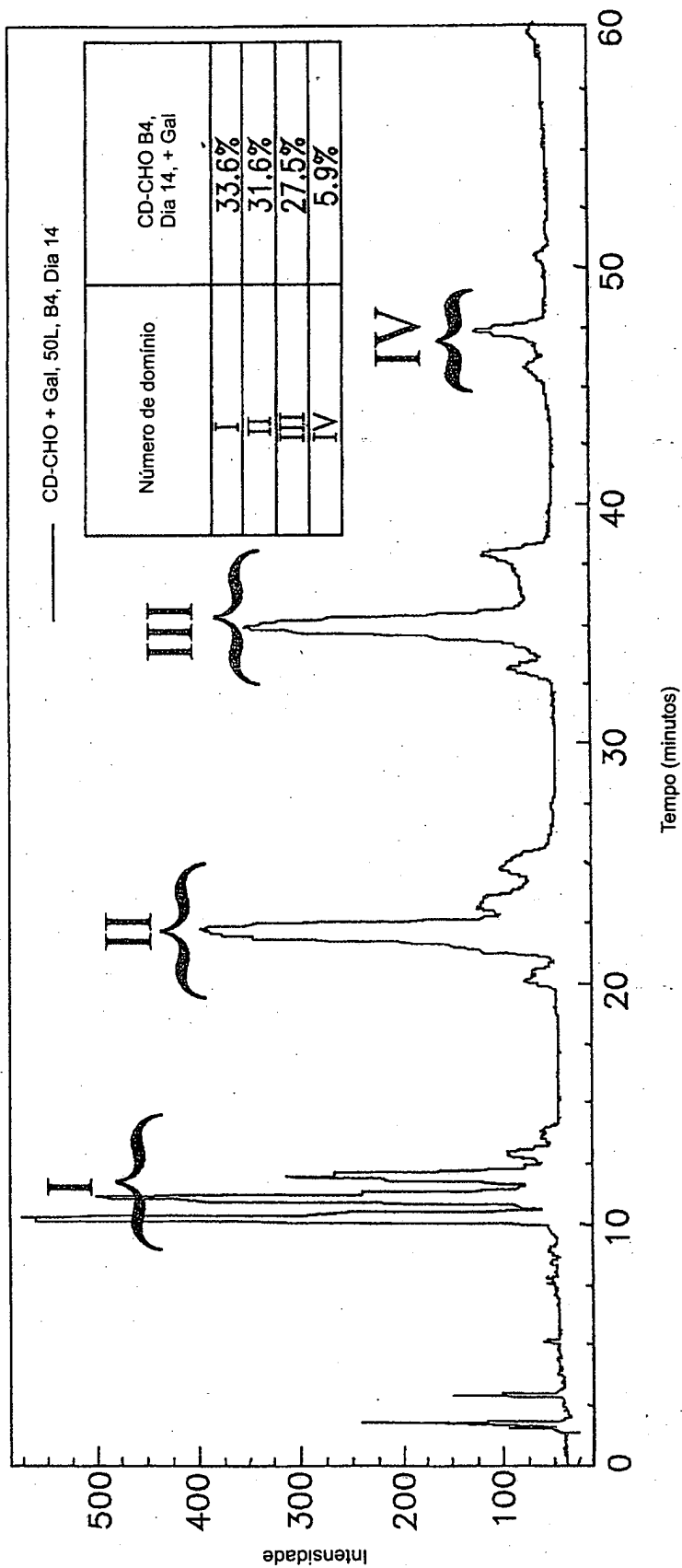


FIG. 61B

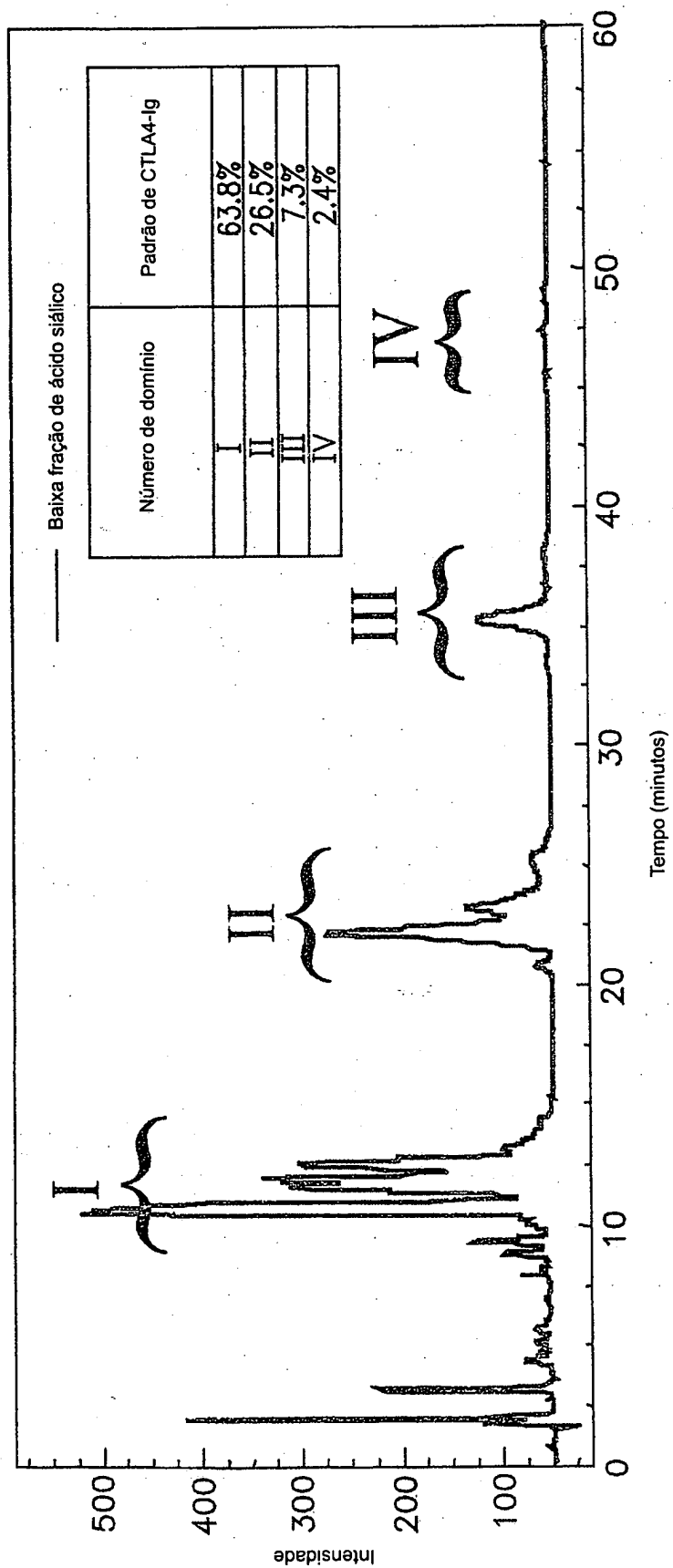


FIG. 62

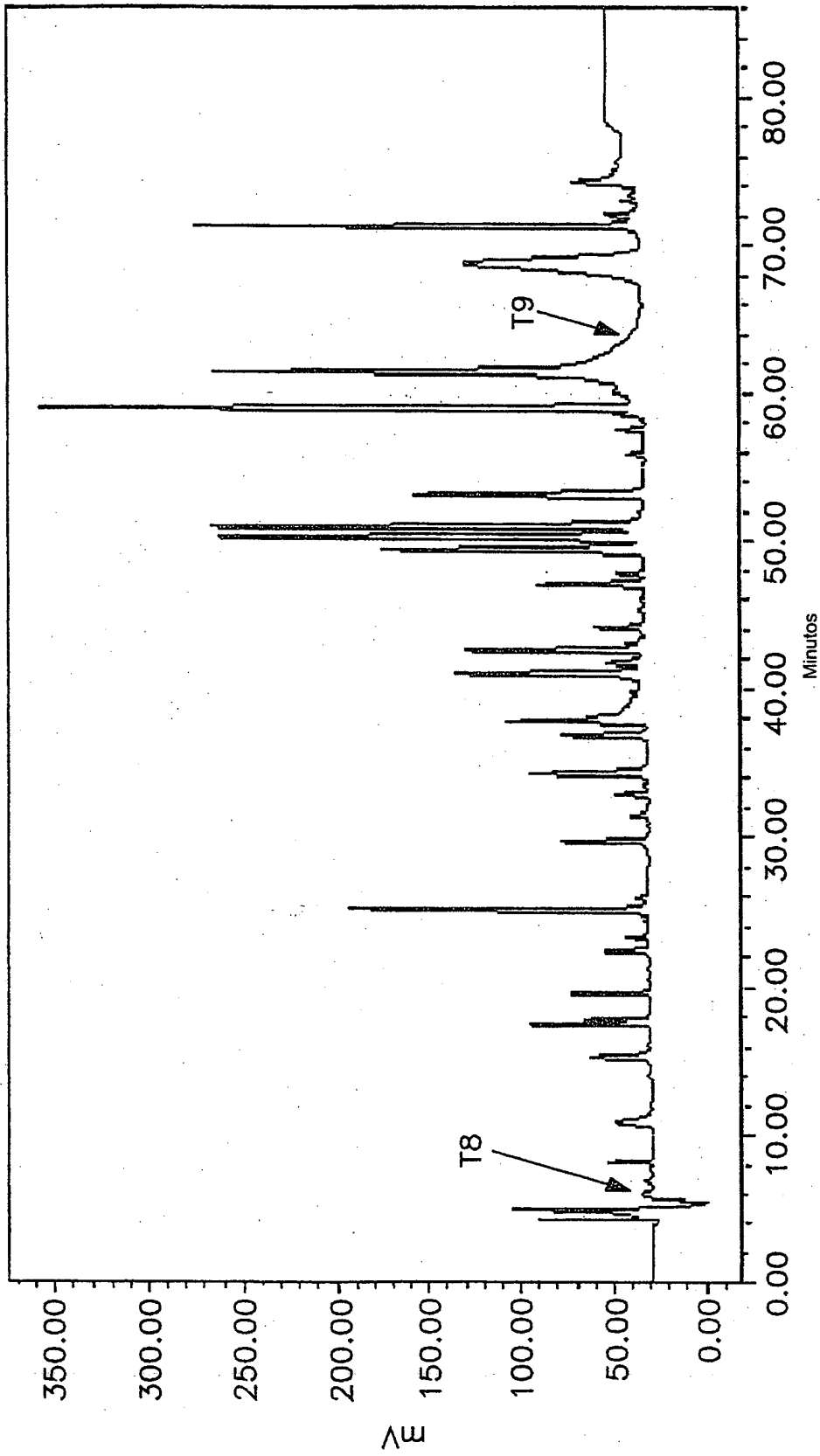


FIG. 63

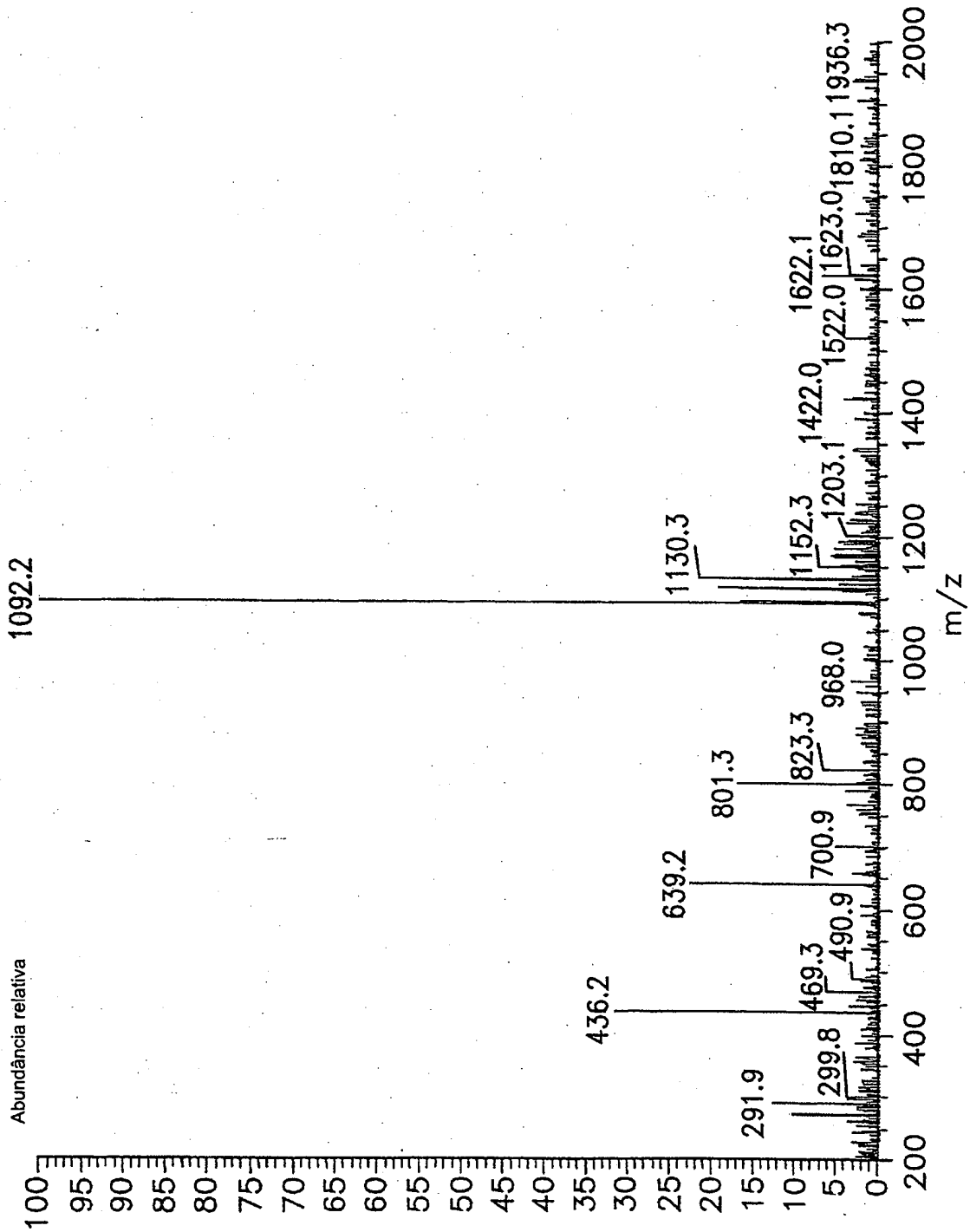


FIG. 64

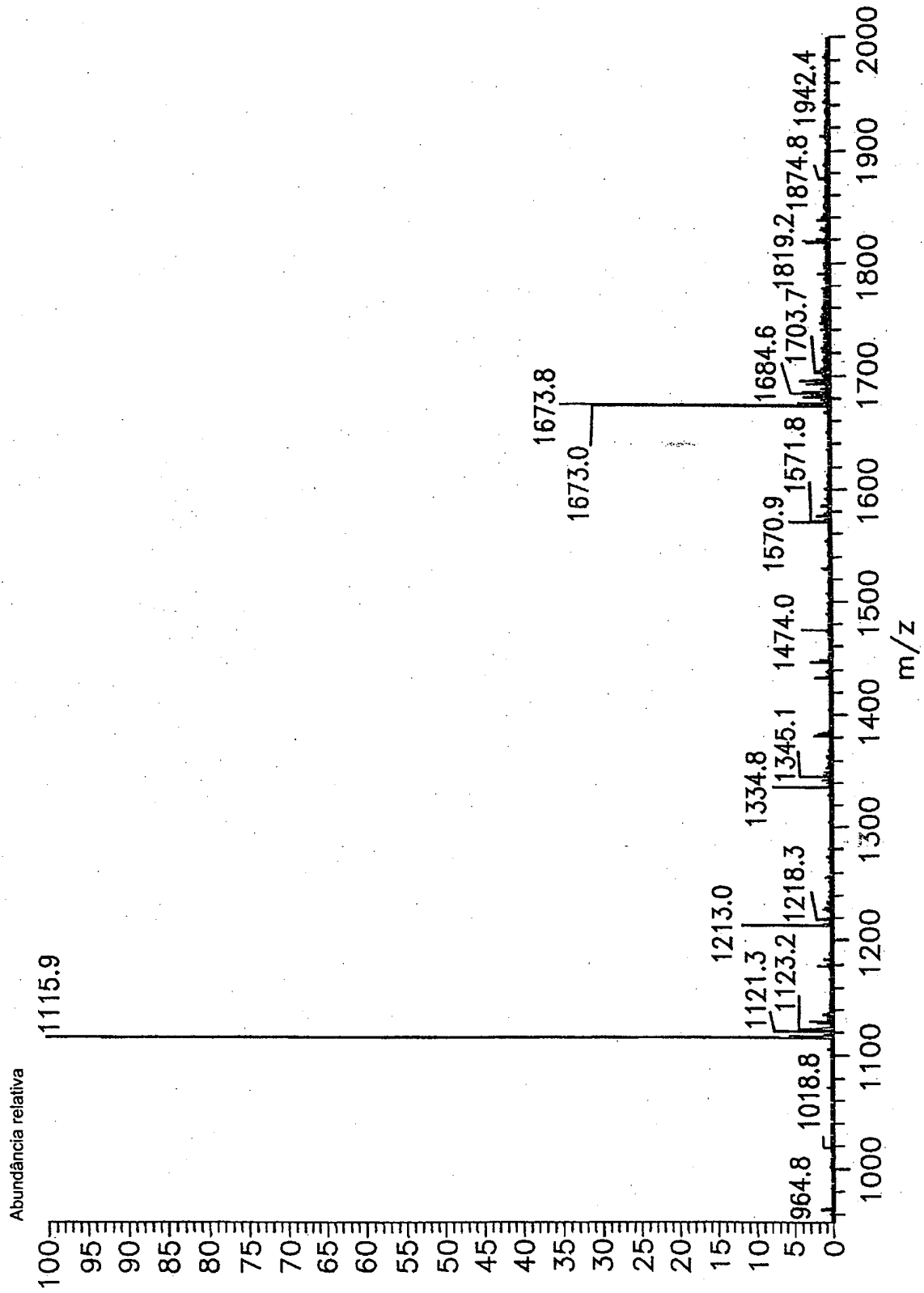


FIG. 65

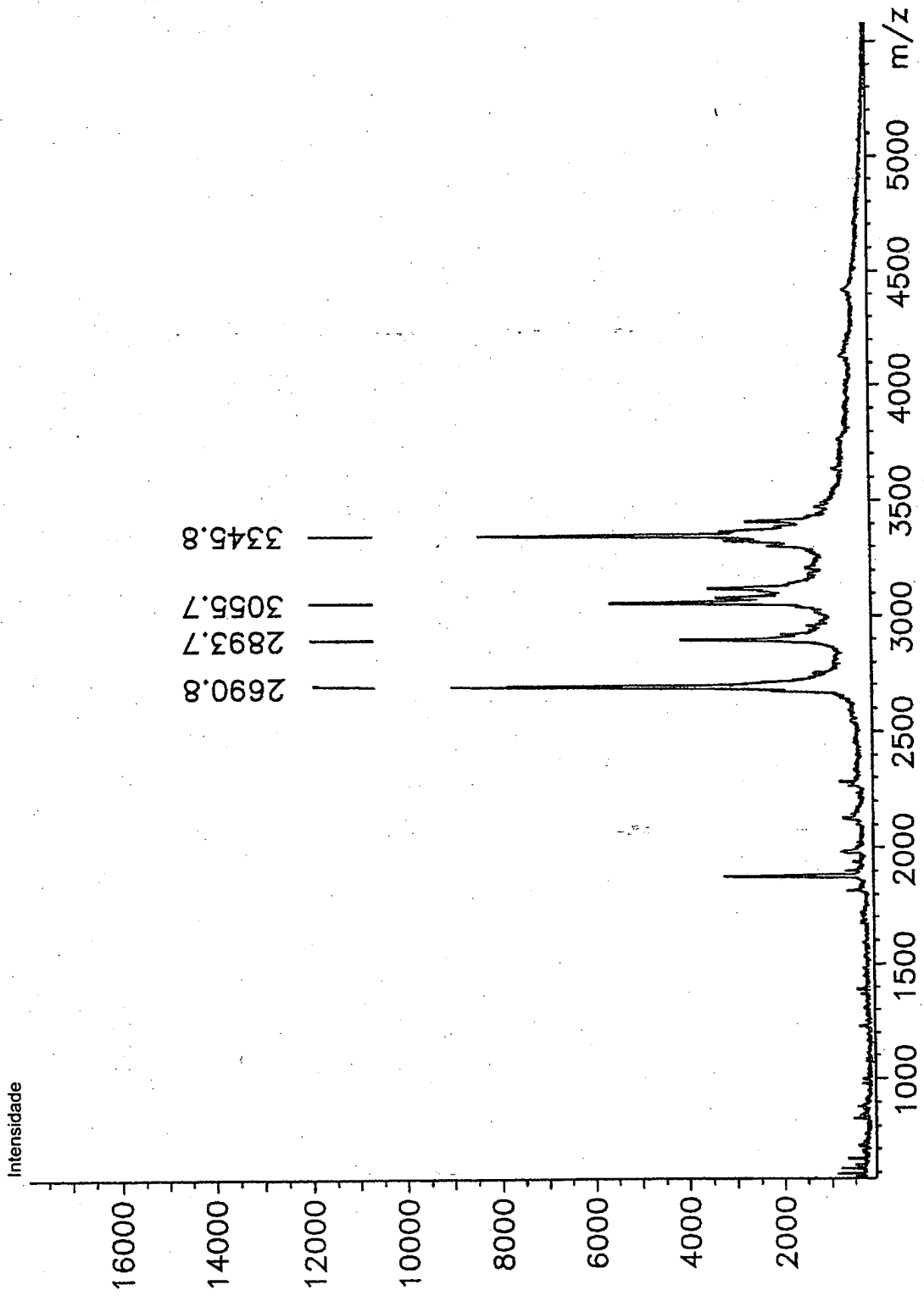


FIG. 66

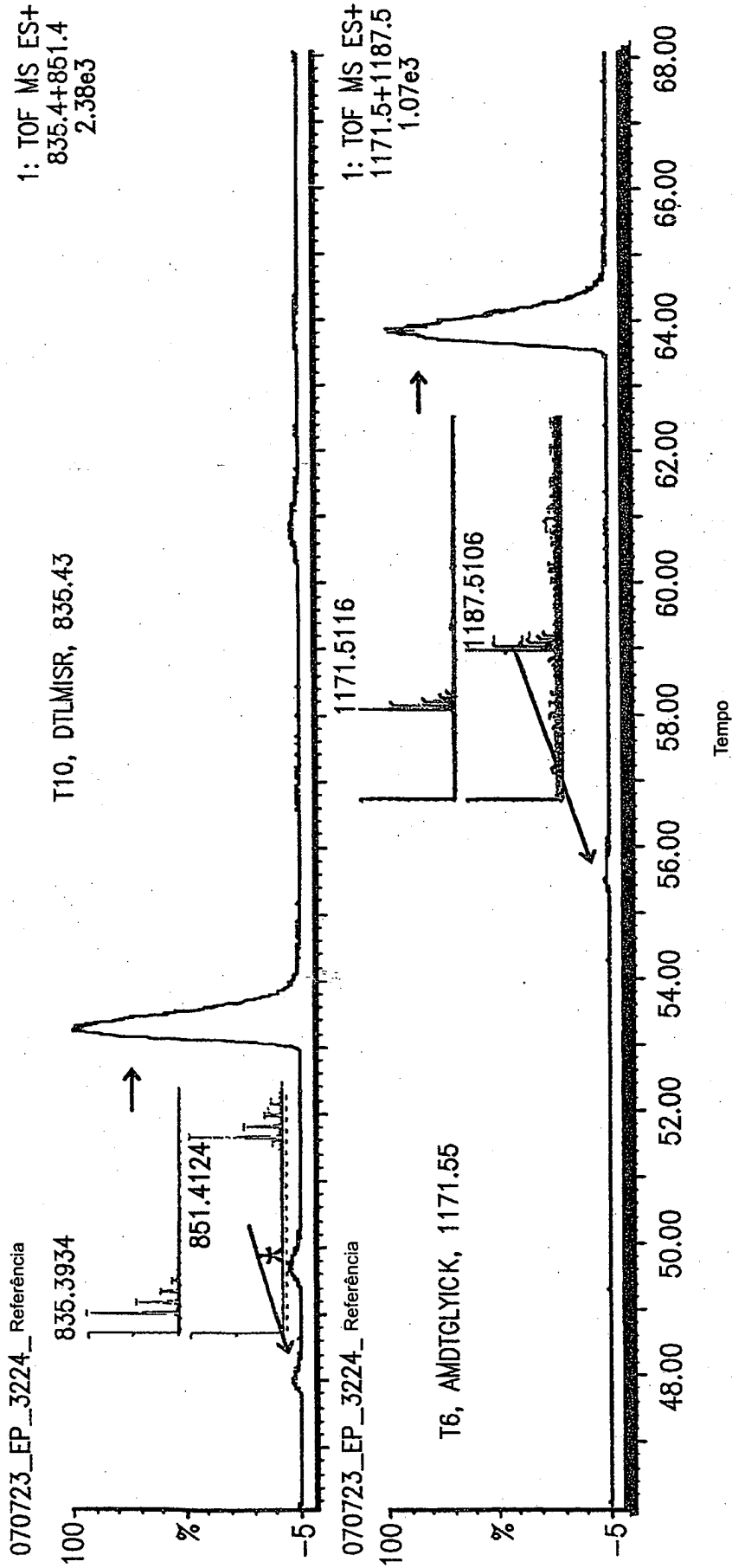


FIG. 67A

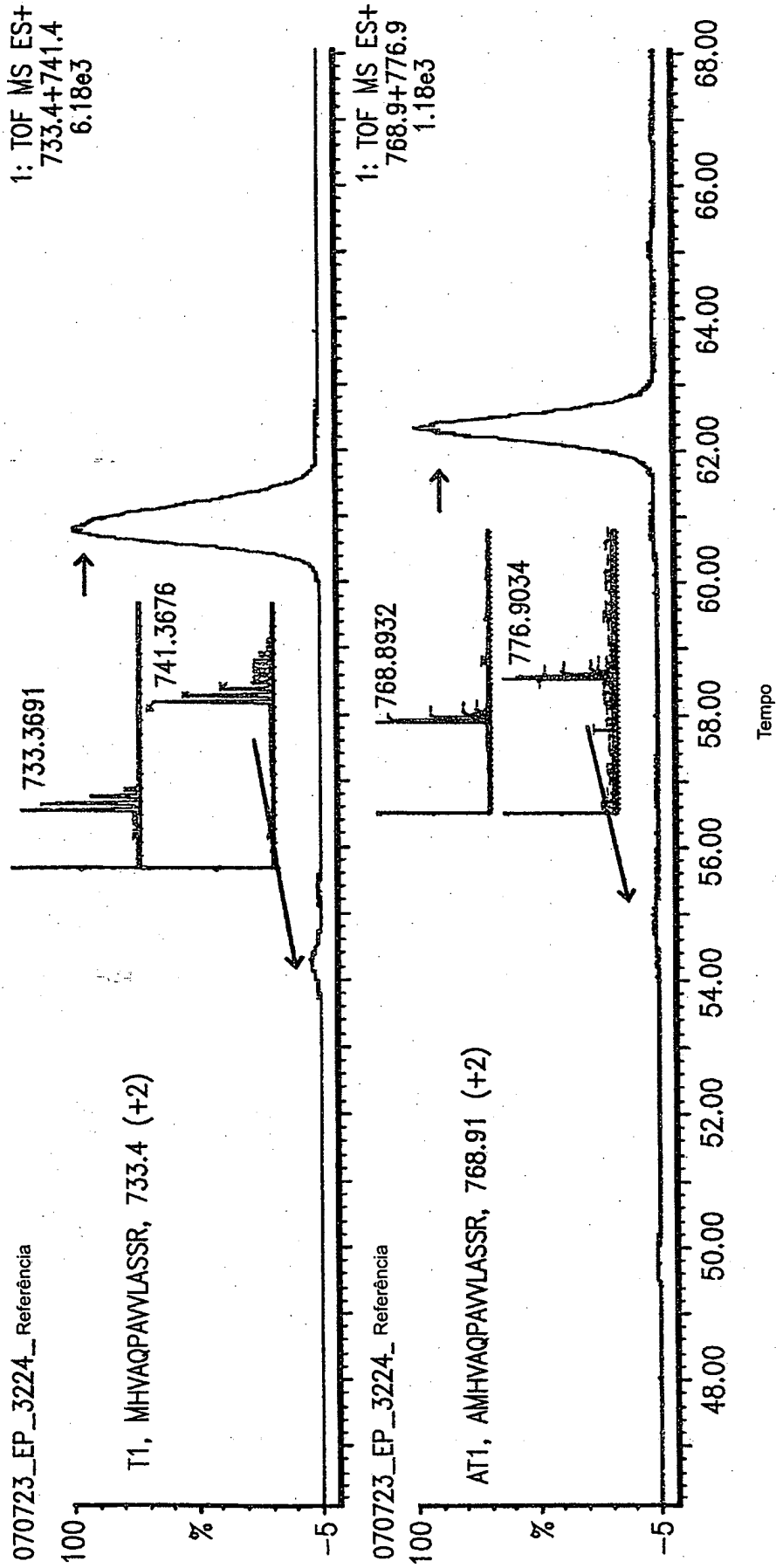


FIG. 67B

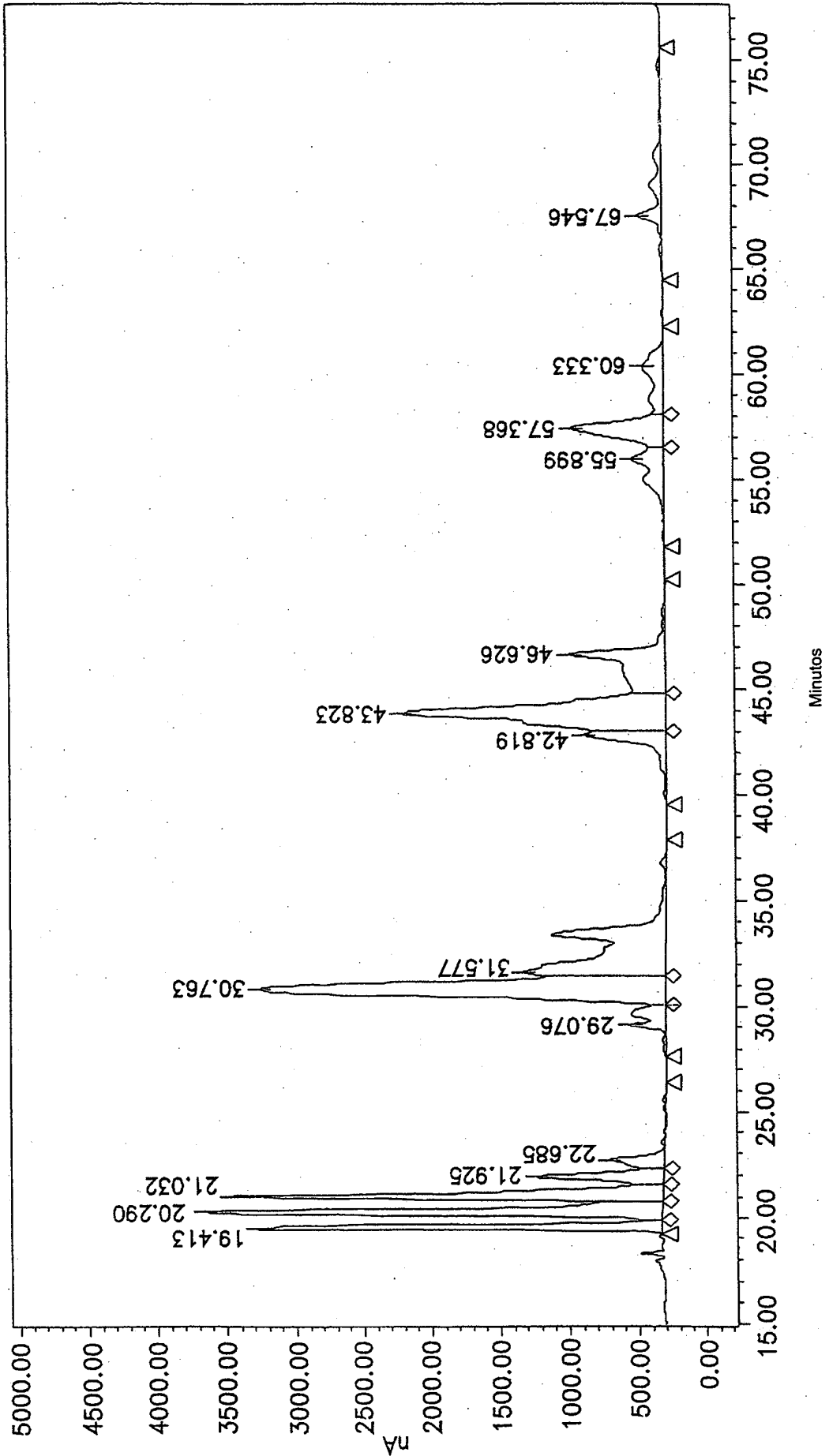


FIG. 68

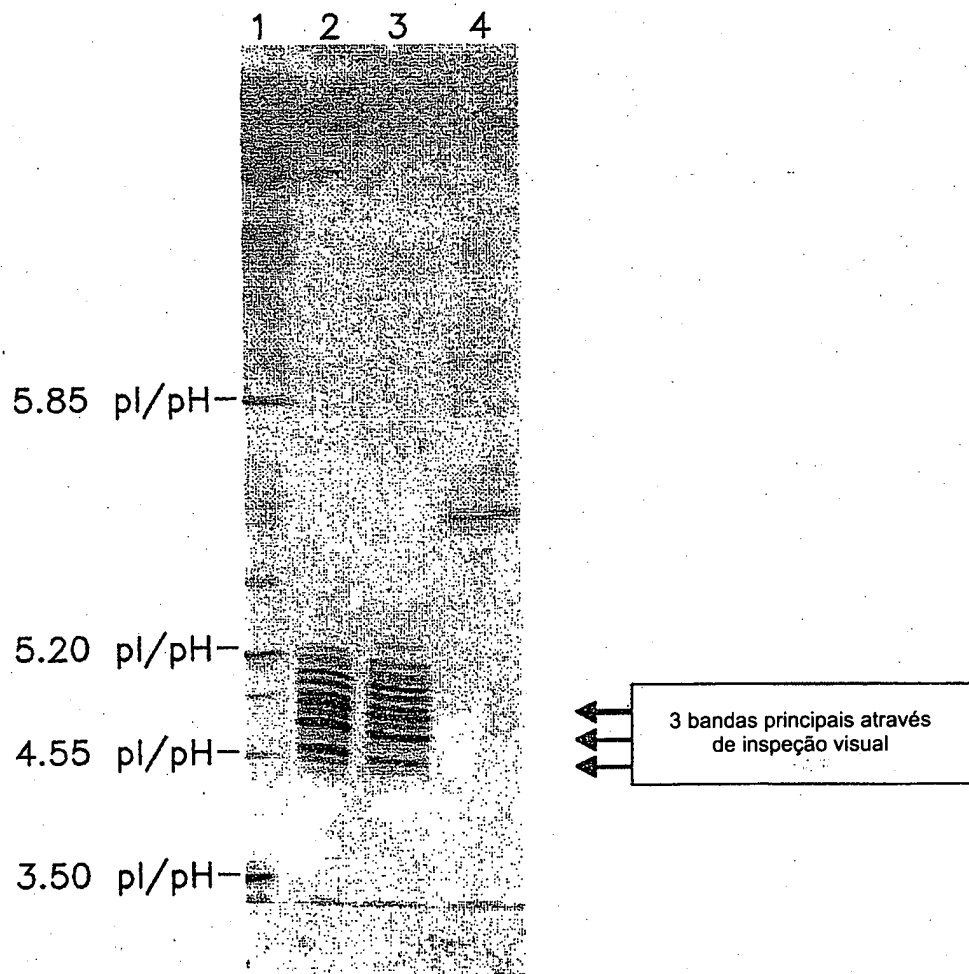


FIG. 69

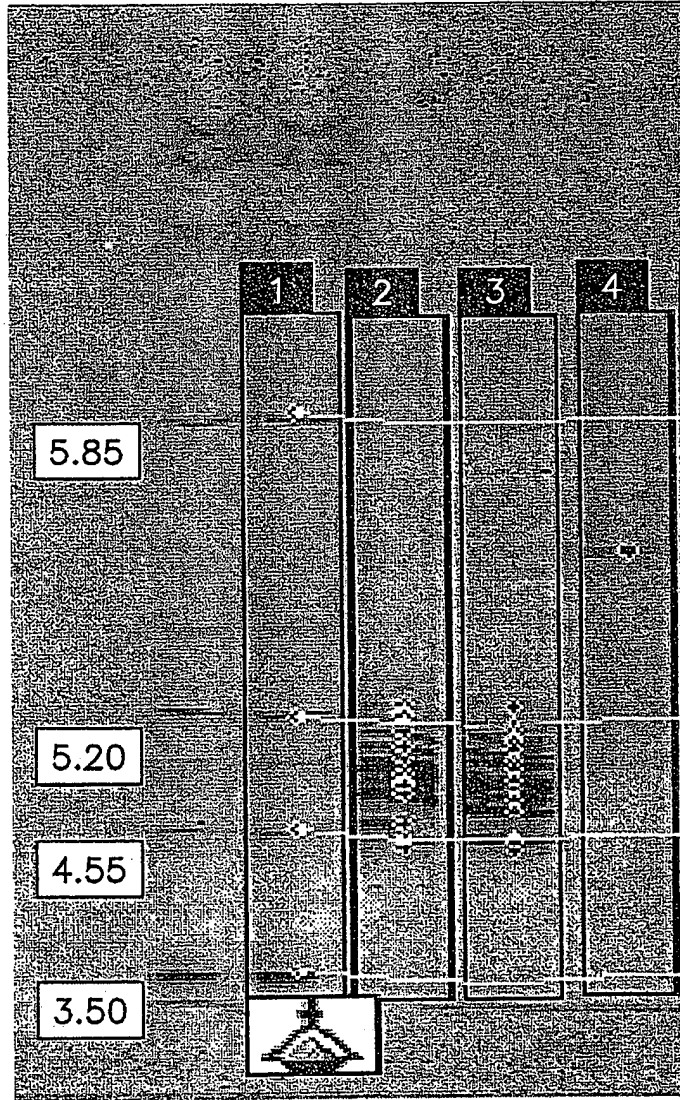


FIG. 70

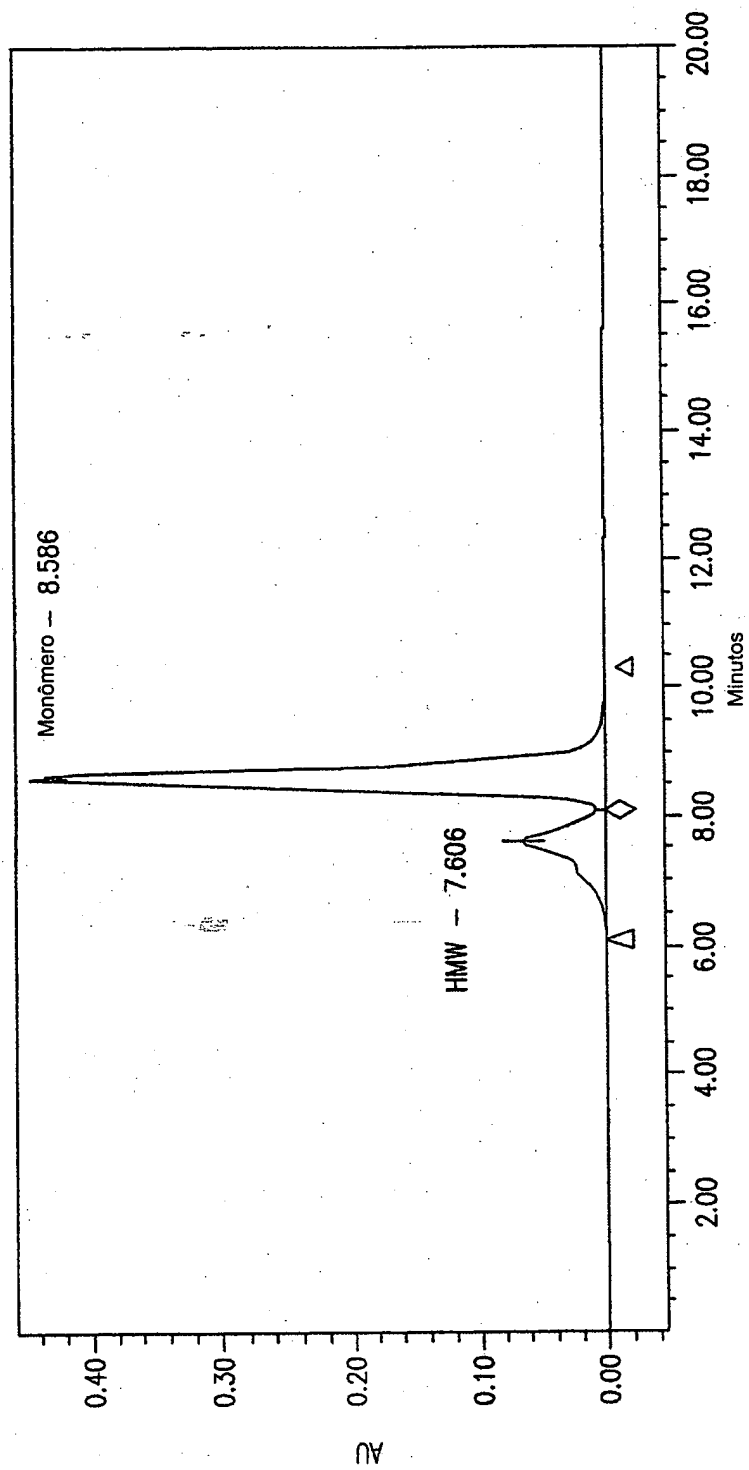


FIG. 71A

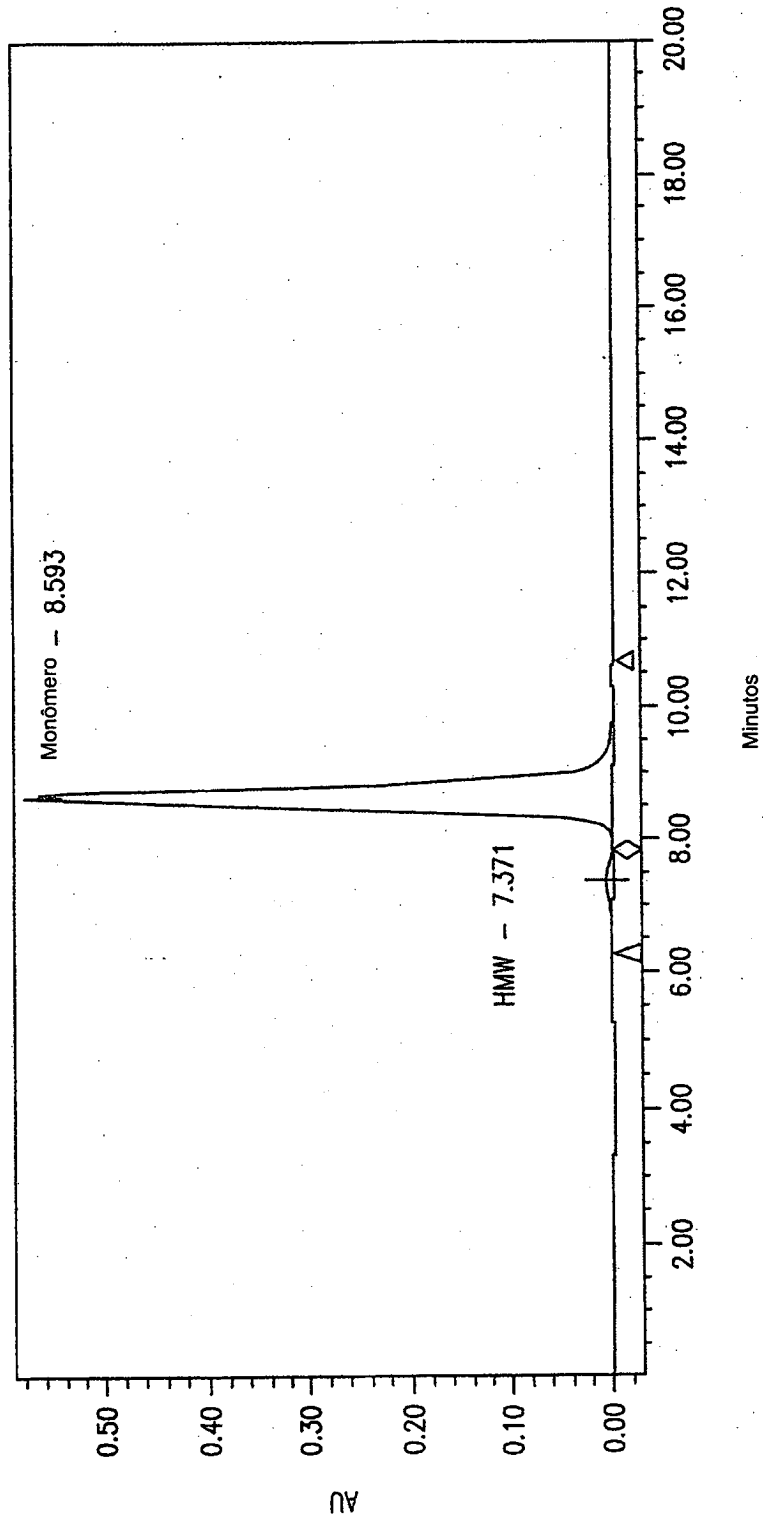


FIG. 71B

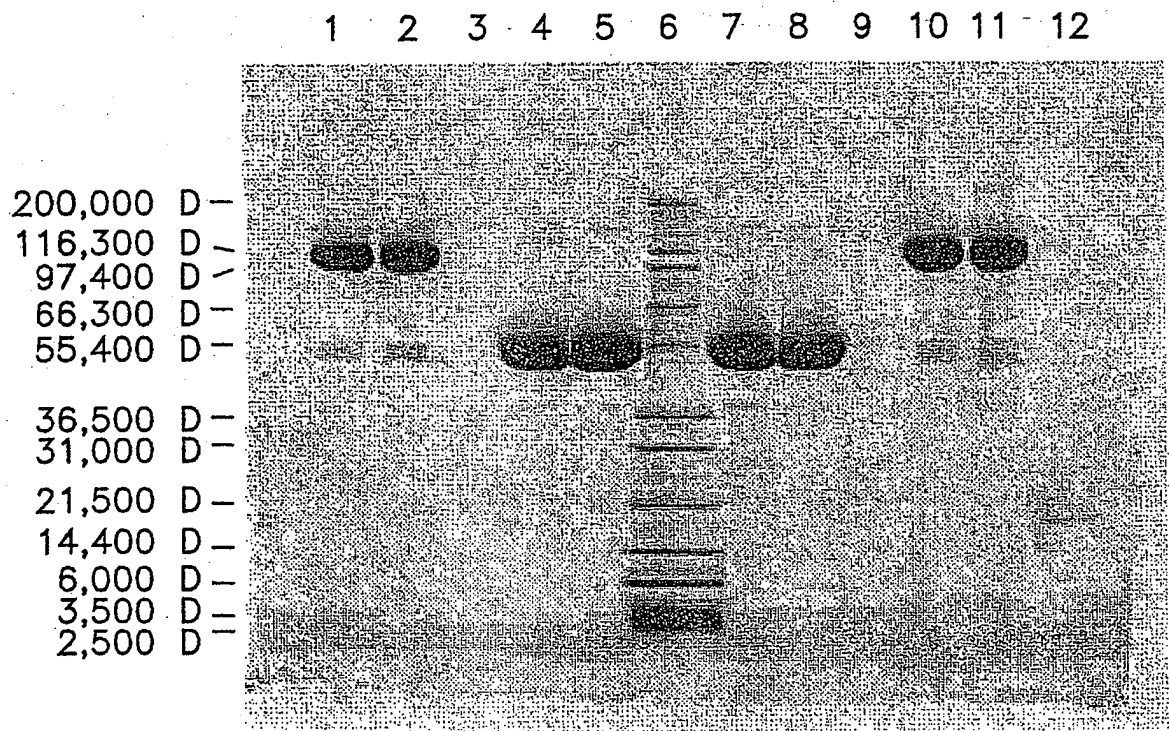


FIG. 72

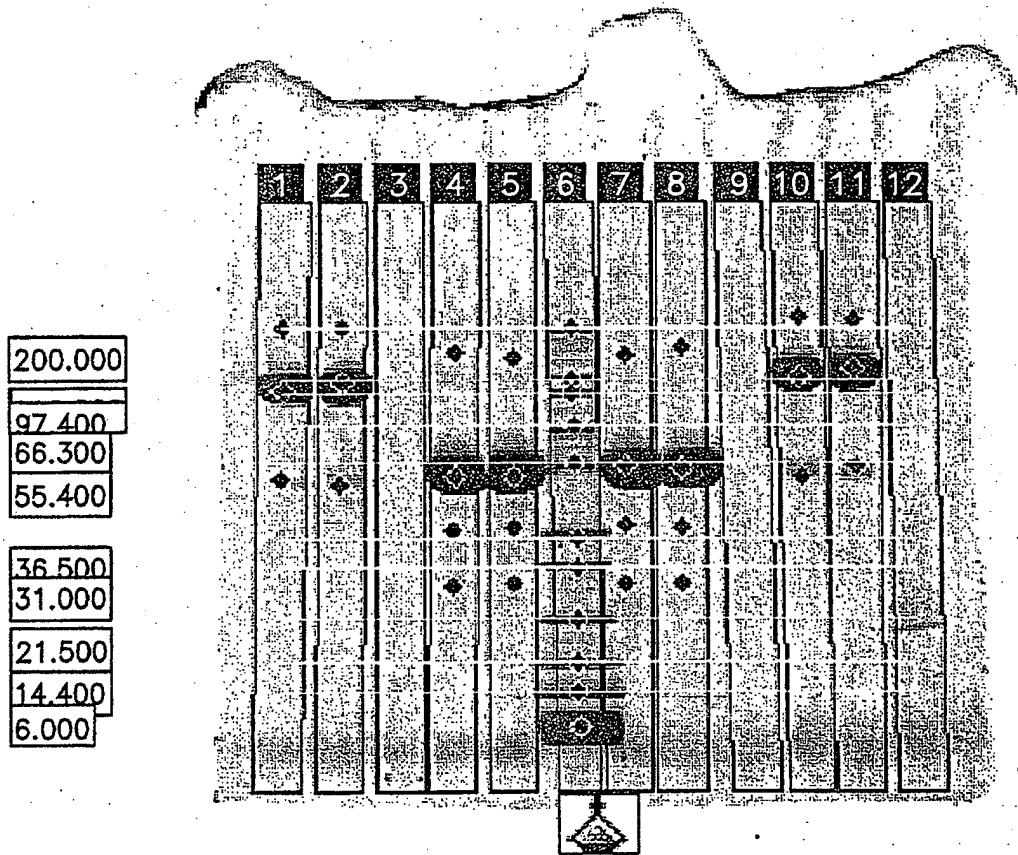


FIG. 73

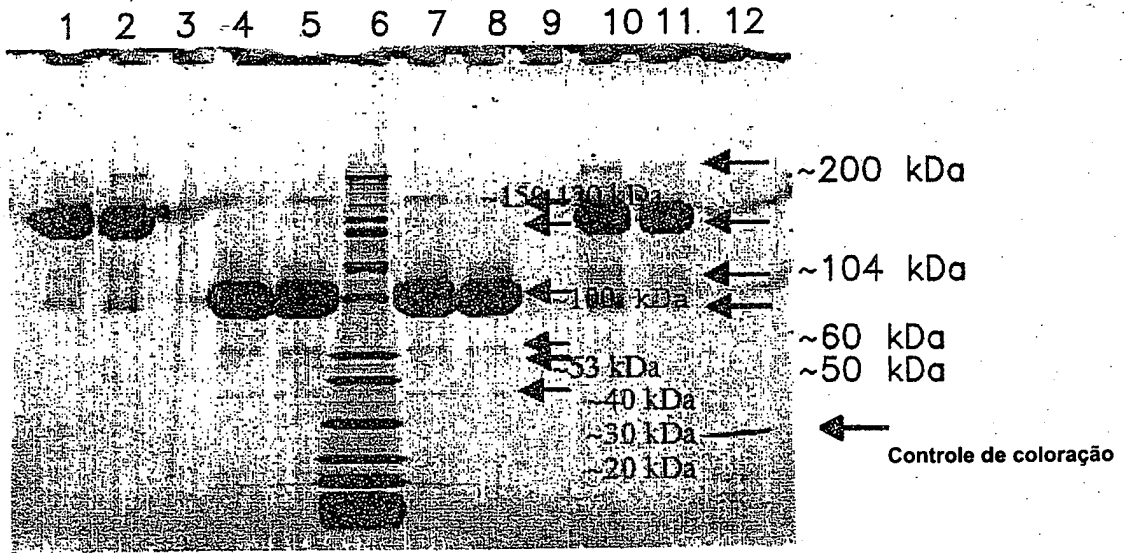


FIG. 75

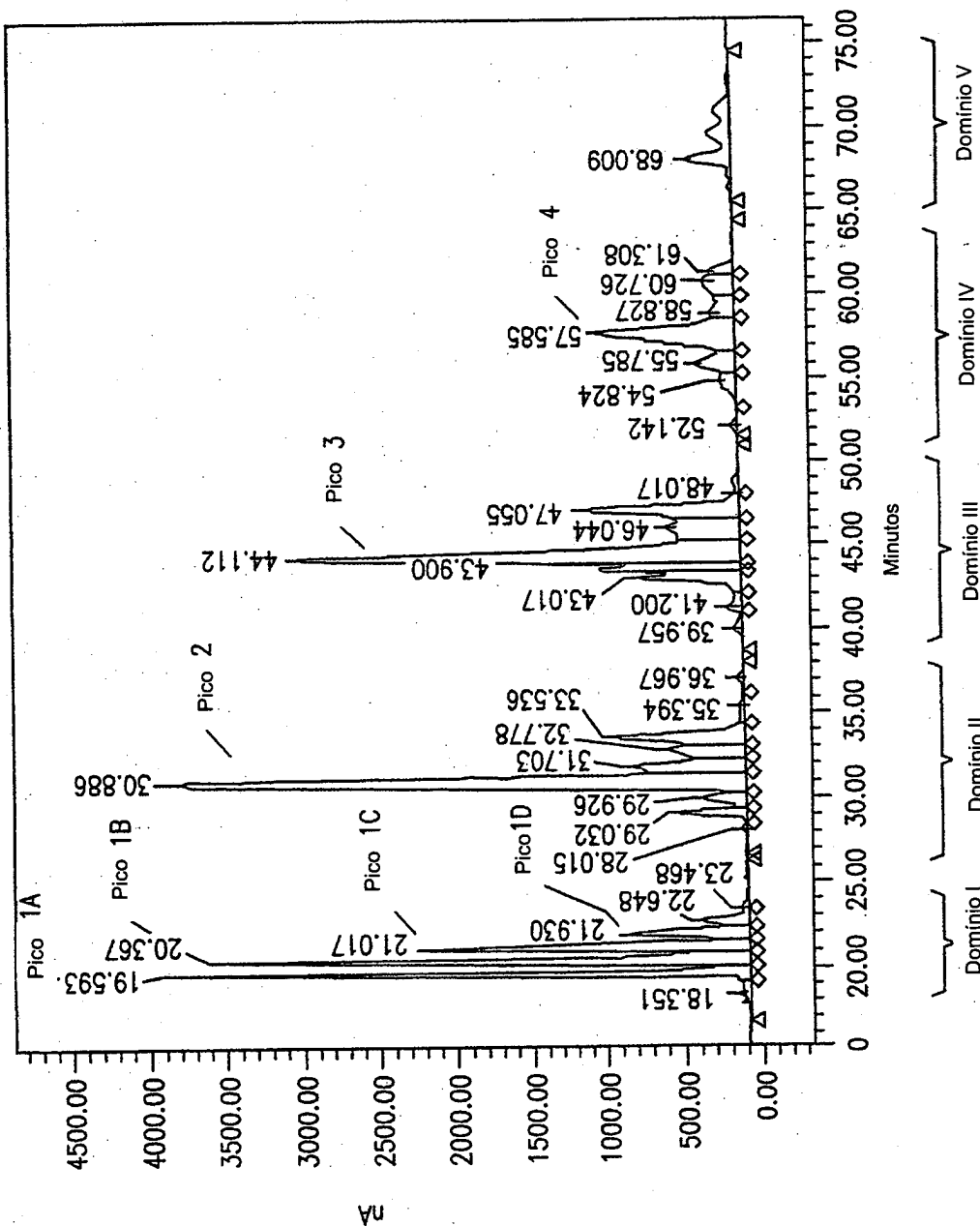
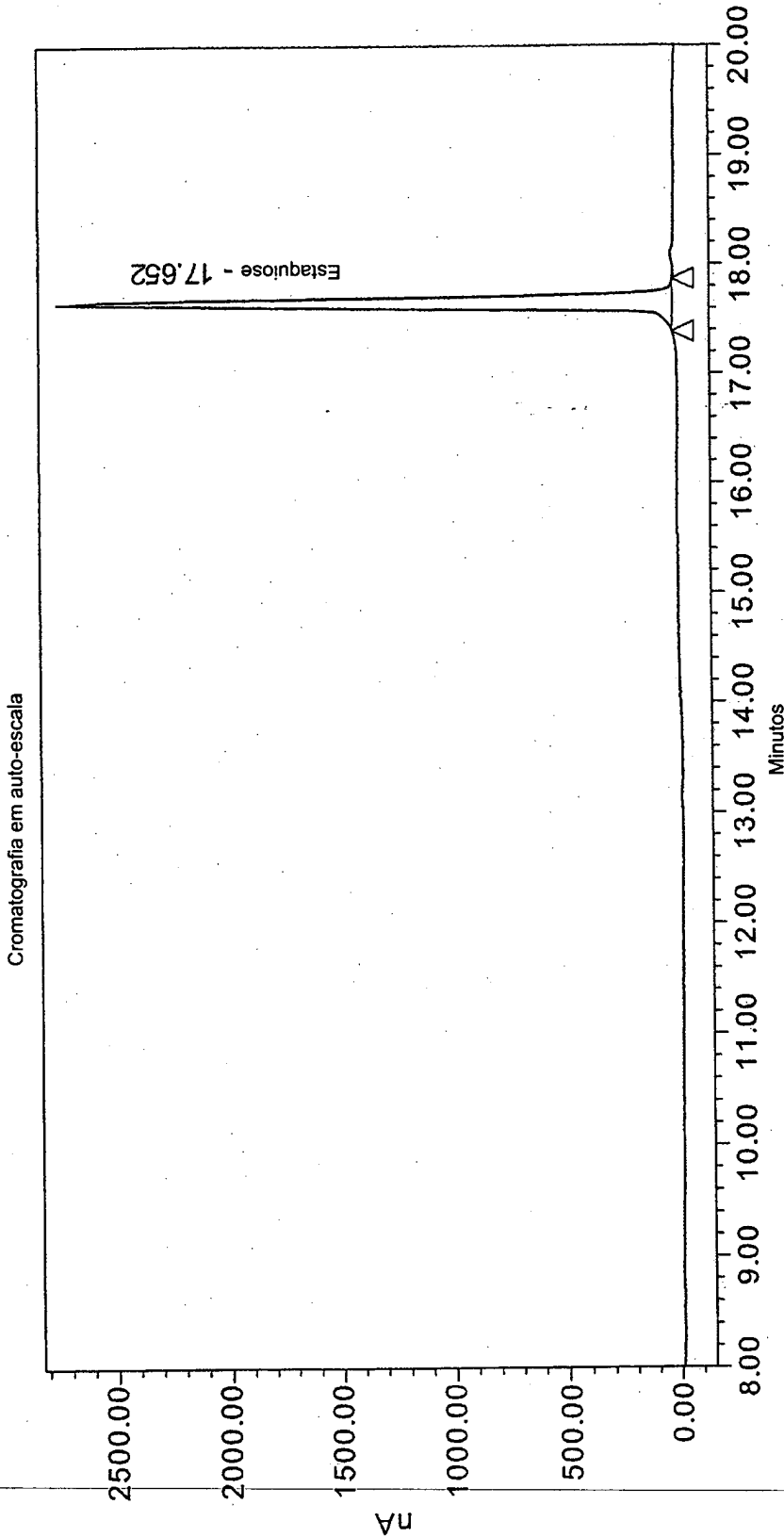


FIG. 76



Resultados de pico

Nome	RT	Area	Altura	Contagem de placas USP	Configuração USP
1 Estaqueiose	17.652	3250362	534326	189613	1.01

FIG. 77

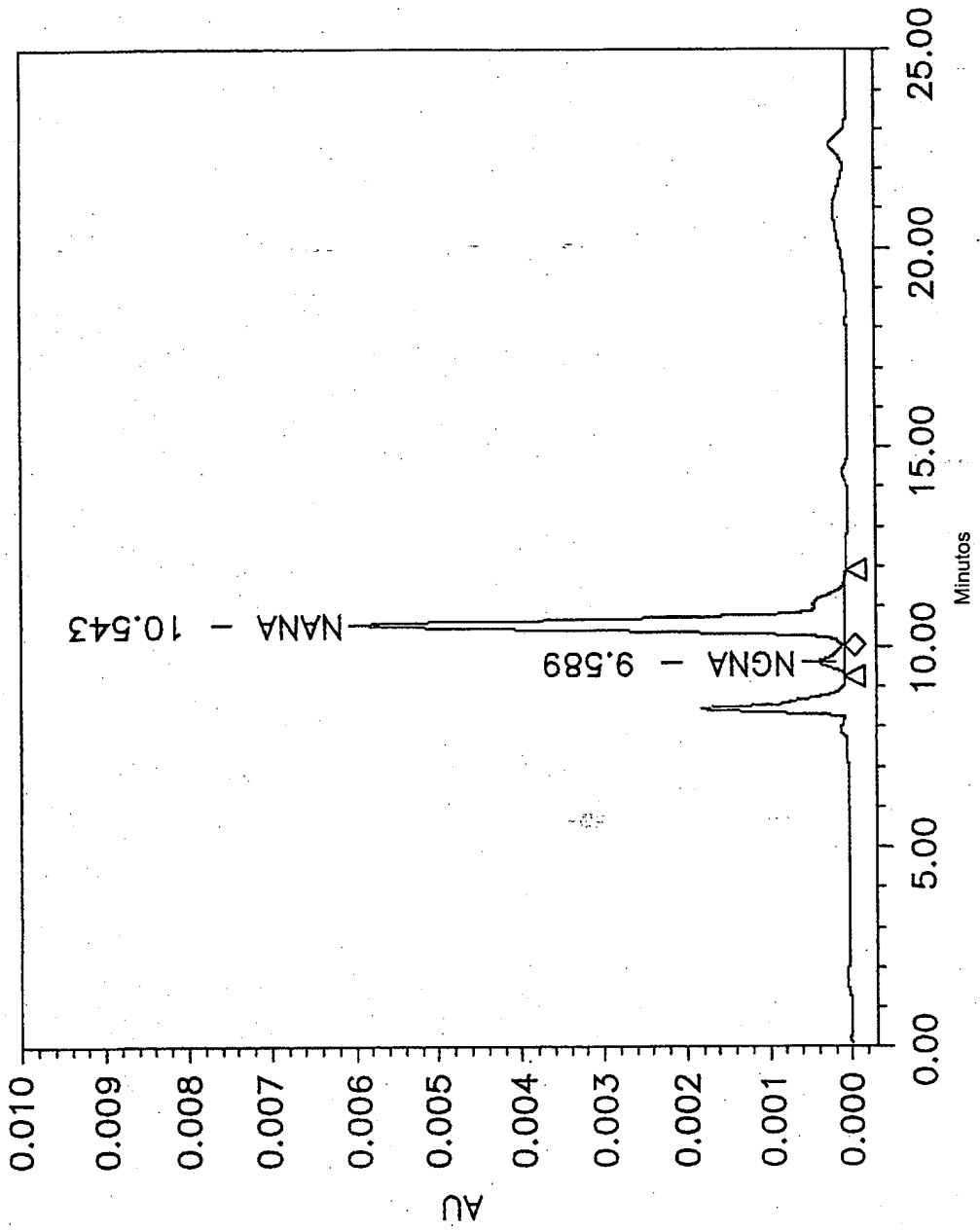


FIG. 78

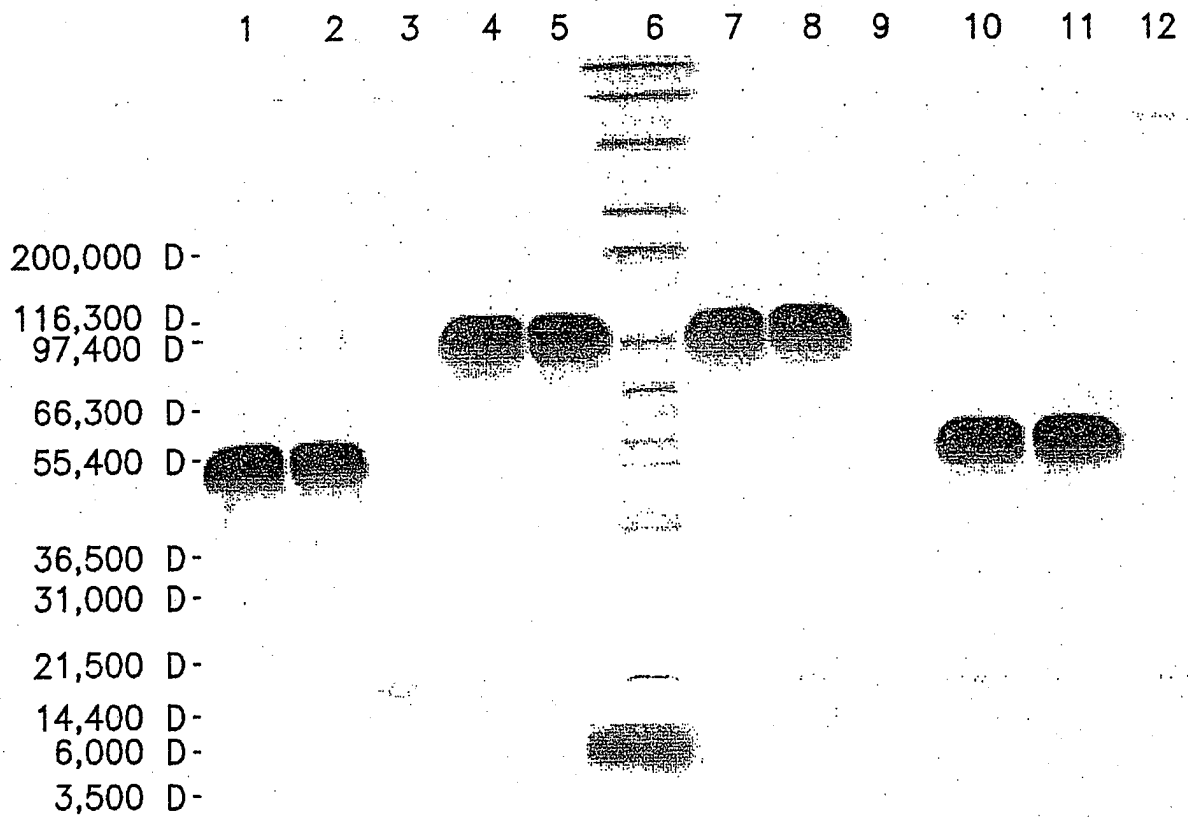


FIG. 79

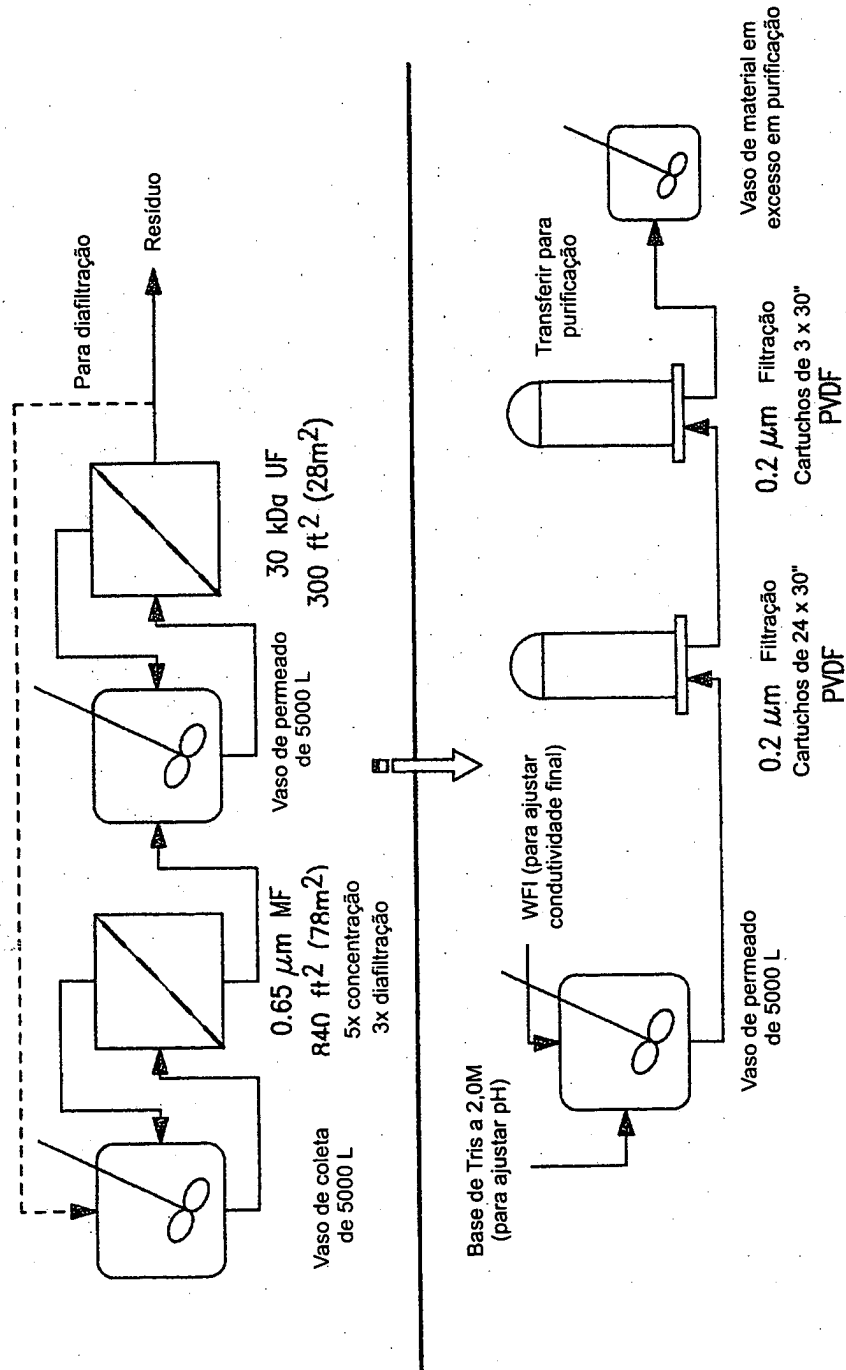


FIG. 80

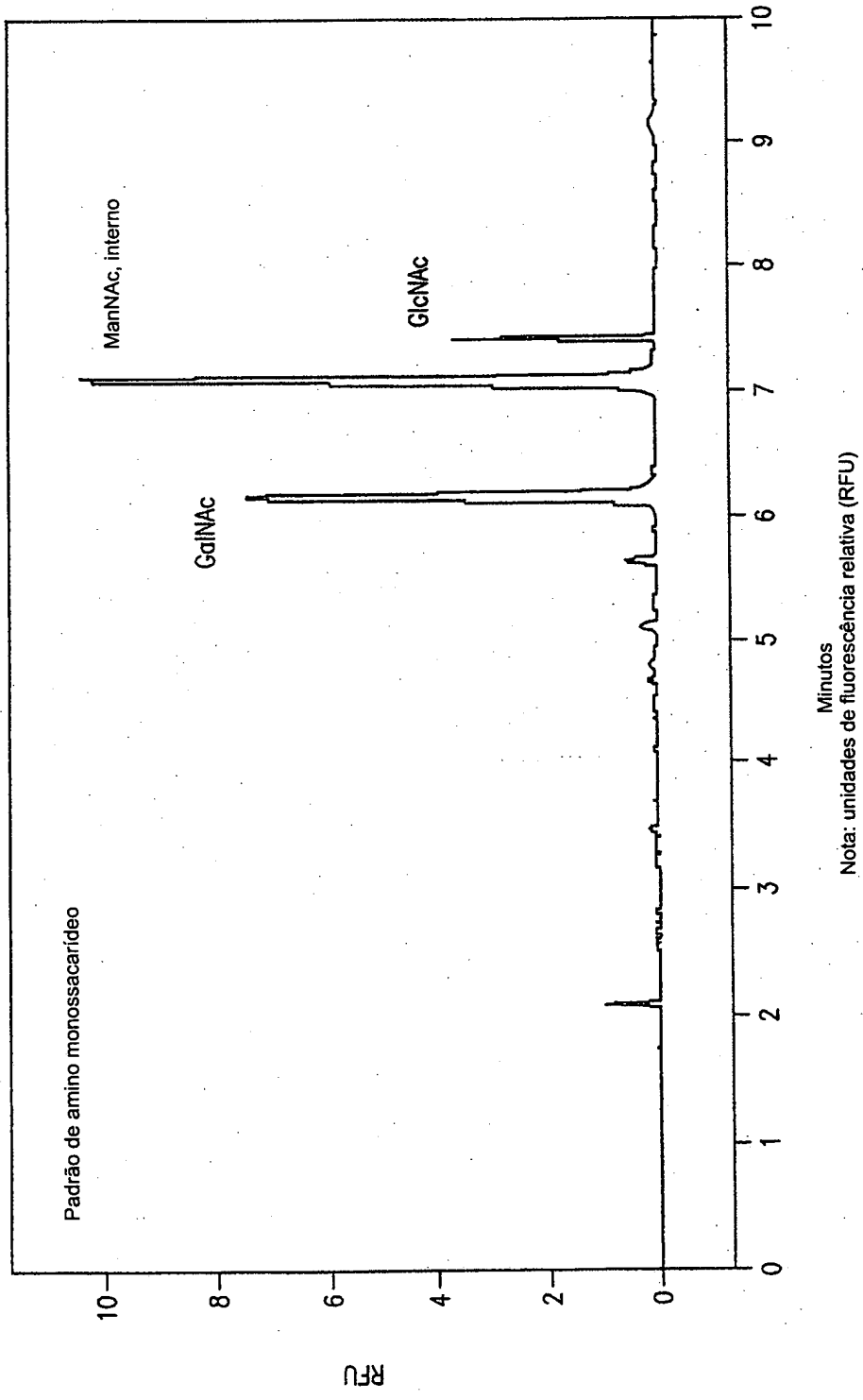
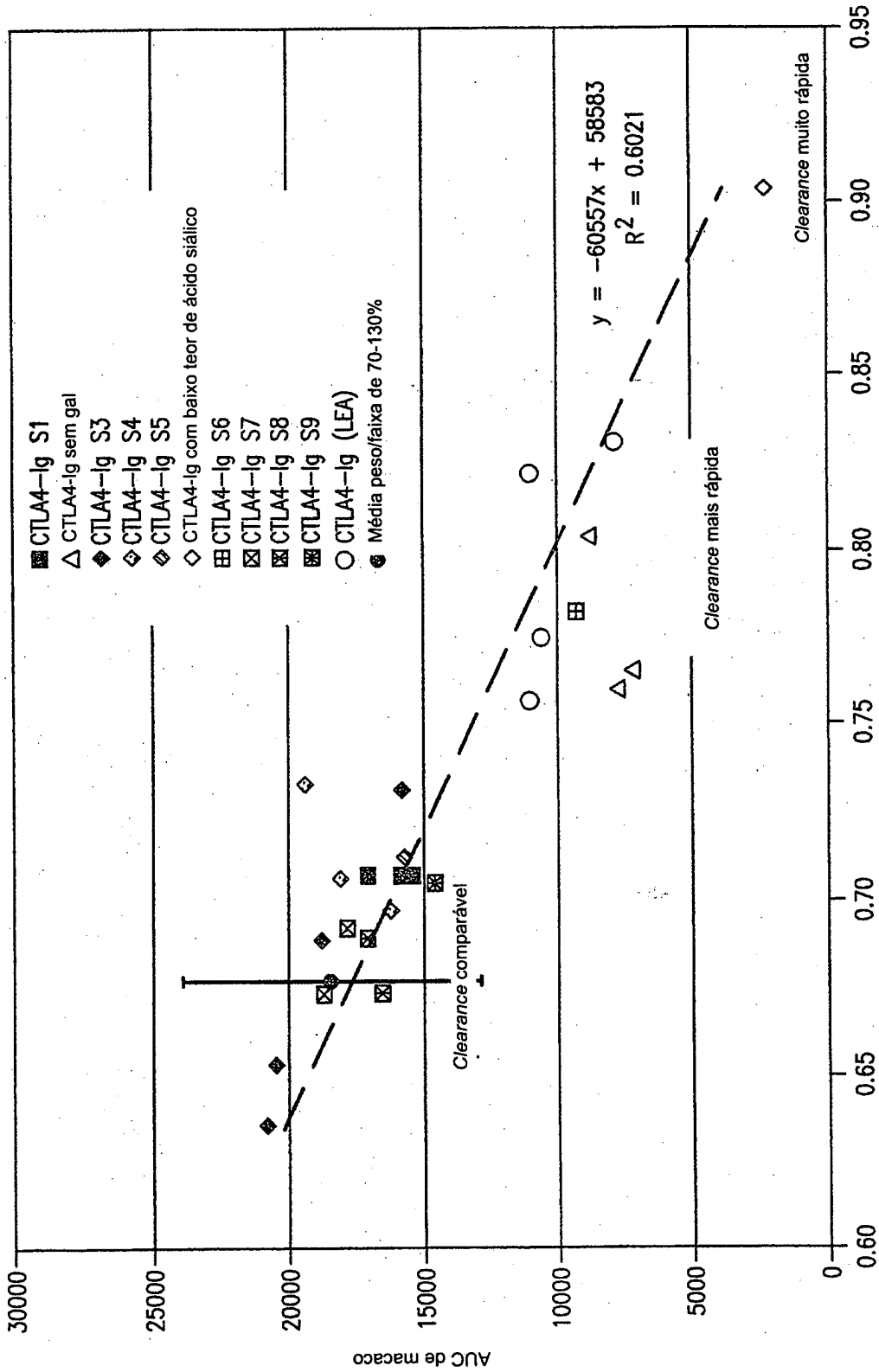
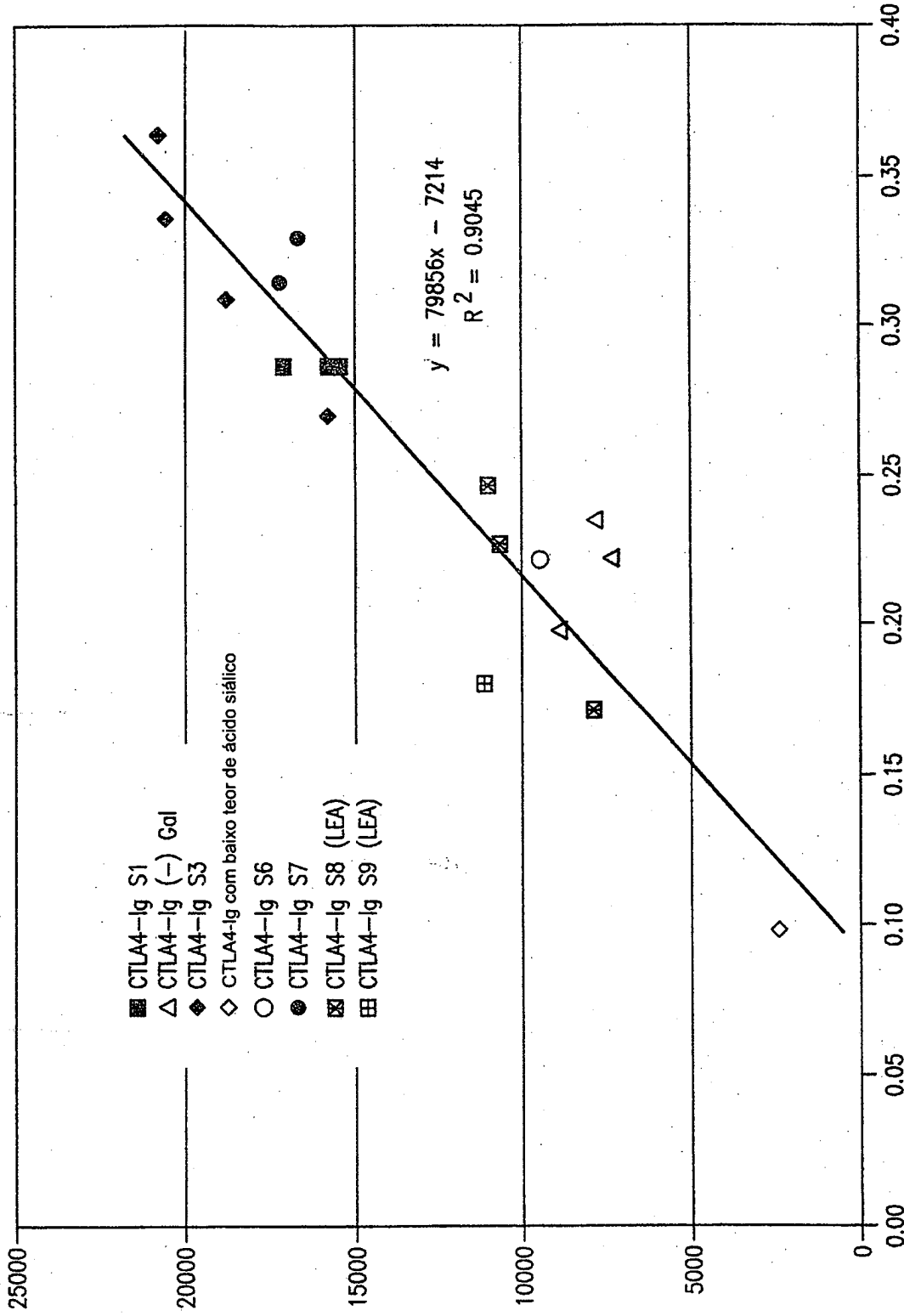


FIG. 81



Domínios 1 + 2

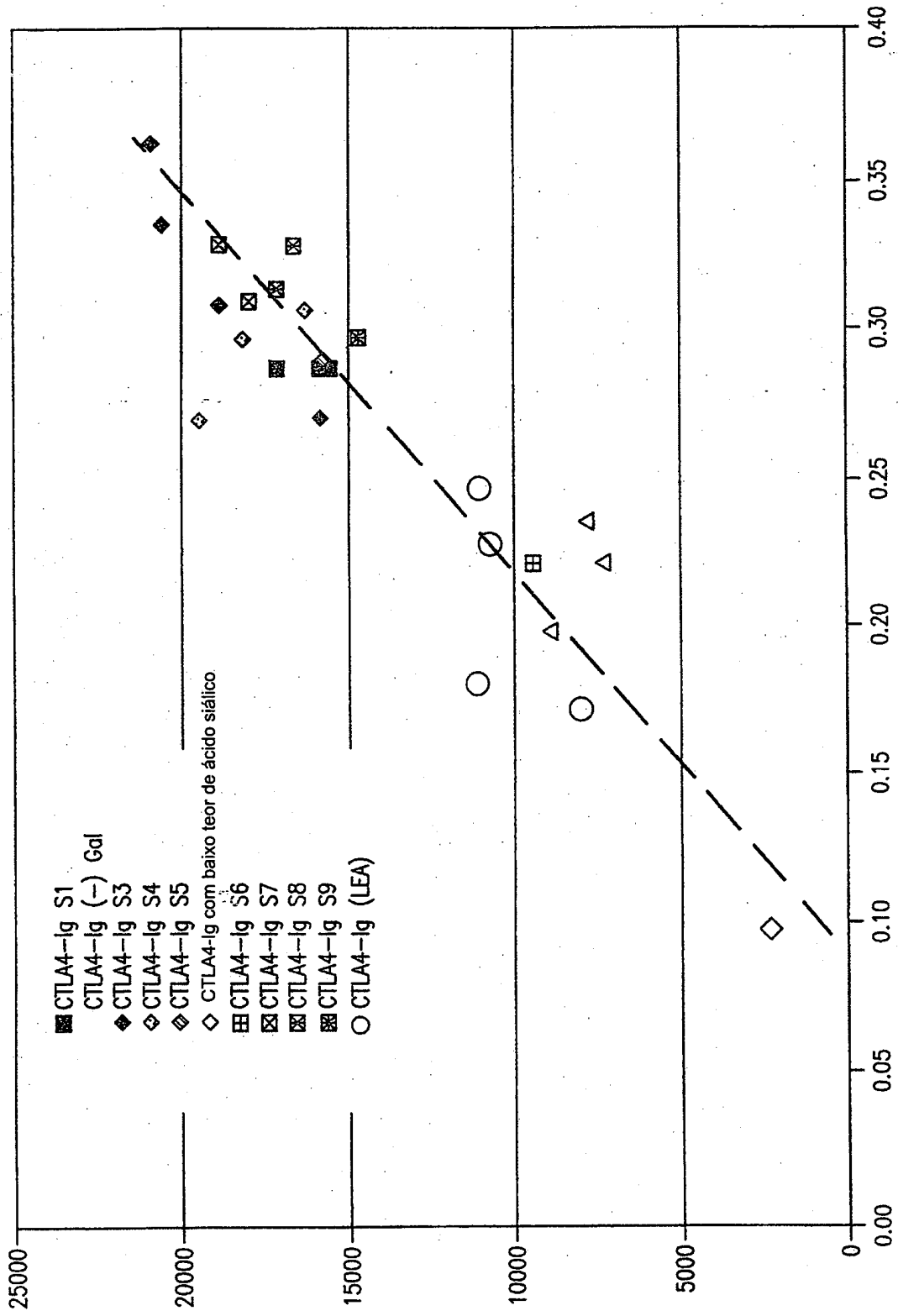
FIG. 82



Domínios 3 + 4

FIG. 83

AUC



Domínio 3 + domínio 4 (= 1,0 - domínios 1+2)

FIG. 84

AUC

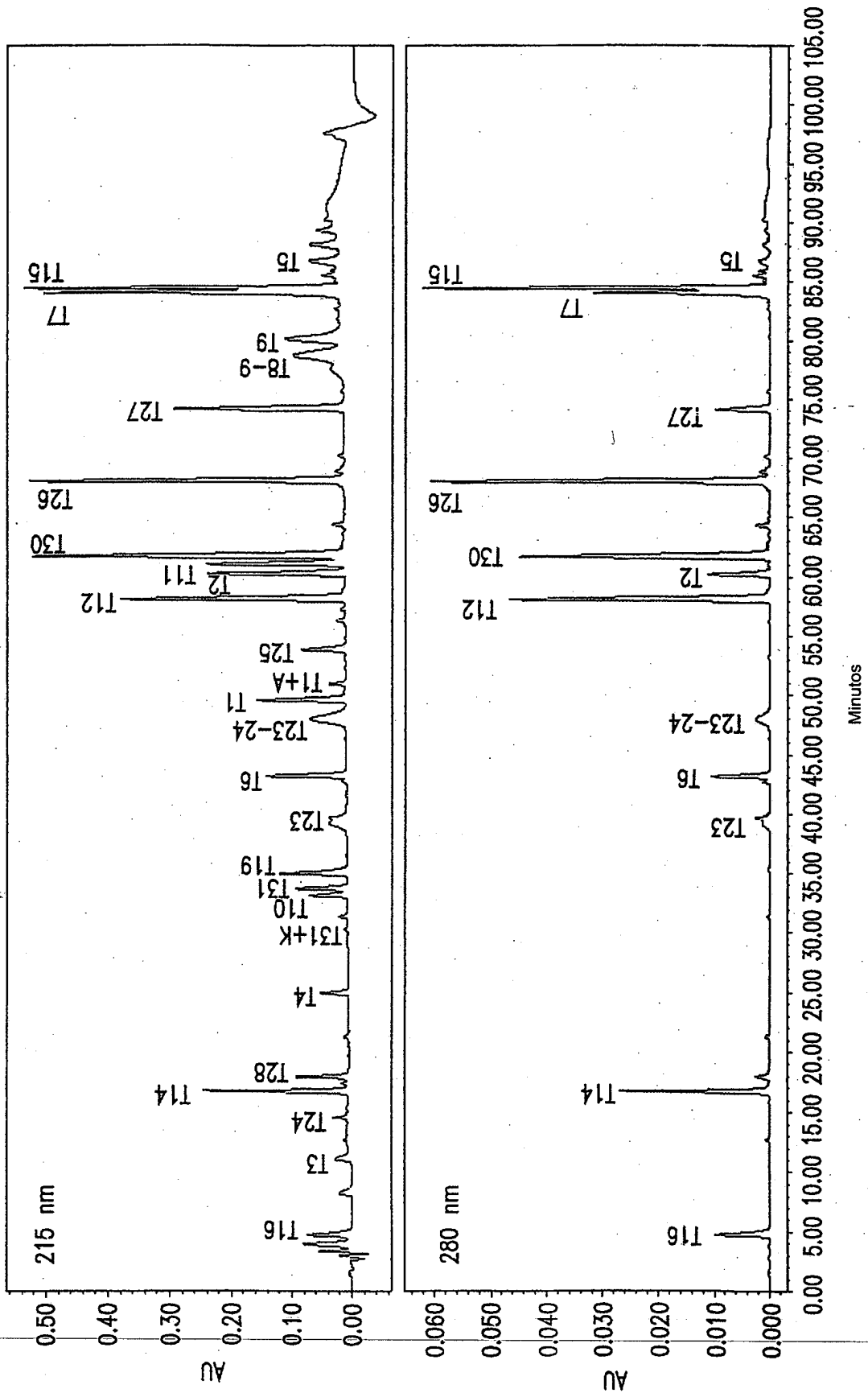


FIG. 85

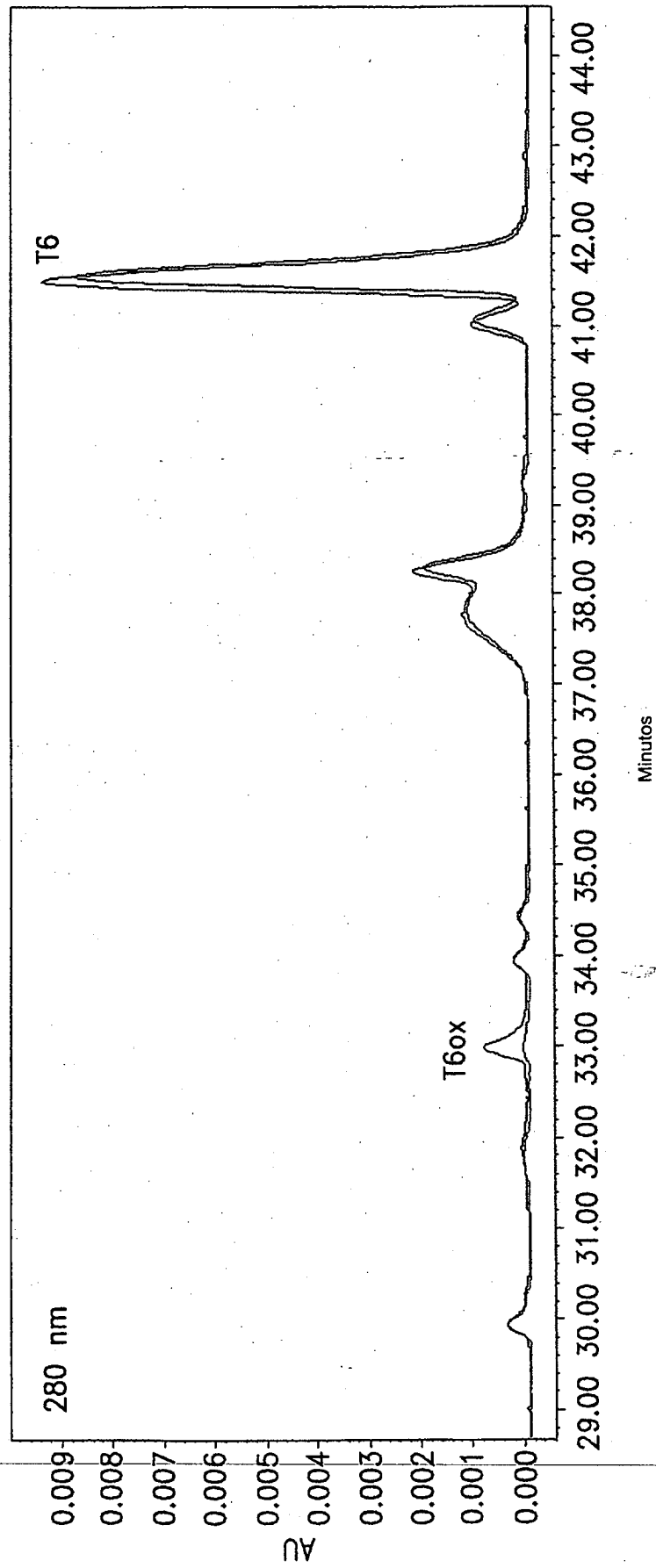


FIG. 86

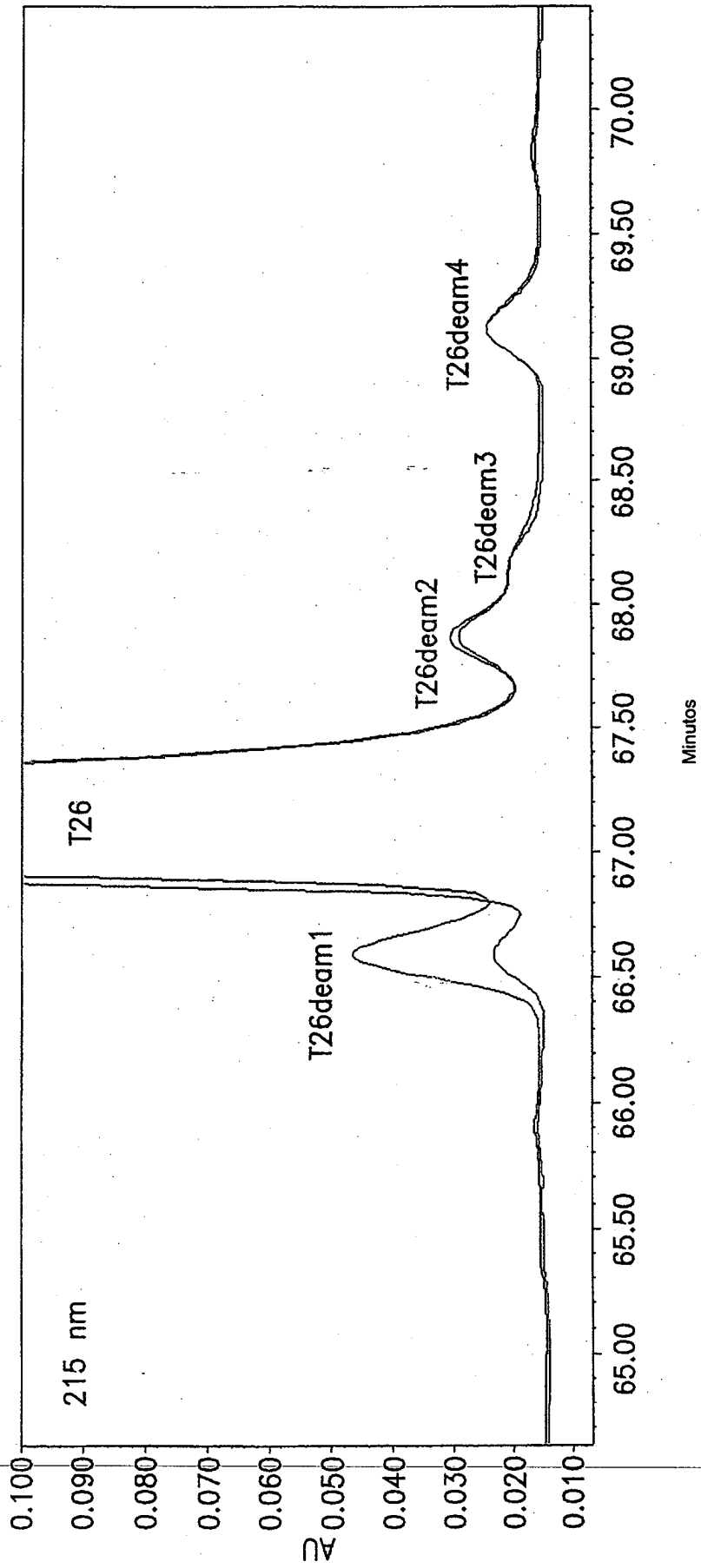
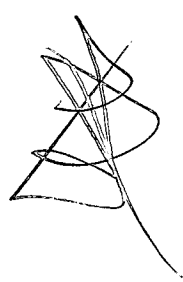


FIG. 87

1 AAAAAAAAAA ABB BCC CDD EEE FFF GGG HHH III JJJ KKK LLL
 41 ABC DEF GHI JKL MNO PQR STU VWX YZA BCD EFG
 42 ABC DEF GHI JKL MNO PQR STU VWX YZA BCD EFG
 115 ABC DEF GHI JKL MNO PQR STU VWX YZA BCD EFG
 158 ABC DEF GHI JKL MNO PQR STU VWX YZA BCD EFG
 197 ABC DEF GHI JKL MNO PQR STU VWX YZA BCD EFG
 218 ABC DEF GHI JKL MNO PQR STU VWX YZA BCD EFG
 275 ABC DEF GHI JKL MNO PQR STU VWX YZA BCD EFG
 314 ABC DEF GHI JKL MNO PQR STU VWX YZA BCD EFG
 353 ABC DEF GHI JKL MNO PQR STU VWX YZA BCD EFG
 392 ABC DEF GHI JKL MNO PQR STU VWX YZA BCD EFG
 431 ABC DEF GHI JKL MNO PQR STU VWX YZA BCD EFG
 470 ABC DEF GHI JKL MNO PQR STU VWX YZA BCD EFG
 509 ABC DEF GHI JKL MNO PQR STU VWX YZA BCD EFG
 548 ABC DEF GHI JKL MNO PQR STU VWX YZA BCD EFG

587 ABC DEF GHI JKL MNO PQR STU VWX YZA BCD EFG
 626 ABC DEF GHI JKL MNO PQR STU VWX YZA BCD EFG
 665 ABC DEF GHI JKL MNO PQR STU VWX YZA BCD EFG
 704 ABC DEF GHI JKL MNO PQR STU VWX YZA BCD EFG
 743 ABC DEF GHI JKL MNO PQR STU VWX YZA BCD EFG
 782 ABC DEF GHI JKL MNO PQR STU VWX YZA BCD EFG
 821 ABC DEF GHI JKL MNO PQR STU VWX YZA BCD EFG
 860 ABC DEF GHI JKL MNO PQR STU VWX YZA BCD EFG
 899 ABC DEF GHI JKL MNO PQR STU VWX YZA BCD EFG
 938 ABC DEF GHI JKL MNO PQR STU VWX YZA BCD EFG
 977 ABC DEF GHI JKL MNO PQR STU VWX YZA BCD EFG
 1016 ABC DEF GHI JKL MNO PQR STU VWX YZA BCD EFG
 1055 ABC DEF GHI JKL MNO PQR STU VWX YZA BCD EFG
 1094 ABC DEF GHI JKL MNO PQR STU VWX YZA BCD EFG
 1133 ABC DEF GHI JKL MNO PQR STU VWX YZA BCD EFG
 1172 AAAAAAAAAA BBBBBBBB CCCCCCCC DDDDDDDD EEEEEEEE
 1211 AAAAA



A

B

RESUMO

Patente de Invenção: "**COMPOSIÇÃO E MÉTODOS PARA PRODUÇÃO DE UMA COMPOSIÇÃO**".

5 A presente invenção proporciona células de mamífero capazes de produzir CTLA4-Ig recombinante e variantes da mesma. A invenção também proporciona composições compreendendo CTLA4-Ig e formulações da mesma. A invenção ainda proporciona métodos para produção em massa de CTLA4-Ig a partir de células de mamífero capazes de produzir essa proteína recombinante e purificação da CTLA4-Ig.

Novo quadro reivindicatório 1-373 (total de 373 reivindicações),
incorporando as emendas às reivindicações, conforme Relatório de Exame
Preliminar.

REIVINDICAÇÕES

1. Método para obtenção de uma composição compreendendo uma população isolada de moléculas de CTLA4-Ig de um meio de cultura líquido, o meio compreendendo uma população inicial de moléculas de CTLA4-Ig, em que (1) moléculas de CTLA4-Ig da população inicial têm um ou mais resíduos de ácido siálico, (2) o número de resíduos de ácido siálico por molécula de CTLA4-Ig varia dentro da população inicial e (3) a população inicial compreende dímero de CTLA4-Ig e agregado de elevado peso molecular, o método compreendendo:
- 10 (a) coleta, do meio de cultura líquido, de uma cultura de células de mamífero expressando moléculas de CTLA4-Ig;
- (b) separação das moléculas de CTLA4-Ig de componentes celulares;
- (c) separação de dímeros de CTLA4-Ig de agregados de CTLA4-Ig de elevado peso molecular; e
- 15 (d) separação das moléculas de CTLA4-Ig em duas ou mais frações, em que pelo menos uma fração tem uma maior proporção molar de ácido siálico para moléculas de CTLA4-Ig comparado com pelo menos uma outra fração,
- 20 em que as etapas (b), (c) e (d) são realizadas simultaneamente ou em qualquer ordem, de modo a obter a referida composição.
2. Método de acordo com a reivindicação 1, em que a etapa de coleta (a) compreende obtenção de uma fração solúvel da cultura líquida.
3. Método de acordo com a reivindicação 1, em que as etapas
- 25 (c) e (d) compreendem o uso de cromatografia em coluna de modo a obter frações de moléculas de CTLA4-Ig tendo diferentes teores de ácido siálico.
4. Método de acordo com a reivindicação 1, ainda compreendendo uso de cromatografia em coluna para reduzir o teor de MCP-1 na composição.
- 30 5. Método de acordo com a reivindicação 1, em que as moléculas de CTLA4-Ig compreendem um ou mais polipeptídeos tendo SEQ ID NO:2, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10.

6. Método de acordo com a reivindicação 1, em que as moléculas de CTLA4-Ig compreendem um ou mais polipeptídeos tendo SEQ ID NO:4, 11, 12, 13, 14, 15 ou 16.

7. Método de acordo com a reivindicação 1, em que a fração em (d) tendo a maior proporção molar de ácido siálico para moléculas de CTLA4-Ig exibe uma proporção molar média de ácido siálico para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 8 a cerca de 14.

8. Método de acordo com a reivindicação 7, em que a proporção molar média é de cerca de 8 a cerca de 11, de cerca de 8 a cerca de 10 ou de cerca de 8 a cerca de 9.

9. Método para isolamento de uma composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig, o método compreendendo:

(i) obtenção de uma fração solúvel de uma cultura líquida compreendendo células de mamífero que produzem moléculas de CTLA4-Ig e, em qualquer ordem,

(ii) sujeição da fração solúvel à cromatografia de troca de ânions de modo a obter uma composição enriquecida e eluída compreendendo moléculas de CTLA4-Ig;

(iii) sujeição da fração solúvel à cromatografia por interação hidrofóbica de modo a obter uma composição enriquecida e eluída compreendendo moléculas de CTLA4-Ig;

(iv) sujeição da fração solúvel à cromatografia por afinidade de modo a obter uma composição enriquecida e eluída compreendendo moléculas de CTLA4-Ig; e

(v) sujeição da fração solúvel à cromatografia de troca de ânions de modo a obter uma composição enriquecida e eluída compreendendo moléculas de CTLA4-Ig.

10. Método para isolamento de uma composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig, o método compreendendo:

(i) obtenção de uma fração solúvel de uma cultura líquida compreendendo células de mamífero que produzem moléculas de CTLA4-Ig;

(ii) sujeição da fração solúvel à cromatografia de troca de ânions

nions para obter uma composição eluída compreendendo moléculas de CTLA4-Ig;

(iii) sujeição do produto de proteína da etapa (ii) à cromatografia por interação hidrofóbica de modo a obter uma composição enriquecida compreendendo moléculas de CTLA4-Ig;

(iv) sujeição do produto de proteína de (iii) à cromatografia por afinidade para obter uma composição adicionalmente enriquecida compreendendo moléculas de CTLA4-Ig; e

(v) sujeição do produto de proteína de (iv) à cromatografia de troca de ânions, de modo a isolar uma composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig.

11. Método de acordo com a reivindicação 9 ou 10, em que a composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig obtidas na etapa (ii) é caracterizada por: (a) uma proporção molar média de NANA para moléculas de CTLA4-Ig de 6,0 a 10,1 e (b) uma área de menos do que ou igual a 25,7 por cento de espécies de elevado peso moléculas de CTLA4-Ig conforme determinado através de cromatografia por exclusão de tamanho e detecção espectrofotométrica.

12. Método de acordo com a reivindicação 9 ou 10, em que a composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig obtidas na etapa (iii) é caracterizada pelo fato de que (a) espécies de elevado peso molecular de CTLA4-Ig é uma área de menos de cerca de 2,5% conforme determinado através de cromatografia por exclusão de tamanho e detecção espectrofotométrica, (b) proteína celular é menos de cerca de 6600 ng/ml e (c) MCP-1 é menos de cerca de 5600 ppm.

13. Método de acordo com a reivindicação 9 ou 10, em que a composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig obtidas na etapa (iii) é caracterizada por: (a) uma proporção molar média de NANA para moléculas de CTLA4-Ig de 6,8 a 11,4 e (b) uma área de menos do que ou igual a 2,5 por cento de espécies de elevado peso moléculas de CTLA4-Ig conforme determinado através de cromatografia por exclusão de tamanho e detecção espectrofotométrica.

14. Método de acordo com a reivindicação 9 ou 10, em que a composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig obtidas na etapa (iv) é caracterizada por: (a) uma proporção molar média de NANA para moléculas de CTLA4-Ig de 8,0 a 11,0 e (b) uma área de menos do que ou igual a 2,5 por cento de espécies de elevado peso moléculas de CTL4-Ig conforme determinado através de cromatografia por exclusão de tamanho e detecção espectrofotométrica.

15. Método de acordo com a reivindicação 9 ou 10, em que a composição enriquecida obtida na etapa (iii) é caracterizada pelo fato de que espécies de elevado peso molecular de CTLA4-Ig é uma área de menos de 2,5% conforme determinado através de cromatografia por exclusão de tamanho e detecção espectrofotométrica.

16. Método de acordo com a reivindicação 9 ou 10, em que a composição de proteína compreendendo moléculas de CTLA4-Ig na etapa (v) é caracterizada por: (a) uma proporção molar média de NANA para moléculas de CTLA4-Ig de 8,0 a 11,9 e (b) uma área de menos do que ou igual a 2,0 por cento de espécies de elevado peso moléculas de CTL4-Ig conforme determinado através de cromatografia por exclusão de tamanho e detecção espectrofotométrica.

17. Método para isolamento de uma composição de moléculas de CTLA4-Ig, o método compreendendo:

(i) obtenção de uma fração solúvel de uma cultura líquida compreendendo células de mamífero que produzem moléculas de CTLA4-Ig e , em qualquer ordem, (ii) sujeição da fração solúvel à cromatografia de troca de ânions de modo a obter uma composição enriquecida e eluída compreendendo moléculas de CTLA4-Ig; (iii) sujeição da fração solúvel à cromatografia por interação hidrofóbica de modo a obter uma composição enriquecida e eluída compreendendo moléculas de CTLA4-Ig; (iv) sujeição da fração solúvel à cromatografia por afinidade modo a obter uma composição enriquecida e eluída compreendendo moléculas de CTLA4-Ig; e (v) sujeição da fração solúvel à cromatografia de troca de ânions de modo a obter uma composição enriquecida e eluída compreendendo moléculas de CTLA4-Ig,

em que a composição obtida na etapa (v) é caracterizada pelo fato de que o percentual de espécies de elevado peso molecular de CTLA4-Ig é uma área de menos de cerca de 2,0%, proteína celular é menos de cerca de 95 ng/ml e MCP-1 é menos de cerca de 9,55 ng/ml.

5 18. Método para isolamento de uma composição de moléculas de CTLA4-Ig, o método compreendendo: (i) obtenção de uma fração solúvel de uma cultura líquida compreendendo células de mamífero que produzem moléculas de CTLA4-Ig e , em qualquer ordem, (ii) sujeição da fração solúvel à cromatografia de troca de ânions de modo a obter uma composição enriquecida e eluída compreendendo moléculas de CTLA4-Ig; (iii) sujeição da
10 fração solúvel à cromatografia por interação hidrofóbica de modo a obter uma composição enriquecida e eluída compreendendo moléculas de CTLA4-Ig; (iv) sujeição da fração solúvel à cromatografia por afinidade modo a obter uma composição enriquecida e eluída compreendendo moléculas de CTLA4-Ig; e (v) sujeição da fração solúvel à cromatografia de troca de ânions de
15 modo a obter uma composição enriquecida e eluída compreendendo moléculas de CTLA4-Ig, em que a composição obtida na etapa (iii) é caracterizada pelo fato de que o percentual de espécies de elevado peso molecular de CTLA4-Ig é uma área % de menos de cerca de 2,5, proteína celular é menos de 95 ng/ml, MCP-1 e material semelhante a MCP é menos de cerca de 5
20 ppm e a proporção molar média de NANA para moléculas de CTLA4-Ig é de cerca de 8,0 a cerca de 12.

19. Método de acordo com a reivindicação 9 ou 10, em que a cromatografia de troca de ânions da etapa (ii) é realizada usando um tampão
25 de lavagem compreendendo HEPES a cerca de 75 mM e NaCl a cerca de 360 mM e tendo um pH de cerca de 8,0.

20. Método de acordo com a reivindicação 9 ou 10, em que a cromatografia de troca de ânions da etapa (ii) é realizada usando um tampão de eluição compreendendo HEPES a cerca de 25 mM e NaCl a cerca de 850
30 mM e tendo um pH de cerca de 7,0.

21. Método de acordo com a reivindicação 9 ou 10, em que a cromatografia por interação hidrofóbica da etapa (iii) é realizada usando um

único tampão de lavagem compreendendo HEPES a cerca de 25 mM e NaCl a cerca de 850 mM e tendo um pH de cerca de 7,0.

22. Método de acordo com a reivindicação 9 ou 10, em que a cromatografia por afinidade da etapa (iv) é realizada usando um tampão de lavagem compreendendo Tris a cerca de 25 mM e NaCl a cerca de 250 mM e tendo um pH de cerca de 8,0.

23. Método de acordo com a reivindicação 9 ou 10, em que a cromatografia por afinidade da etapa (iv) é realizada usando um tampão de eluição compreendendo glicina a cerca de 100 mM e tendo um pH de cerca de 3,5.

24. Método de acordo com a reivindicação 9 ou 10, em que a cromatografia de troca de ânions da etapa (v) é realizada usando um tampão de lavagem compreendendo HEPES a cerca de 25 mM e NaCl a cerca de 120 mM a NaCl a cerca de 130 mM e tendo um pH de cerca de 8,0.

25. Método de acordo com a reivindicação 9 ou 10, em que a cromatografia de troca de ânions da etapa (v) é realizada usando um tampão de eluição compreendendo HEPES a cerca de 25 mM e NaCl a cerca de 200 mM e tendo um pH de cerca de 8,0.

26. Método de acordo com a reivindicação 9 ou 10, em que a cromatografia de troca de ânions da etapa (ii) é realizada usando uma coluna tendo uma resina de troca de ânions compreendendo um grupo funcional amina primária, secundária, terciária ou quaternária.

27. Método de acordo com a reivindicação 26, em que uma resina compreende um grupo funcional amina quaternária.

28. Método de acordo com a reivindicação 9 ou 10, em que a cromatografia por interação hidrofóbica da etapa (iii) é realizada usando uma resina de interação hidrofóbica compreendendo um grupo funcional fenila, octila, propila, alcóxi, butila ou isoamila.

29. Método de acordo com a reivindicação 28, em que o grupo funcional compreende um grupo funcional fenila.

30. Método de acordo com a reivindicação 9 ou 10, em que a cromatografia por afinidade da etapa (iv) é realizada usando uma resina de

cromatografia por afinidade compreendendo Proteína A.

31. Método para preparo de uma composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig, o método compreendendo purificação de moléculas de CTLA4-Ig de uma cultura líquida de células, em que a composição de CTLA4-Ig purificada compreende (a) uma quantidade farmacologicamente aceitável de MCP-1 e material semelhante a MCP por mg de moléculas de CTLA4-Ig e (b) uma área de menos de 2,5% de espécies de elevado peso molecular de CTLA4-Ig conforme determinado através de cromatografia por exclusão de tamanho e detecção espectrofotométrica.

32. Método de acordo com a reivindicação 31, em que a quantidade farmacologicamente aceitável de MCP-1 e material semelhante a MCP compreende cerca de 40 a cerca de 0,5 ng/mg de moléculas de CTLA4-Ig.

33. Método de acordo com a reivindicação 31, em que a quantidade farmacologicamente aceitável de MCP-1 e material semelhante a MCP compreende cerca de 35 a cerca de 0,5 ng/mg de moléculas de CTLA4-Ig.

34. Método de acordo com a reivindicação 31, em que a quantidade farmacologicamente aceitável de MCP-1 e material semelhante a MCP compreende cerca de 10 a cerca de 0,5 ng/mg de moléculas de CTLA4-Ig.

35. Método de acordo com a reivindicação 9 ou 10, em que a cromatografia por afinidade da etapa (iv) é realizada usando uma coluna compreendendo uma resina capaz de reduzir MCP-1 e material semelhante a MCP no produto de proteína eluído.

36. Método de acordo com a reivindicação 9 ou 10, em que a cromatografia por interação hidrofóbica da etapa (iii) é realizada usando uma resina de interação hidrofóbica, em que uma resina é capaz de (a) separação de dímeros de CTLA4-Ig de espécies de elevado peso molecular de CTLA4-Ig; (b) aumento do teor de ácido siálico das moléculas de CTLA4-Ig eluídas; ou (c) (a) e (b).

37. Método de acordo com a reivindicação 9 ou 10, em que a cromatografia de troca de ânions da etapa (ii) ou etapa (v) ou ambas, é realizada usando uma resina de troca de ânions, em que uma resina é capaz de (a) diminuir o teor de agregado de elevado peso molecular de CTLA4-Ig da

composição eluída; (b) aumentar o teor de ácido siálico da composição eluída; ou (c) (a) e (b).

38. Método para isolamento de uma composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig, o método compreendendo:

5 (i) obtenção de uma fração solúvel de uma cultura líquida compreendendo células de mamífero que produzem moléculas de CTLA4-Ig e em qualquer ordem;

(ii) sujeição da fração solúvel à cromatografia por afinidade modo a obter uma composição eluída compreendendo moléculas de CTLA4-Ig;

10 (iii) sujeição da fração solúvel à cromatografia de troca de ânions de modo a obter uma composição eluída e enriquecida compreendendo moléculas de CTLA4-Ig; e

(iv) sujeição da fração solúvel à cromatografia por interação hidrofóbica de modo a obter uma composição eluída e enriquecida compreendendo moléculas de CTLA4-Ig.

39. Método de acordo com a reivindicação 38, em que a cromatografia por afinidade etapa é realizada primeiro.

20 40. Método de acordo com a reivindicação 38, em que a cromatografia por afinidade da etapa (ii) é realizada usando uma resina compreendendo Proteína A.

41. Método de acordo com a reivindicação 38, em que a cromatografia por afinidade da etapa (ii) é realizada usando um tampão de eluição compreendendo guanidina.

25 42. Método de acordo com a reivindicação 38, em que a cromatografia por afinidade da etapa (ii) é realizada usando um tampão de eluição compreendendo uréia.

43. Método de acordo com a reivindicação 38, em que a cromatografia por afinidade da etapa (ii) resulta em um aumento em dímeros de CTLA4-Ig na composição eluída compreendendo moléculas de CTLA4-Ig.

30 44. Método para isolamento de uma composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig de líquido coletado de uma cultura de células de

mamífero, em que as células produzem moléculas de CTLA4-Ig, o método compreendendo:

- (i) obtenção de uma fração solúvel do líquido coletado;
- (ii) sujeição da fração solúvel à cromatografia por afinidade para obter uma composição eluída compreendendo moléculas de CTLA4-Ig;
- (iii) sujeição da composição da etapa (ii) à cromatografia de troca de ânions de modo a obter uma composição eluída e enriquecida compreendendo moléculas de CTLA4-Ig; e
- (iv) sujeição da composição da etapa (iii) à cromatografia por interação hidrofóbica para obter uma composição adicionalmente enriquecida compreendendo moléculas de CTLA4-Ig.

45. Método de acordo com a reivindicação 44, em que a composição obtida na etapa (iv) é caracterizada pelo fato de que o percentual de espécies de elevado peso molecular é uma área % de menos de cerca de 2,5 conforme determinado através de cromatografia por exclusão de tamanho e detecção espectrofotométrica e o percentual de proteína celular é menos de cerca de 95 ng/ml e o percentual de MCP-1 é menos de cerca de 5 ppm.

46. Método de acordo com a reivindicação 44, em que a cromatografia de troca de ânions da etapa (iii) é realizada usando um tampão de lavagem compreendendo HEPES a cerca de 50 mM e NaCl a cerca de 135 mM e tendo um pH de cerca de 7.

47. Método de acordo com a reivindicação 44, em que a cromatografia de troca de ânions da etapa (iii) é realizada usando um tampão de eluição compreendendo HEPES a cerca de 50 mM e NaCl a cerca de 200 mM e tendo um pH de cerca de 7.

48. Método de acordo com a reivindicação 44, em que a cromatografia por interação hidrofóbica da etapa (iv) é realizada usando um tampão de lavagem compreendendo HEPES a cerca de 50 mM e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a cerca de 1,2 M e tendo um pH de cerca de 7.

49. Método de acordo com a reivindicação 44, em que a cromatografia por afinidade da etapa (ii) é realizada usando um tampão de lava-

gem compreendendo NaH_2PO_4 a cerca de 25 mM e NaCl a cerca de 150 mM e tendo um pH de cerca de 7,5.

50. Método de acordo com a reivindicação 44, em que a cromatografia por afinidade da etapa (ii) é realizada usando um tampão de eluição compreendendo glicina a cerca de 250 mM e tendo um pH de cerca de 3.

51. Método de acordo com a reivindicação 44, em que a cromatografia de troca de ânions da etapa (iii) é realizada usando uma coluna tendo uma resina de troca de ânions compreendendo um grupo funcional amina primária, secundária, terciária ou quaternária.

52. Método de acordo com a reivindicação 51, em que uma resina compreende um grupo funcional amina quaternária.

53. Método de acordo com a reivindicação 47, em que a cromatografia por interação hidrofóbica da etapa (iii) é realizada usando uma resina de interação hidrofóbica compreendendo um grupo funcional fenila, octila, propila, alcóxi, butila ou isoamila.

54. Método de acordo com a reivindicação 53, em que o grupo funcional compreende um grupo funcional fenila.

55. Método de acordo com a reivindicação 44, em que a cromatografia por afinidade da etapa (ii) é realizada usando uma resina compreendendo Proteína A.

56. Composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig obtidas através do método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-55.

57. Composição de CTLA4-Ig obtida através do método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-56, em que a composição compreende um ou mais polipeptídeos tendo SEQ ID NO:2, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10.

58. Composição de CTLA4-Ig obtida através do método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-56, em que a composição compreende um ou mais polipeptídeos tendo SEQ ID NO:4, 11, 12, 13, 14, 15 ou 16.

59. Plasmídeo de expressão de CTLA4-Ig tendo a seqüência de ácido nucleico de SEQ ID NO:17.

60. Composição substancialmente purificada compreendendo moléculas de CTLA4-Ig, em que as moléculas de CTLA4-Ig têm uma proporção molar média de ácido siálico para proteína de CTLA4-Ig de cerca de 5,5 a cerca de 18.

5 61. Composição substancialmente purificada compreendendo moléculas de CTLA4-Ig, em que as moléculas de CTLA4-Ig têm uma proporção molar média de ácido siálico para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 5,5 a cerca de 9,5.

10 62. Composição substancialmente purificada compreendendo moléculas de CTLA4-Ig, em que as moléculas de CTLA4-Ig têm uma proporção molar média de ácido siálico para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 5 a cerca de 10.

15 63. Composição substancialmente purificada compreendendo moléculas de CTLA4-Ig, em que as moléculas de CTLA4-Ig têm uma proporção molar média de ácido siálico para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 6 a cerca de 18.

20 64. Composição substancialmente purificada compreendendo moléculas de CTLA4-Ig, em que as moléculas de CTLA4-Ig têm uma proporção molar média de ácido siálico para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 8 a cerca de 18.

25 65. Composição substancialmente purificada compreendendo moléculas de CTLA4-Ig, em que as moléculas de CTLA4-Ig têm uma proporção molar média de ácido siálico para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 8 a cerca de 12.

30 66. Composição substancialmente purificada compreendendo moléculas de CTLA4-Ig, em que as moléculas de CTLA4-Ig têm uma proporção molar média de ácido siálico para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 8 a cerca de 11.

30 67. Composição substancialmente purificada compreendendo moléculas de CTLA4-Ig, em que as moléculas de CTLA4-Ig têm uma proporção molar média de ácido siálico para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 7 a cerca de 12.

68. Composição substancialmente purificada compreendendo moléculas de CTLA4-Ig, em que as moléculas de CTLA4-Ig têm uma proporção molar média de ácido siálico para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 7 a cerca de 11.

5 69. Composição substancialmente purificada compreendendo moléculas de CTLA4-Ig, em que as moléculas de CTLA4-Ig têm uma proporção molar média de ácido siálico para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 11 a cerca de 18.

10 70. Composição substancialmente purificada compreendendo moléculas de CTLA4-Ig, em que as moléculas de CTLA4-Ig têm uma proporção molar média de ácido siálico para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 12 a cerca de 18.

15 71. Composição substancialmente purificada compreendendo moléculas de CTLA4-Ig, em que as moléculas de CTLA4-Ig têm uma proporção molar média de ácido siálico para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 13 a cerca de 18.

20 72. Composição substancialmente purificada compreendendo moléculas de CTLA4-Ig, em que as moléculas de CTLA4-Ig têm uma proporção molar média de ácido siálico para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 14 a cerca de 18.

25 73. Composição substancialmente purificada compreendendo moléculas de CTLA4-Ig, em que as moléculas de CTLA4-Ig têm uma proporção molar média de ácido siálico para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 15 a cerca de 17.

 74. Composição substancialmente purificada compreendendo moléculas de CTLA4-Ig, em que as moléculas de CTLA4-Ig têm uma proporção molar média de ácido siálico para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 16.

30 75. Composição substancialmente purificada compreendendo moléculas de CTLA4-Ig, em que as moléculas de CTLA4-Ig têm uma proporção molar média de ácido siálico para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 10.

76. Composição substancialmente purificada compreendendo moléculas de CTLA4-Ig, em que as moléculas de CTLA4-Ig têm uma proporção molar média de ácido siálico para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 6.

5 77. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 60-76, em que o ácido siálico é ácido N-acetil neuramínico (NANA).

78. Composição substancialmente purificada compreendendo moléculas de CTLA4-Ig, em que as moléculas de CTLA4-Ig têm uma proporção molar média de NANA para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 8 a cerca de 12.

10 79. Composição substancialmente purificada compreendendo moléculas de CTLA4-Ig, em que as moléculas de CTLA4-Ig têm uma proporção molar média de ácido N-glicolil neuramínico (NGNA) para moléculas de CTLA4-Ig de menos de ou igual a cerca de 1,5.

15 80. Composição substancialmente purificada compreendendo moléculas de CTLA4-Ig, em que as moléculas de CTLA4-Ig têm uma proporção molar média de NGNA para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 0,5 a cerca de 1,5.

20 81. Composição substancialmente purificada compreendendo moléculas de CTLA4-Ig, em que as moléculas de CTLA4-Ig têm uma proporção molar média de NGNA para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 1,0 a cerca de 1,5.

25 82. Composição substancialmente purificada compreendendo moléculas de CTLA4-Ig, em que as moléculas de CTLA4-Ig têm uma proporção molar média de ácido siálico para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 6 a cerca de 18.

83. Composição substancialmente purificada compreendendo moléculas de CTLA4-Ig, em que as moléculas de CTLA4-Ig são caracterizadas por uma proporção molar média de ácido siálico por mol de moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 6 a cerca de 12.

30 84. Composição substancialmente purificada compreendendo moléculas de CTLA4-Ig, em que cada polipeptídeo da molécula compreende a seqüência de SEQ ID NO:11, 12, 13, 14, 15 ou 16 e em que as moléculas

de CTLA4-Ig são caracterizadas por uma proporção molar média de ácido siálico por mol de moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 5,5 a cerca de 9,5.

5 85. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 78-84, em que a proporção molar de ácido siálico por mol de moléculas de CTLA4-Ig é determinada através de hidrólise ácida e HPLC.

86. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 78-84, em que as moléculas de CTLA4-Ig compreendem um ou mais polipeptídeos tendo SEQ ID NO:2, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10.

10 87. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 78-84, em que as moléculas de CTLA4-Ig compreendem um ou mais polipeptídeos tendo SEQ ID NO:4, 11, 12, 13, 14, 15 ou 16.

15 88. Composição substancialmente purificada compreendendo moléculas de CTLA4-Ig, em que uma área de mais do que ou igual a 95 por cento das moléculas de CTLA4-Ig são dímeros de CTLA4-Ig, conforme determinado através de cromatografia por exclusão de tamanho e detecção espectrofotométrica.

20 89. Composição de acordo com a reivindicação 88, em que mais do que ou igual a 98% das moléculas de CTLA4-Ig são dímeros de CTLA4-Ig.

90. Composição de acordo com a reivindicação 88, em que mais do que ou igual a 99% das moléculas de CTLA4-Ig são dímeros de CTLA4-Ig.

25 91. Composição de acordo com a reivindicação 88, em que mais do que ou igual a 99,5% das moléculas de CTLA4-Ig são dímeros de CTLA4-Ig.

30 92. Composição de acordo com a reivindicação 88, em que de cerca de 95% a cerca de 99,5% das moléculas de CTLA4-Ig são dímeros de CTLA4-Ig e uma área de cerca de 0,5 por cento a uma área de cerca de 5 por cento das moléculas são espécies de elevado peso molecular de CTLA4-Ig conforme determinado através de cromatografia por exclusão de tamanho e detecção espectrofotométrica.

93. Composição de acordo com a reivindicação 88, em que cer-

ca de 98,6% das moléculas são dímeros de CTLA4-Ig e uma área de cerca de 1,2 por cento das moléculas são espécies de elevado peso molecular de CTLA4-Ig e uma área de menos de cerca de 0,7 por cento das moléculas são monômeros de CTLA4-Ig conforme determinado através de cromatografia por exclusão de tamanho e detecção espectrofotométrica.

5 94. Composição de acordo com a reivindicação 88, em que cerca de menos de 0,3% das moléculas são multímeros compreendendo cinco ou mais monômeros de CTLA4-Ig.

10 95. Composição consistindo essencialmente de dímeros de CTLA4-Ig.

96. Composição consistindo essencialmente de moléculas de CTLA4-Ig, em que a população é substancialmente isenta de monômeros de CTLA4-Ig.

15 97. Composição consistindo essencialmente de moléculas de CTLA4-Ig, em que a população é substancialmente isenta de espécies de elevado peso molecular de CTLA4-Ig.

98. Composição consistindo essencialmente de monômeros de CTLA4-Ig substancialmente isenta de dímeros de CTLA4-Ig e espécies de elevado peso molecular.

20 99. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 95-98, em que cada monômero de cada dímero de CTLA4-Ig tem pelo menos 3 grupos ácido siálico.

25 100. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 95-98, em que cada monômero de cada dímero de CTLA4-Ig tem pelo menos 2,5 grupos ácido siálico.

101. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 95-98, em que cada monômero de cada dímero de CTLA4-Ig tem de pelo menos 3 grupos ácido siálico para pelo menos 8 grupos ácido siálico.

30 102. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 95-98, em que cada monômero de cada dímero de CTLA4-Ig tem de pelo menos 2,5 grupos ácido siálico para pelo menos 5 grupos ácido siálico.

103. Composição de acordo com qualquer uma das reivindica-

ções 95-98, em que cada dímero compreende dois polipeptídeos de CTLA4-Ig, em que cada polipeptídeo tem uma seqüência de aminoácido selecionada do grupo consistindo de SEQ ID NOS:5-16.

5 104. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 95-98, em que a composição compreende um ou mais polipeptídeos tendo SEQ ID NO:2, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10.

105. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 95-98, em que a composição compreende um ou mais polipeptídeos tendo SEQ ID NO:4, 11, 12, 13, 14, 15 ou 16.

10 106. Composição isolada compreendendo tetrâmeros de CTLA4-Ig a qual é substancialmente isenta de dímeros de CTLA4-Ig.

107. Composição isolada compreendendo tetrâmeros de CTLA4-Ig a qual é substancialmente isenta de monômeros de CTLA4-Ig.

15 108. Composição de acordo com a reivindicação 106 ou 107, em que a composição existe como uma quantidade que é maior do que cerca de 100 gramas.

20 109. Composição de tetrâmeros de CTLA4-Ig de acordo com a reivindicação 106 ou 107, em que cada tetrâmero compreende dois pares de polipeptídeos de CTLA4-Ig, em que cada polipeptídeo tem uma seqüência de aminoácido selecionada do grupo consistindo de SEQ ID NOS:5-10.

110. Composição de tetrâmeros de CTLA4-Ig de acordo com a reivindicação 106 ou 107, em que cada tetrâmero compreende dois pares de polipeptídeos de CTLA4-Ig, em que cada polipeptídeo tem uma seqüência de aminoácido selecionada do grupo consistindo de SEQ ID NOS:11-16.

25 111. Composição de acordo com a reivindicação 106 ou 107, em que cada tetrâmero é capaz de se ligar à CD80 ou CD86.

112. Composição farmacologicamente aceitável compreendendo moléculas de CTLA4-Ig, em que a composição é substancialmente isenta de MCP-1.

30 113. Composição farmacologicamente aceitável compreendendo moléculas de CTLA4-Ig, em que a composição compreende não mais do que cerca de 25 ppm de MCP-1.

114. Composição de acordo com a reivindicação 113, em que a composição compreende não mais do que 10 ppm de MCP-1.

5 115. Composição de acordo com a reivindicação 113, em que a composição compreende cerca de 0,2 ng/ml de MCP-1 a cerca de 10 ng / ml de MCP-1.

116. Composição farmacologicamente aceitável compreendendo moléculas de CTLA4-Ig, em que a composição compreende (a) de cerca de 0,2 ng/ml de MCP-1 a cerca de 10 ng / ml de MCP-1 e (b) não mais do que 25 ng/ml de proteína CHO ou não mais do que 10 ng/ml de proteína CHO.

10 117. Composição de acordo com a reivindicação 116, em que a composição compreende não mais do que cerca de 20 pg/ml de DNA.

118. Composição isolada compreendendo moléculas de CTLA4-Ig em que, quando administrada a um indivíduo em uma dose intravenosa de cerca de 10 mg/kg, como moléculas de CTLA4-Ig são capazes de exibir:

15 (a) uma área sob a curva (AUC) de cerca de 44400 $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{ml}$;
(b) um volume de distribuição de cerca de 0,09 L/kg;
(c) uma concentração de pico (C_{max}) de cerca de 292 $\mu\text{g}/\text{ml}$;

e

(d) uma taxa de eliminação de cerca de 0,23 ml/h/kg.

20 119. Composição isolada compreendendo moléculas de CTLA4-Ig, em que a composição compreende isoformas dominantes de moléculas de CTLA4-Ig visualizáveis sobre um gel de focalização isoeletrica o qual têm um ponto isoeletrico, pI , menos do que ou igual a $5,1 \pm 0,2$ conforme determinado através de focalização isoeletrica.

25 120. Composição de acordo com a reivindicação 119, em que o pI médio da composição aumenta após tratamento com neuraminidase.

121. Composição de acordo com a reivindicação 119, em que pelo menos 40% das moléculas de CTLA4-Ig exibem um ponto isoeletrico menos de ou igual a cerca de $5,1 \pm 0,2$ conforme determinado através de focalização isoeletrica.

30

122. Composição de acordo com a reivindicação 119, em que pelo menos 70% das moléculas de CTLA4-Ig exibem um ponto isoeletrico

menos de ou igual a cerca de $5,1 \pm 0,2$ conforme determinado através de focalização isoelétrica.

5 123. Composição de acordo com a reivindicação 119, em que pelo menos 90% das moléculas de CTLA4-Ig exibem um ponto isoelétrico menos de ou igual a cerca de $5,1 \pm 0,2$ conforme determinado através de focalização isoelétrica.

124. Composição isolada compreendendo moléculas de CTLA4-Ig tendo um pl de cerca de $3,0 \pm 0,2$ a cerca de $5,0 \pm 0,2$.

10 125. Composição isolada compreendendo moléculas de CTLA4-Ig tendo um pl de cerca de $4,3 \pm 0,2$ a cerca de $5,0 \pm 0,2$.

126. Composição isolada compreendendo moléculas de CTLA4-Ig tendo um pl de cerca de $3,3 \pm 0,2$ a cerca de $4,7 \pm 0,2$.

127. Composição de acordo com a reivindicação 124, 125 ou 126, em que a composição é substancialmente purificada.

15 128. Método para preparo de uma composição, a composição compreendendo uma molécula de CTLA4-Ig com um pl de cerca de $3,0 \pm 0,2$ a cerca de $5,0 \pm 0,2$, o método compreendendo: (a) sujeição de uma mistura de moléculas de CTLA4-Ig à eletroforese em gel de focalização isoelétrica, em que uma única banda sobre o gel representa uma população de
20 moléculas de CTLA4-Ig com um pl em particular e (b) isolamento da população de moléculas de CTLA4-Ig tendo um pl de cerca de $3,0 \pm 0,2$ a cerca de $5,0 \pm 0,2$ de modo a preparar a composição.

25 129. Composição isolada compreendendo moléculas de CTLA4-Ig, em que a composição compreende isoformas dominantes visualizáveis sobre um gel de focalização isoelétrica o qual têm um ponto isoelétrico, pl, menos do que ou igual a $5,5 \pm 0,2$ conforme determinado através de focalização isoelétrica.

130. Composição de acordo com a reivindicação 129, em que o pl médio da composição aumenta após tratamento com neuraminidase.

30 131. Composição de acordo com a reivindicação 129, em que pelo menos 40% das moléculas de CTLA4-Ig exibem um ponto isoelétrico menos de ou igual a cerca de $5,3 \pm 0,2$ conforme determinado através de

focalização isoelétrica.

5 132. Composição de acordo com a reivindicação 129, em que pelo menos 70% das moléculas de CTLA4-Ig exibem um ponto isoelétrico menos de ou igual a cerca de $5,3 \pm 0,2$ conforme determinado através de focalização isoelétrica.

133. Composição de acordo com a reivindicação 129, em que pelo menos 90% das moléculas de CTLA4-Ig exibem um ponto isoelétrico menos de ou igual a cerca de $5,3 \pm 0,2$ conforme determinado através de focalização isoelétrica.

10 134. Composição isolada compreendendo moléculas de CTLA4-Ig tendo um pI de cerca de $3,0 \pm 0,2$ a cerca de $5,2 \pm 0,2$.

135. Composição isolada compreendendo moléculas de CTLA4-Ig tendo um pI de cerca de $4,5 \pm 0,2$ a cerca de $5,2 \pm 0,2$.

15 136. Composição isolada compreendendo moléculas de CTLA4-Ig tendo um pI de cerca de $4,7 \pm 0,2$ a cerca de $5,1 \pm 0,2$.

137. Composição de acordo com a reivindicação 134, 135 ou 136, em que a composição é substancialmente purificada.

20 138. Método para preparo de uma composição, a composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig com um pI de cerca de $2,0 \pm 0,2$ a cerca de $5,2 \pm 0,2$, o método compreendendo: (a) sujeição de uma mistura de moléculas de CTLA4-Ig à eletroforese em gel de focalização isoelétrica, em que uma única banda sobre o gel representa uma população de moléculas de CTLA4-Ig com um pI em particular e (b) isolamento da população de moléculas de CTLA4-Ig tendo um pI de cerca de $3,0 \pm 0,2$ a cerca de $5,2 \pm 0,2$ de modo a preparar a composição.

25 139. Composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig, em que as moléculas de CTLA4-Ig são caracterizadas por uma proporção molar média de GlcNAc para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 17 a cerca de 28.

30 140. Composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig, em que as moléculas de CTLA4-Ig são caracterizadas por uma proporção molar média de GlcNAc para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 17 a cerca de

25.

141. Composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig, em que as moléculas de CTLA4-Ig são caracterizadas por uma proporção molar média de GlcNAc para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 15 a cerca de 35.

142. Composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig, em que cada polipeptídeo da molécula compreende a seqüência de SEQ ID NO:11, 12, 13, 14, 15 ou 16 e em que as moléculas de CTLA4-Ig são caracterizadas por uma proporção molar média de GlcNAc para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 24 a cerca de 28.

143. Composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig, em que as moléculas de CTLA4-Ig são caracterizadas por uma proporção molar média de GalNAc para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 1,7 a cerca de 3,6.

144. Composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig, em que cada polipeptídeo da molécula compreende a seqüência de SEQ ID NO:11, 12, 13, 14, 15 ou 16 e em que as moléculas de CTLA4-Ig são caracterizadas por uma proporção molar média de GalNAc para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 2,7 a cerca de 3,6.

145. Composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig, em que as moléculas de CTLA4-Ig são caracterizadas por uma proporção molar média de galactose para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 8 a cerca de 17.

146. Composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig, em que cada polipeptídeo da molécula compreende a seqüência de SEQ ID NO:11, 12, 13, 14, 15 ou 16 e em que as moléculas de CTLA4-Ig são caracterizadas por uma proporção molar média de galactose para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 11 a cerca de 13.

147. Composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig, em que as moléculas de CTLA4-Ig são caracterizadas por uma proporção molar média de fucose para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 3,5 a cerca de 8,3.

148. Composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig, em que cada polipeptídeo da molécula compreende a seqüência de SEQ ID NO:11, 12, 13, 14, 15 ou 16 e em que as moléculas de CTLA4-Ig são caracterizadas por uma proporção molar média de fucose para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 6,4 a cerca de 7,0.

149. Composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig, em que as moléculas de CTLA4-Ig são caracterizadas por uma proporção molar média de manose para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 7,7 a cerca de 22.

150. Composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig, em que cada polipeptídeo da molécula compreende a seqüência de SEQ ID NO:11, 12, 13, 14, 15 ou 16 e em que as moléculas de CTLA4-Ig são caracterizadas por uma proporção molar média de manose para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 14 a cerca de 16.

151. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 139-150, em que a proporção molar de GlcNAc para moléculas de CTLA4-Ig é determinada através de eletroforese capilar.

152. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 139-150, em que a proporção molar de GalNAc para moléculas de CTLA4-Ig é determinada através de eletroforese capilar.

153. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 139-150, em que a proporção molar de galactose para moléculas de CTLA4-Ig é determinada através de eletroforese capilar.

154. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 139-150, em que a proporção molar de fucose para moléculas de CTLA4-Ig é determinada através de eletroforese capilar.

155. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 139-150, em que a proporção molar de manose para moléculas de CTLA4-Ig é determinada através de eletroforese capilar.

156. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 139-150, em que as moléculas de CTLA4-Ig são obtidas através de fixação enzimática de um ou mais carboidratos à molécula.

157. Composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig, em que as moléculas compreendem resíduos de carboidrato presos à moléculas enzimaticamente *in vitro*.

5 158. Composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig caracterizada por:

(a) uma proporção molar média de GlcNAc para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 15 a cerca de 35; e

(b) uma proporção molar média de ácido siálico para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 6 a cerca de 12.

10 159. Composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig caracterizada por:

(a) uma proporção molar média de GlcNAc para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 15 a cerca de 35;

15 (b) uma proporção molar média de GalNAc para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 1,7 a cerca de 3,6; e

(c) uma proporção molar média de ácido siálico para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 6 a cerca de 12.

160. Composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig caracterizada por:

20 (a) uma proporção molar média de GlcNAc para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 15 a cerca de 35;

(b) uma proporção molar média de GalNAc para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 1,7 a cerca de 3,6;

25 (c) uma proporção molar média de galactose para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 8 a cerca de 17; e

(d) uma proporção molar média de ácido siálico para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 6 a cerca de 12.

161. Composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig caracterizada por:

30 (a) uma proporção molar média de GlcNAc para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 15 a cerca de 35;

(b) uma proporção molar média de GalNAc para moléculas de

CTLA4-Ig de cerca de 1,7 a cerca de 3,6;

(c) uma proporção molar média de galactose para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 8 a cerca de 17;

(d) uma proporção molar média de fucose para moléculas de
5 CTLA4-Ig de cerca de 3,5 a cerca de 8,3; e

(e) uma proporção molar média de ácido siálico para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 6 a cerca de 12.

162. Composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig caracterizada por:

10 (a) uma proporção molar média de GlcNAc para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 15 a cerca de 35;

(b) uma proporção molar média de GalNAc para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 1,7 a cerca de 3,6;

(c) uma proporção molar média de galactose para moléculas
15 de CTLA4-Ig de cerca de 8 a cerca de 17;

(d) uma proporção molar média de fucose para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 3,5 a cerca de 8,3;

(e) uma proporção molar média de manose para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 7,2 a cerca de 22; e

20 (f) uma proporção molar média de ácido siálico para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 6 a cerca de 12.

163. Composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig caracterizada por:

25 (a) uma proporção molar média de GlcNAc para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 24 a cerca de 28; e

(b) uma proporção molar média de ácido siálico para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 5,5 a cerca de 9,5.

164. Composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig caracterizada por:

30 (a) uma proporção molar média de GlcNAc para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 24 a cerca de 28;

(b) uma proporção molar média de GalNAc para moléculas de

CTLA4-Ig de cerca de 2,7 a cerca de 3,6; e

(c) uma proporção molar média de ácido siálico para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 5,5 a cerca de 9,5.

5 165. Composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig caracterizada por:

(a) uma proporção molar média de GlcNAc para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 24 a cerca de 28;

(b) uma proporção molar média de GalNAc para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 2,7 a cerca de 3,6;

10 (c) uma proporção molar média de gaitose para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 11 a cerca de 13; e

(d) uma proporção molar média de ácido siálico para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 5,5 a cerca de 9,5.

15 166. Composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig caracterizada por:

(a) uma proporção molar média de GlcNAc para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 24 a cerca de 28;

(b) uma proporção molar média de GalNAc para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 2,7 a cerca de 3,6;

20 (c) uma proporção molar média de galactose para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 11 a cerca de 13;

(d) uma proporção molar média de fucose para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 6,4 a cerca de 7,0; e

25 (e) uma proporção molar média de ácido siálico para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 5,5 a cerca de 9,5.

167. Composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig caracterizada por:

(a) uma proporção molar média de GlcNAc para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 24 a cerca de 28;

30 (b) uma proporção molar média de GalNAc para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 2,7 a cerca de 3,6;

(c) uma proporção molar média de galactose para moléculas

de CTLA4-Ig de cerca de 11 a cerca de 13;

(d) uma proporção molar média de fucose para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 6,4 a cerca de 7,0;

(e) uma proporção molar média de manose to proteína de C-
5 TLA4-Ig de cerca de 14 a cerca de 16; e

(f) uma proporção molar média de ácido siálico para proteína de CTLA4-Ig de cerca de 5,5 a cerca de 9,5.

168. Composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig, em que as moléculas de CTLA4-Ig são glicosiladas em um resíduo de aminoácido de asparagina na posição 102 de SEQ ID NO:2 ou 4; um resíduo de aminoácido de asparagina na posição 134 de SEQ ID NO:2 ou 4, um resíduo de aminoácido de asparagina na posição 233 de SEQ ID NO:2 ou 4, um resíduo de aminoácido de serina na posição 155 de SEQ ID NO:2 ou 4 ou um resíduo de aminoácido de serina na posição 165 de SEQ ID NO:2 ou 4.

15 169. Composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig, em que as moléculas de CTLA4-Ig são glicosiladas e em que pelo menos cerca de 2% da massa total de glicosilação é glicosilação O-ligada.

170. Composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig, em que a composição exibe um pico de cromatograma de NGNA de cerca de
20 $9,6 \pm 0,3$ e um cromatograma de pico de NANA de cerca de $10,5 \pm 0,3$.

171. Composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig, em que as moléculas de CTLA4-Ig exibem um perfil de carboidrato substancialmente o mesmo conforme a figura 68.

172. Composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig, em
25 que as moléculas de CTLA-Ig exibem um perfil de carboidrato conforme mostrado na figura 68.

173. Composição consistindo essencialmente de moléculas de CTLA4-Ig, em que as moléculas de CTLA4-Ig exibem um perfil de carboidrato dos Domínios I - IV, em que o Domínio I compreende picos os quais representam oligossacarídeos a-sialilados, o Domínio II compreende picos os quais representam oligossacarídeos mono-sialilados, Domínio III compreende picos os quais representam oligossacarídeos di-sialilados, Domínio IV
30

compreende picos os quais representam oligossacarídeos tri-sialilados e Domínio V compreende picos os quais representam oligossacarídeos tetra-sialilados e em que o perfil é um cromatograma de oligossacarídeos liberados de CTLA4-Ig.

5 174. Composição de acordo com a reivindicação 172, em que a diferença nos tempos de retenção de oligossacarídeos N-ligados entre um primeiro pico no Domínio I e um pico principal no Domínio II é de cerca de 10 a cerca de 12 minutos.

10 175. Composição de acordo com a reivindicação 172, em que a diferença nos tempos de retenção de oligossacarídeos N-ligados entre um primeiro pico no Domínio I e um pico principal no Domínio II é de cerca de 11 a cerca de 13 minutos.

15 176. Composição de acordo com a reivindicação 172, em que glicosilação dos Domínios III e IV compreende cerca de 25% a cerca de 36% de glicosilação N-ligada conforme medido através de HPAEC.

177. Composição de acordo com a reivindicação 172, em que glicosilação do Domínio I compreende cerca de 24,5% a cerca de 35,2% de glicosilação N-ligada conforme medido através de HPAEC.

20 178. Composição de acordo com a reivindicação 172, em que glicosilação do Domínio II compreende cerca de 26,3% a cerca de 34,1% de glicosilação N-ligada conforme medido através de HPAEC.

179. Composição de acordo com a reivindicação 172, em que glicosilação do Domínio III compreende cerca de 21,9% a cerca de 31,5% de glicosilação N-ligada conforme medido através de HPAEC.

25 180. Composição de acordo com a reivindicação 172, em que glicosilação do Domínio IV e Domínio V compreende cerca de 7,9% a cerca de 18,6% de glicosilação N-ligada conforme medido através de HPAEC.

181. Composição de acordo com a reivindicação 172, em que:

30 (a) o Domínio I exibe uma área percentual de pelo menos cerca de 31 %;

(b) o Domínio II exibe uma área percentual de pelo menos cerca de 33 %;

(c) o Domínio III exibe uma área percentual de pelo menos cerca de 24 %;

(d) o Domínio IV exibe uma área percentual de pelo menos cerca de 9,4 % ou

5 (e) o Domínio V exibe uma área percentual de pelo menos cerca de 6,7 %;

em que a área é medida a partir de um cromatograma de oligosacarídeos liberados de CTLA4-Ig.

182. Composição de acordo com a reivindicação 172, em que:

10 (a) o Domínio I exibe pelo menos cerca de 5 picos;

(b) o Domínio II exibe pelo menos cerca de 5 picos;

(c) o Domínio III exibe pelo menos cerca de 5 picos;

(d) o Domínio IV exibe pelo menos cerca de 6 picos,

(e) o Domínio V exibe pelo menos cerca de 6 picos ou

15 (f) o Domínio I exibe pelo menos 3 picos,

em que os picos são exibidos sobre um cromatograma.

183. Composição compreendendo polipeptídeos de CTLA4-Ig,

em que:

20 (a) cerca de 80 % dos polipeptídeos têm glicosilação N-ligada bi-antenária;

(b) cerca de 14 % dos polipeptídeos têm glicosilação N-ligada tri-antenária; e

(c) cerca de 6 % dos polipeptídeos têm glicosilação N-ligada tetra-antenária.

25 184. Composição de acordo com a reivindicação 183, em que a glicosilação N-ligada é determinada através de cromatografia de troca de ânions em elevado pH com detecção amperométrica pulsada (HPEAC-PAD).

185. Composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig caracterizada por:

30 (a) uma proporção molar média de galactose para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 8 a cerca de 17; e

(b) uma proporção molar média de NANA para moléculas de

CTLA4-Ig de cerca de 6 a cerca de 12.

186. Composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig caracterizada por:

5 (a) uma proporção molar média de galactose para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 8 a cerca de 17;

(b) uma proporção molar média de NANA para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 6 a cerca de 12; e

10 (c) uma área percentual de espécies de elevado peso molecular de CTLA4-Ig de menos de cerca de 3% conforme determinado através de cromatografia por exclusão de tamanho e detecção espectrofotométrica.

187. Composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig caracterizada por:

(a) uma proporção molar média de galactose para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 8 a cerca de 17;

15 (b) uma proporção molar média de NANA para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 6 a cerca de 12; e

(c) uma proporção molar média de NGNA para moléculas de CTLA4-Ig de menos de ou igual a cerca de 1,5.

20 188. Composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig caracterizada por:

(a) uma proporção molar média de galactose para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 8 a cerca de 17;

(b) uma proporção molar média de NANA para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 6 a cerca de 12;

25 (c) um teor de agregado de CTLA4-Ig de elevado peso molecular com uma área de menos de cerca de 3 por cento conforme determinado através de cromatografia por exclusão de tamanho e detecção espectrofotométrica; e

30 (d) um perfil de carboidrato substancialmente o mesmo conforme aquele da figura 68.

189. Composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig caracterizada por:

(a) uma proporção molar média de galactose para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 8 a cerca de 17;

(b) uma proporção molar média de NANA para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 6 a cerca de 12;

5 (c) um teor de agregado de CTLA4-Ig de elevado peso com uma área de menos de cerca de 3 por cento conforme determinado através de cromatografia por exclusão de tamanho e detecção espectrofotométrica; e

(d) um teor de glicosilação no Domínios III, IV e V de pelo menos cerca de 29,8% a cerca de 50,1% de glicosilação N-ligada conforme determinado através de HPAEC.

10 190. Composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig caracterizada por:

(a) uma proporção molar média de galactose para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 8 a cerca de 17;

(b) uma proporção molar média de NANA para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 6 a cerca de 12; e

(c) uma área de espécies de elevado peso molecular de CTLA4-Ig de menos de cerca de 3 por cento conforme determinado através de cromatografia por exclusão de tamanho e detecção espectrofotométrica.

20 191. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 185-190, em que as moléculas são ainda caracterizadas por uma proporção molar média de NANA para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 8 a cerca de 12.

25 192. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 185-190, em que as moléculas são ainda caracterizadas por:

(a) cerca de 80 % glicosilação N-ligada bi-antenária;

(b) cerca de 14 % glicosilação N-ligada tri-antenária; e

(c) cerca de 6 % glicosilação N-ligada tetra-antenária.

30 193. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 192, em que as moléculas ainda compreendem qualquer combinação de um ou mais de:

(a) a seqüência de aminoácido de SEQ ID NO:10 (metionina na posição de aminoácido 27 e glicina na posição de aminoácido 382 de SEQ ID NO:2);

5 (b) a seqüência de aminoácido de SEQ ID NO:7 (metionina na posição de aminoácido 27 e lisina na posição de aminoácido 383 de SEQ ID NO:2);

(c) a seqüência de aminoácido de SEQ ID NO:9 (alanina na posição de aminoácido 26 e glicina na posição de aminoácido 382 de SEQ ID NO:2); e

10 (d) a seqüência de aminoácido de SEQ ID NO:6 (alanina na posição de aminoácido 26 e lisina na posição de aminoácido 383 de SEQ ID NO:2).

194. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 185-190, em que:

15 (a) cerca de 90% das moléculas compreendem a seqüência de aminoácido de SEQ ID NO:2 começando com a metionina no resíduo 27;

(b) cerca de 10% das moléculas compreendem a seqüência de aminoácido de SEQ ID NO:2 começando com a alanina no resíduo número 26;

20 (c) cerca de 4% das moléculas compreendem a seqüência de aminoácido de SEQ ID NO:2 terminando com a lisina no resíduo número 383; e

(d) cerca de 96% das moléculas compreendem a seqüência de aminoácido de SEQ ID NO:2 terminando com a glicina no resíduo número
25 382.

195. Composição compreendendo polipeptídeos de CTLA4-Ig, em que:

(a) cerca de 80 % dos polipeptídeos têm glicosilação N-ligada bi-antenária;

30 (b) cerca de 14 % dos polipeptídeos têm glicosilação N-ligada tri-antenária;

(c) cerca de 6 % dos polipeptídeos têm glicosilação N-ligada

tetra-antenária; e

- (d) uma proporção molar média de NGNA para moléculas de CTLA4-Ig de menos do que ou igual a 1,5.

196. Composição compreendendo polipeptídeos de CTLA4-Ig,

5 em que:

- (a) cerca de 80% dos polipeptídeos têm glicosilação N-ligada bi-antenária;

- (b) cerca de 14 % dos polipeptídeos têm glicosilação N-ligada tri-antenária;

- 10 (c) cerca de 6 % dos polipeptídeos têm glicosilação N-ligada tetra-antenária; e

- (d) uma proporção molar média de GlcNAc para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 15 a cerca de 35.

197. Composição compreendendo polipeptídeos de CTLA4-Ig,

15 em que:

- (a) cerca de 80 % dos polipeptídeos têm glicosilação N-ligada bi-antenária;

- (b) cerca de 14 % dos polipeptídeos têm glicosilação N-ligada tri-antenária;

- 20 (c) cerca de 6 % dos polipeptídeos têm glicosilação N-ligada tetra-antenária; e

- (d) uma proporção molar média de GalNAc para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 1,7 a cerca de 3,6.

198. Composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig ca-

25 racterizada por:

- (a) uma proporção molar média de galactose para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 11 a cerca de 13; e

- (b) uma proporção molar média de ácido siálico para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 5,5 a cerca de 9,5.

30 199. Composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig caracterizada por:

- (a) uma proporção molar média de galactose para moléculas

de CTLA4-Ig de cerca de 11 a cerca de 13;

(b) uma proporção molar média de ácido siálico para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 5,5 a cerca de 9,5; e

5 (c) um teor de espécies de elevado peso molecular de CTLA4-Ig com uma área de menos de cerca de 5 por cento conforme determinado através de cromatografia por exclusão de tamanho e detecção espectrofotométrica.

200. Composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig caracterizada por:

10 (a) uma proporção molar média de galactose para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 11 a cerca de 13;

(b) uma proporção molar média de ácido siálico para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 5,5 a cerca de 9,5;

15 (c) um teor de espécies de elevado peso molecular de CTLA4-Ig com uma área de menos de cerca de 5 por cento conforme determinado através de cromatografia por exclusão de tamanho e detecção espectrofotométrica; e

(d) um perfil de carboidrato substancialmente o mesmo conforme aquele da figura 68.

20 201. Composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig caracterizada por:

(a) uma proporção molar média de galactose para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 11 a cerca de 13;

25 (b) uma proporção molar média de ácido siálico para moléculas de CTLA4-Ig de 5,5 a cerca de 9,5;

(c) um teor de espécies de elevado peso molecular de CTLA4-Ig com uma área de menos de cerca de 5 por cento conforme determinado através de cromatografia por exclusão de tamanho e detecção espectrofotométrica; e

30 (d) um teor de glicosilação no Domínios III, IV e V de pelo menos cerca de 29,8% a cerca de 50,1% de glicosilação N-ligada conforme determinado através de HPAEC.

202. Composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig caracterizada por:

(a) uma proporção molar média de galactose para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 11 a cerca de 13;

5 (b) uma proporção molar média de ácido siálico para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 5,5 a cerca de 9,5; e

(c) um teor de espécies de elevado peso molecular de CTLA4-Ig com uma área de menos de cerca de 5 por cento conforme determinado através de cromatografia por exclusão de tamanho e detecção espectrofotométrica.

10

203. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 195-202, em que as moléculas são ainda caracterizadas por:

(a) cerca de 80 % glicosilação N-ligada bi-antenária;

(b) cerca de 14 % glicosilação N-ligada tri-antenária; e

15 (c) cerca de 6 % glicosilação N-ligada tetra-antenária.

204. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 195-202, em que as moléculas ainda compreendem qualquer combinação de um ou mais de:

(a) a seqüência de aminoácido de SEQ ID NO:16 (metionina na posição de aminoácido 27 e glicina na posição de aminoácido 382 de SEQ ID NO:4);

20

(b) a seqüência de aminoácido de SEQ ID NO:13 (metionina na posição de aminoácido 27 e lisina na posição de aminoácido 383 de SEQ ID NO:4);

25 (c) a seqüência de aminoácido de SEQ ID NO:15 (alanina na posição de aminoácido 26 e glicina na posição de aminoácido 382 de SEQ ID NO:4); e

(d) a seqüência de aminoácido de SEQ ID NO:12 (alanina na posição de aminoácido 26 e lisina na posição de aminoácido 383 de SEQ ID NO:4).

30

205. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 195-202, em que:

(a) cerca de 90% das moléculas compreendem a seqüência de aminoácido de SEQ ID NO:4 começando com a metionina no resíduo 27;

(b) cerca de 10% das moléculas compreendem a seqüência de aminoácido de SEQ ID NO:4 começando com a alanina no resíduo número 26;

(c) cerca de 4% das moléculas compreendem a seqüência de aminoácido de SEQ ID NO:4 terminando com a lisina no resíduo número 383; e

(d) cerca de 96% das moléculas compreendem a seqüência de aminoácido de SEQ ID NO:4 terminando com a glicina no resíduo número 382.

206. Composição compreendendo polipeptídeos de CTLA4-Ig, em que:

(a) cerca de 80 % dos polipeptídeos têm glicosilação N-ligada bi-antenária;

(b) cerca de 14 % dos polipeptídeos têm glicosilação N-ligada tri-antenária;

(c) cerca de 6 % dos polipeptídeos têm glicosilação N-ligada tetra-antenária; e

(d) uma proporção molar média de GlcNAc por mol de proteína de CTLA4-Ig de cerca de 24 a cerca de 28.

207. Composição compreendendo polipeptídeos de CTLA4-Ig, em que:

(a) cerca de 80% dos polipeptídeos têm glicosilação N-ligada bi-antenária;

(b) cerca de 14% dos polipeptídeos têm glicosilação N-ligada tri-antenária;

(c) cerca de 6% dos polipeptídeos têm glicosilação N-ligada tetra-antenária; e

(d) uma proporção molar média de GalNAc para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 2,7 a cerca de 3,6.

208. Composição de acordo com qualquer uma das reivindica-

ções 157-172, 195-202 ou 206-207, em que a composição é composição substancialmente purificada.

5 209. Composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig, em que menos de ou igual a cerca de 2,5 % das moléculas de CTLA4-Ig são oxidadas.

210. Composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig, em que menos de ou igual a cerca de 2,0 % das moléculas de CTLA4-Ig são deamidadas.

10 211. Composição compreendendo dímeros de moléculas de CTLA4-Ig, em que pelo menos 0,5 % dos dímeros de moléculas de CTLA4-Ig são cisteinilados.

212. Composição de acordo com a reivindicação 211, em que pelo menos 1,0% dos dímeros de moléculas de CTLA4-Ig são cisteinilados.

15 213. População de moléculas de CTLA4-Ig, em que a população exibe um perfil de espectrometria de massa substancialmente o mesmo conforme a figura 49.

214. População de moléculas de CTLA4-Ig, em que a população exibe um perfil de eletroforese capilar substancialmente o mesmo conforme a figura 48.

20 215. Composição de CTLA4-Ig obtida através de qualquer método de acordo com as reivindicações 1-55.

216. Composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig, em que a composição é caracterizada por:

25 (a) uma proporção molar média de GlcNAc para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 15 a cerca de 35;

(b) uma proporção molar média de GalNAc para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 1,7 a cerca de 3,6;

(c) uma proporção molar média de galactose para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 8 a cerca de 17;

30 (d) uma proporção molar média de fucose para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 3,5 a cerca de 8,3;

(e) uma proporção molar média de manose para moléculas de

CTLA4-Ig de cerca de 7.2 a cerca de 22;

(f) uma proporção molar média de ácido siálico para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 6 a cerca de 12;

(g) um pI conforme determinado a partir de visualização sobre um gel de focalização isoelétrica em uma faixa de cerca de $2,4 \pm 0,2$ a cerca de $5,0 \pm 0,2$;

(h) MCP-1 de menos do que ou igual a 3 ppm;

(i) uma área de menos de 2,5 por cento de espécies de elevado peso molecular conforme determinado através de cromatografia por exclusão de tamanho e detecção espectrofotométrica;

(j) uma área de menos de 0,5 por cento de monômeros conforme determinado através de cromatografia por exclusão de tamanho e detecção espectrofotométrica;

(k) polipeptídeos de CTLA4-Ig tendo uma seqüência de aminoácido pelo menos 95% idêntica a qualquer uma de SEQ ID NOS:5-10;

(l) moléculas de CTLA4-Ig capazes de se ligar à CD80 e CD86.

217. Composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig, em que a população de moléculas é caracterizada por:

(a) uma proporção molar média de GlcNAc para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 15 a cerca de 35;

(b) uma proporção molar média de GalNAc para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 1,7 a cerca de 3,6;

(c) uma proporção molar média de galactose para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 8 a cerca de 17;

(d) uma proporção molar média de fucose para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 3,5 a cerca de 8,3;

(e) uma proporção molar média de manose para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 7,2 a cerca de 22;

(f) uma proporção molar média de ácido siálico para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 6 a cerca de 12;

(g) um pI conforme determinado a partir de visualização sobre

um gel de focalização isoeétrica em uma faixa de cerca de $3,4 \pm 0,2$ a cerca de $5,0 \pm 0,2$;

(h) MCP-1 de menos do que ou igual a 5 ppm;

5 (i) uma área de menos de 2,5 por cento de espécies de elevado peso molecular conforme determinado através de cromatografia por exclusão de tamanho e detecção espectrofotométrica;

(j) uma área de menos de 0,5 por cento de monômeros conforme determinado através de cromatografia por exclusão de tamanho e detecção espectrofotométrica;

10 (k) polipeptídeos de CTLA4-Ig tendo uma sequência de aminoácido pelo menos 95% idêntica a qualquer uma de SEQ ID NOS:5-10;

(l) moléculas de CTLA4-Ig capaz de se ligar à CD80 e CD86; ou equivalentes farmacêuticos da mesma.

15 218. Composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig, em que a população de moléculas é caracterizada por:

(a) uma proporção molar média de GlcNAc para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 24 a cerca de 28;

(b) uma proporção molar média de GalNAc para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 2,7 a cerca de 3,6;

20 (c) uma proporção molar média de galactose para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 11 a cerca de 13;

(d) uma proporção molar média de fucose para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 6,4 a cerca de 7,0;

25 (e) uma proporção molar média de manose para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 14 a cerca de 16;

(f) uma proporção molar média de ácido siálico para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 5,5 a cerca de 9,5;

30 (g) um pI conforme determinado a partir de visualização sobre um gel de focalização isoeétrica em uma faixa de cerca de $2,4 \pm 0,2$ a cerca de $5,2 \pm 0,2$;

(h) MCP-1 de menos do que ou igual a 5 ppm;

(i) uma área de menos de 5 por cento de espécies de elevado

peso molecular conforme determinado através de cromatografia por exclusão de tamanho e detecção espectrofotométrica;

(j) uma área de menos de 1 por cento de monômeros conforme determinado através de cromatografia por exclusão de tamanho e detecção espectrofotométrica;

(k) polipeptídeos de CTLA4-Ig tendo uma seqüência de aminoácido pelo menos 95% idêntica a qualquer uma de SEQ ID NOS:11-16;

(l) moléculas de CTLA4-Ig capaz de se ligar à CD80 e CD86.

219. Composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig, em que a população de moléculas é caracterizada por:

(a) uma proporção molar média de GlcNAc para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 24 a cerca de 28;

(b) uma proporção molar média de GalNAc para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 2,7 a cerca de 3,6;

(c) uma proporção molar média de galactose para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 11 a cerca de 13;

(d) uma proporção molar média de fucose para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 6,4 a cerca de 7,0;

(e) uma proporção molar média de manose para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 14 a cerca de 16;

(f) uma proporção molar média de ácido siálico para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 5,5 a cerca de 9,5;

(g) um pI conforme determinado a partir de visualização sobre um gel de focalização isoeétrica em uma faixa de cerca de $3,4 \pm 0,2$ a cerca de $5,2 \pm 0,2$;

(h) MCP-1 de menos do que ou igual a 5 ppm;

(i) uma área de menos de 5 por cento de espécies de elevado peso molecular conforme determinado através de cromatografia por exclusão de tamanho e detecção espectrofotométrica;

(j) uma área de menos de 1 por cento de monômeros conforme determinado através de cromatografia por exclusão de tamanho e detecção espectrofotométrica;

(k) polipeptídeos de CTLA4-Ig tendo uma seqüência de aminoácido pelo menos 95% idêntica a qualquer uma de SEQ ID NOS:11-16;

(l) moléculas de CTLA4-Ig capaz de se ligar à CD80 e CD86; ou equivalentes farmacêuticos da mesma.

5 220. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 216-219 ainda compreendendo um veículo farmacologicamente aceitável.

10 221. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 216-219, ainda compreendendo uma quantidade de monohidrato de maltose.

 222. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 216-219, ainda compreendendo um diluente, adjuvante ou veículo farmacologicamente aceitável.

15 223. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 216-219, ainda compreendendo maltose, monohidrato de fosfato de sódio monobásico, cloreto de sódio, hidróxido de sódio e água estéril.

20 224. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 216-219, ainda compreendendo sacarose, poloxâmico, monohidrato de fosfato de sódio monobásico, fosfato de sódio dibásico anídrico, cloreto de sódio, hidróxido de sódio e água estéril.

 225. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 216-219, ainda compreendendo sacarose, monohidrato de fosfato de sódio monobásico, cloreto de sódio, hidróxido de sódio, ácido clorídrico e água estéril.

25 226. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 216-219, em que a composição é liofilizada.

30 227. Composição liofilizada compreendendo uma quantidade eficaz da composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 216-219, maltose, monohidrato de fosfato de sódio monobásico, cloreto de sódio, hidróxido de sódio e ácido clorídrico.

 228. Composição liofilizada compreendendo uma quantidade eficaz da composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 216-

219, sacarose, monohidrato de fosfato de sódio monobásico, cloreto de sódio, hidróxido de sódio e ácido clorídrico.

229. Composição liofilizada de moléculas de CTLA4-Ig compreendendo uma área de pelo menos 95 por cento de dímeros de CTLA4-Ig e uma área de não mais do que 5 por cento de espécies de elevado peso molecular de CTLA4-Ig conforme determinado através de cromatografia por exclusão de tamanho e detecção espectrofotométrica.

230. Composição de acordo com a reivindicação 229, em que a composição compreende uma área de pelo menos 98 por cento de dímeros de CTLA4-Ig e uma área de não mais do que 2 por cento de espécies de elevado peso molecular de CTLA4-Ig conforme determinado através de cromatografia por exclusão de tamanho e detecção espectrofotométrica.

231. Composição de acordo com a reivindicação 229, em que a composição compreende uma área de pelo menos 99 por cento de dímero de CTLA4-Ig e uma área de não mais do que 1 por cento de espécies de elevado peso molecular de CTLA4-Ig conforme determinado através de cromatografia por exclusão de tamanho e detecção espectrofotométrica.

232. Composição de proteína de CTLA4-Ig liofilizada de acordo com a reivindicação 229, em que a composição compreende pelo menos 8,0 moles de ácido siálico por mol de proteína de CTLA4-Ig.

233. Composição de CTLA4-Ig liofilizada de acordo com a reivindicação 229, em que a composição compreende cerca de 15,7 a cerca de 31 moles de GlcNAc por mol de proteína de CTLA4-Ig.

234. Composição de CTLA4-Ig liofilizada de acordo com a reivindicação 229, em que a composição compreende cerca de 1,6 a cerca de 3,2 moles de GalNAc por mol de proteína de CTLA4-Ig.

235. Composição de CTLA4-Ig liofilizada de acordo com a reivindicação 229, em que a composição compreende cerca de 9,3 a cerca de 15,5 moles de galactose por mol de proteína de CTLA4-Ig.

236. Composição de CTLA4-Ig liofilizada de acordo com a reivindicação 229, em que a composição compreende cerca de 3,6 a cerca de 7,9 moles de fucose por mol de proteína de CTLA4-Ig.

237. Composição de CTLA4-Ig liofilizada de acordo com a reivindicação 229, em que a composição compreende cerca de 7,7 a cerca de 22 moles de manose por mol de proteína de CTLA4-Ig.

5 238. Composição de proteína de CTLA4-Ig liofilizada de acordo com a reivindicação 229, em que a composição compreende pelo menos 5,0 moles de ácido siálico por mol de proteína de CTLA4-Ig.

239. Composição de CTLA4-Ig liofilizada de acordo com a reivindicação 229, em que a composição compreende cerca de 24 a cerca de 28 moles de GlcNAc por mol de proteína de CTLA4-Ig.

10 240. Composição de CTLA4-Ig liofilizada de acordo com a reivindicação 229, em que a composição compreende cerca de 2,7 a cerca de 3,6 moles de GalNAc por mol de proteína de CTLA4-Ig.

15 241. Composição de CTLA4-Ig liofilizada de acordo com a reivindicação 229, em que a composição compreende cerca de 11 a cerca de 13 moles de galactose por mol de proteína de CTLA4-Ig.

242. Composição de CTLA4-Ig liofilizada de acordo com a reivindicação 229, em que a composição compreende cerca de 6,4 a cerca de 7,0 moles de fucose por mol de proteína de CTLA4-Ig.

20 243. Composição de CTLA4-Ig liofilizada de acordo com a reivindicação 229, em que a composição compreende cerca de 14 a cerca de 16 moles de manose por mol de proteína de CTLA4-Ig.

25 244. Kit farmacêutico compreendendo: (a) um recipiente contendo uma composição de CTLA4-Ig liofilizada de acordo com a reivindicação 229; e (b) instruções para reconstituição da composição de CTLA4-Ig liofilizada em solução para injeção.

245. Método para inibição de proliferação de células T ou ativação de células T, o método compreendendo contanto de uma célula T com uma quantidade eficaz da composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 56-58, 60-127, 129-137 e 139-244.

30 246. Método para inibição de uma resposta imune em um indivíduo, o método compreendendo administração, a um indivíduo que precisa do mesmo, de uma quantidade eficaz da composição de acordo com qual-

quer uma das reivindicações 56-58, 60-127, 129-137 e 139-244.

247. Método para tratamento de um distúrbio imune em um indivíduo, o método compreendendo administração, a um indivíduo que precisa do mesmo, de uma quantidade eficaz da composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 56-58, 60-127, 129-137 e 139-244.

248. Método para indução de tolerância imune a um antígeno em um indivíduo, o método compreendendo administração, a um indivíduo que precisa do mesmo, de uma quantidade eficaz da composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 56-58, 60-127, 129-137 e 139-244.

249. Método para tratamento de inflamação em um indivíduo, o método compreendendo administração, a um indivíduo que precisa do mesmo, de uma quantidade eficaz da composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 56-58, 60-127, 129-137 e 139-244.

250. Método para tratamento de artrite reumatóide compreendendo administração, a um indivíduo que precisa do mesmo, de uma quantidade eficaz da composição farmacêutica de acordo com qualquer uma das reivindicações 56-58, 60-127, 129-137 e 139-244.

251. Método para tratamento de doença reumática compreendendo administração, a um indivíduo que precisa do mesmo, de uma quantidade eficaz da composição farmacêutica de acordo com qualquer uma das reivindicações 56-58, 60-127, 129-137 e 139-244.

252. Método para tratamento de colite ulcerativa compreendendo administração, a um indivíduo que precisa do mesmo, de uma quantidade eficaz da composição farmacêutica de acordo com qualquer uma das reivindicações 56-58, 60-127, 129-137 e 139-244.

253. Método para tratamento de psoríase em um indivíduo, o método compreendendo administração, a um indivíduo que precisa do mesmo, de uma quantidade eficaz da composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 56-58, 60-127, 129-137 e 139-244.

254. Método para tratamento de lupus em um indivíduo, o método compreendendo administração, a um indivíduo que precisa do mesmo, de uma quantidade eficaz da composição de acordo com qualquer uma das

reivindicações 56-58, 60-127, 129-137 e 139-244.

255. Método para tratamento ou prevenção de uma alergia em um indivíduo, o método compreendendo administração, a um indivíduo que precisa do mesmo, de uma quantidade eficaz da composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 56-58, 60-127, 129-137 e 139-244.

256. Método para tratamento ou prevenção de doença enxerto versus hospedeiro em um indivíduo, o método compreendendo administração, a um indivíduo que precisa do mesmo, de uma quantidade eficaz da composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 56-58, 60-127, 129-137 e 139-244.

257. Método para tratamento ou prevenção de rejeição de um órgão transplantado em um indivíduo, o método compreendendo administração, a um indivíduo que precisa do mesmo, de uma quantidade eficaz da composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 56-58, 60-127, 129-137 e 139-244.

258. Método para tratamento ou prevenção de rejeição de tecido transplantado em um indivíduo, o método compreendendo administração, a um indivíduo que precisa do mesmo, de uma quantidade eficaz da composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 56-58, 60-127, 129-137 e 139-244.

259. Método para tratamento ou prevenção de rejeição de uma célula transplantada em um indivíduo, o método compreendendo administração, a um indivíduo que precisa do mesmo, de uma quantidade eficaz da composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 56-58, 60-127, 129-137 e 139-244.

260. Método para tratamento de esclerose múltipla em um indivíduo, o método compreendendo administração, a um indivíduo que precisa do mesmo, de uma quantidade eficaz da composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 56-58, 60-127, 129-137 e 139-244.

261. Método para tratamento de doença de Crohn em um indivíduo, o método compreendendo administração, a um indivíduo que precisa do mesmo, de uma quantidade eficaz da composição de acordo com qual-

quer uma das reivindicações 56-58, 60-127, 129-137 e 139-244.

5 262. Método para tratamento de diabetes do tipo I em um indivíduo, o método compreendendo administração, a um indivíduo que precisa do mesmo, de uma quantidade eficaz da composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 56-58, 60-127, 129-137 e 139-244.

263. Método para tratamento de doença inflamatória do intestino em um indivíduo, o método compreendendo administração, a um indivíduo que precisa do mesmo, de uma quantidade eficaz da composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 56-58, 60-127, 129-137 e 139-244.

10 264. Método para tratamento de ooforite em um indivíduo, o método compreendendo administração, a um indivíduo que precisa do mesmo, de uma quantidade eficaz da composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 56-58, 60-127, 129-137 e 139-244.

15 265. Método para tratamento de glomerulonefrite em um indivíduo, o método compreendendo administração, a um indivíduo que precisa do mesmo, de uma quantidade eficaz da composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 56-58, 60-127, 129-137 e 139-244.

20 266. Método para tratamento de encefalomielite alérgica em um indivíduo, o método compreendendo administração, a um indivíduo que precisa do mesmo, de uma quantidade eficaz da composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 56-58, 60-127, 129-137 e 139-244.

25 267. Método para tratamento de miastenia gravis em um indivíduo, o método compreendendo administração, a um indivíduo que precisa do mesmo, de uma quantidade eficaz da composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 56-58, 60-127, 129-137 e 139-244.

268. Uso de uma população de moléculas de CTLA4-Ig tendo uma proporção molar média de grupos ácido siálico para proteína de CTLA4-Ig de cerca de 5 a cerca de 18 na fabricação de um medicamento para o tratamento terapêutico e/ou profilático de um distúrbio imune.

30 269. Uso de uma população de moléculas de CTLA4-Ig tendo uma proporção molar média de grupos ácido siálico para proteína de CTLA4-Ig de cerca de 5 a cerca de 18 na fabricação de um agente anti-artrite

reumatóide em uma embalagem junto com instruções para seu uso no tratamento de artrite reumatóide.

5 270. Método para inibição de proliferação de células T ou ativação de células T, o método compreendendo contanto de uma célula T com uma quantidade eficaz da composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 56-58, 60-127, 129-137 e 139-244 em combinação com metotrexato.

10 271. Método para inibição de uma resposta imune em um indivíduo, o método compreendendo administração, a um indivíduo que precisa do mesmo, de uma quantidade eficaz da composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 56-58, 60-127, 129-137 e 139-244 em combinação com metotrexato.

15 272. Método para indução de tolerância imune a um antígeno em um indivíduo, o método compreendendo administração, a um indivíduo que precisa do mesmo, de uma quantidade eficaz da composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 56-58, 60-127, 129-137 e 139-244 em combinação com metotrexato.

20 273. Composição isolada compreendendo moléculas de CTLA4-Ig tendo uma incidência de imunogenicidade de menos do que ou igual a 7,4%.

274. Composição isolada de acordo com a reivindicação 273, em que a incidência de imunogenicidade é de cerca de 2,1% a cerca de 7,4%.

25 275. Composição isolada de acordo com a reivindicação 273, em que a incidência de imunogenicidade é menos do que ou igual a 3,7%.

276. Composição isolada de acordo com a reivindicação 273, em que a incidência de imunogenicidade é menos do que ou igual a 3,0%.

30 277. Composição isolada de acordo com a reivindicação 273, em que a incidência de imunogenicidade é de cerca de 2,8% a cerca de 3,0%.

278. Composição isolada compreendendo moléculas de CTLA4-Ig em que, após administração da composição a seres humanos, a produção

de anticorpos que se ligam à moléculas de CTLA4-Ig ocorre em uma incidência, em seres humanos, de menos do que ou igual a 7,4%.

279. Composição isolada de acordo com a reivindicação 278, em que a incidência é de cerca de 2,1% a cerca de 7,4%.

5 280. Composição isolada de acordo com a reivindicação 278, em que a incidência é menos do que ou igual a 3,7%.

281. Composição isolada de acordo com a reivindicação 278, em que a incidência é menos do que ou igual a 3,0%.

10 282. Composição isolada de acordo com a reivindicação 278, em que a incidência é de cerca de 2,8% a cerca de 3,0%.

15 283. Composição isolada compreendendo moléculas de CTLA4-Ig em que, após administração da composição a seres humanos, a produção de anticorpos que se ligam à porções de CTLA4 das moléculas de CTLA4-Ig ocorre, em seres humanos, em uma incidência de menos do que ou igual a 4,9%.

284. Composição isolada de acordo com a reivindicação 283, em que a incidência é de cerca de 0,5% a cerca de 4,9%.

285. Composição isolada de acordo com a reivindicação 283, em que a incidência é menos do que ou igual a 1,2%.

20 286. Composição isolada de acordo com a reivindicação 283, em que a incidência é menos do que ou igual a 1,0%.

287. Composição isolada de acordo com a reivindicação 283, em que a incidência é de cerca de 0,9% a cerca de 1,0%.

25 288. Composição isolada de acordo com qualquer uma das reivindicações 273 a 287, em que a incidência é medida em um ensaio imunabsorvente enzima-ligado (ELISA).

289. Composição isolada de acordo com qualquer uma das reivindicações 273 a 287, em que a incidência é medida em um ensaio de eletroquimioluminescência (ECL).

30 290. Composição isolada compreendendo moléculas de CTLA4-Ig em que, após administração da composição a seres humanos, a produção de anticorpos que neutralizam as moléculas de CTLA4-Ig ocorre em uma

incidência de menos do que ou igual a 75% dos seres humanos tendo anticorpos que se ligam à porção de CTLA4 da molécula de CTLA4-Ig.

291. Composição isolada de acordo com a reivindicação 290, em que a incidência é 40-75%.

5 292. Composição isolada de acordo com a reivindicação 291, em que a incidência é de menos do que ou igual a 40%.

293. Composição isolada de acordo com qualquer uma das reivindicações 290 a 292, em que a incidência é medida em um ensaio de repórter de luciferase baseado em célula.

10 294. Composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig caracterizada por um teor de glicosilação N-ligada no Domínio I com uma área de pelo menos cerca de 24,5 por cento a uma área de cerca de 35,2 por cento conforme determinado através de HPAEC.

15 295. Composição de acordo com a reivindicação 294, em que o Domínio I compreende três picos, em que o primeiro pico compreende uma área de cerca de 7,3 por cento, o segundo pico compreende uma área de cerca de 10,7 por cento e o terceiro pico compreende uma área de cerca de 8,8 por cento, todos conforme determinado através de HPAEC.

20 296. Composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig caracterizada por um teor de glicosilação N-ligada no Domínio II com uma área de pelo menos cerca de 26,3 por cento a uma área de cerca de 34,1 por cento conforme determinado através de HPAEC.

25 297. Composição compreendendo as moléculas de CTLA4-Ig em que as moléculas de CTLA4-Ig têm uma área percentual menor do que ou igual a 5,0 por cento de espécies de elevado peso molecular, conforme determinado através de cromatografia por exclusão de tamanho e detecção espectrofotométrica.

30 298. Composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig em que as moléculas de CTLA4-Ig têm uma área percentual maior do que ou igual a 95,0 por cento de dímeros de CTLA4-Ig, conforme determinado através de cromatografia por exclusão de tamanho.

299. Composição de acordo com a reivindicação 297 em que as moléculas de CTLA4-Ig têm uma área percentual maior do que ou igual a 95,0 por cento de dímeros de CTLA4-Ig, conforme determinado através de cromatografia por exclusão de tamanho e detecção espectrofotométrico.

5 300. Composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig em que as moléculas de CTLA4-Ig são menos do que 5% de multímeros de CTLA4-Ig maiores do que a forma dimérica.

301. Composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig em que as moléculas de CTLA4-Ig são maiores do que 95% de dímeros de CTLA4-Ig.

302. Composição de acordo com a reivindicação 300 em que as moléculas de CTLA4-Ig são maiores do que 95% de dímeros de CTLA4-Ig.

303. Composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig em que a composição é substancialmente isenta de MCP-1.

15 304. Composição de acordo com as reivindicações 297 ou 303 em que a composição é caracterizada por MCP-1 em menos do que ou igual a 5 ng/mg de moléculas de CTLA4-Ig.

305. Composição de acordo com as reivindicações 297 ou 303 em que a composição é caracterizada por MCP-1 a \leq 5 ng/mg de dímero de CTLA4-Ig.

306. Composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig em que as moléculas de CTLA4-Ig exibem um perfil de carboidrato substancialmente o mesmo conforme a Figura 68.

25 307. Composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig em que as moléculas de CTLA4-Ig exibem um perfil de carboidrato substancialmente o mesmo conforme a Figura 16.

308. Composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig em que as moléculas de CTLA4-Ig têm um perfil de carboidrato representado no cromatograma da Fig. 47.

30 309. Composição composta de moléculas de CTLA4-Ig em que as moléculas de CTLA4-Ig exibem um perfil de carboidratos dos Domínios I-V, em que o Domínio I compreende picos os quais representam oligossaca-

rídeos a-sialilados, o Domínio II compreende picos os quais representam oligossacarídeos mono-sialilados, o Domínio III compreende picos os quais representam oligossacarídeos di-sialilados, o Domínio IV compreende picos os quais representam oligossacarídeos tri-sialilados e o Domínio V compreende picos os quais representam oligossacarídeos tetra-sialilados e em que glicosilação dos domínios III e IV compreende cerca de 25% a cerca de 36% de glicosilação N-ligada, conforme medido através de HPAEC.

310. Composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig em que as moléculas de CTLA4-Ig exibem um perfil de carboidratos dos Domínios I-V, em que o Domínio I compreende picos os quais representam oligossacarídeos a-sialilados, o Domínio II compreende picos os quais representam oligossacarídeos mono-sialilados, o Domínio III compreende picos os quais representam oligossacarídeos di-sialilados, o Domínio IV compreende picos os quais representam oligossacarídeos tri-sialilados e o Domínio V compreende picos os quais representam oligossacarídeos tetra-sialilados e em que glicosilação do Domínio I compreende cerca de 24,5% a cerca de 35,2% de glicosilação N-ligada conforme medido através de HPABC, glicosilação do Domínio II compreende cerca de 26,3% a cerca de 34,1% de glicosilação N-ligada conforme medido através de HPAEC e glicosilação do Domínio III compreende cerca de 21,9% a cerca de 31,5% de glicosilação N-ligada conforme medido através de HPAEC.

311. Composição de acordo com a reivindicação 310 em que glicosilação do Domínio IV e do Domínio V compreende cerca de 7,9% a cerca de 18,6% de glicosilação N-ligada conforme medido através de HPAEC.

312. Composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig em que as moléculas de CTLA4-Ig têm um cromatograma de acordo com a Fig. 13 ou a Fig. 17.

313. Composição de acordo com as reivindicações 300, 303, 305, 312 em que as moléculas de CTLA4-Ig têm uma proporção molar de ácido siálico para proteína de cerca de 9,3 a cerca de 11,0.

314. Composição de acordo com a reivindicação 297 em que a composição é substancialmente isenta de MCP-1.

315. Composição de acordo com a reivindicação 297 em que as moléculas de CTLA4-Ig exibem um perfil de carboidrato substancialmente o mesmo conforme a Figura 16.

5 316. Composição de acordo com a reivindicação 297 em que as moléculas de CTLA4-Ig têm um perfil de carboidrato representado no cromatograma da Fig. 47.

317. Composição de acordo com a reivindicação 297 em que:

10 (a) a molécula de CTLA4-Ig exibe um perfil de carboidrato dos Domínios I-V, em que o Domínio I compreende picos os quais representam oligossacarídeos a-sialilados, o Domínio II compreende picos os quais representam oligossacarídeos mono-sialilados, o Domínio III compreende picos os quais representam oligossacarídeos di-sialilados, o Domínio IV compreende picos os quais representam oligossacarídeos tri-sialilados e o Domínio V compreende picos os quais representam oligossacarídeos tetra-sialilados; e

15 (b) glicosilação dos Domínios III e IV compreende cerca de 25% a cerca de 36% de glicosilação N-ligada conforme medido através de HPAEC.

318. Composição de acordo com a reivindicação 297 em que:

20 (a) a molécula de CTLA4-Ig exibe um perfil de carboidrato dos Domínios I-V, em que o Domínio I compreende picos os quais representam oligossacarídeos a-sialilados, o Domínio II compreende picos os quais representam oligossacarídeos mono-sialilados, o Domínio III compreende picos os quais representam oligossacarídeos di-sialilados, o Domínio IV compreende picos os quais representam oligossacarídeos tri-sialilados e o Domínio V compreende picos os quais representam oligossacarídeos tetra-sialilados; e

25 (b) glicosilação do Domínio I compreende cerca de 24,5% a cerca de 35,2% de glicosilação N-ligada conforme medido através de HPAEC, glicosilação do Domínio II compreende cerca de 26,3% a cerca de 34,1% de glicosilação N-ligada conforme medido através de HPAEC e glicosilação do

Domínio III compreende cerca de 21,9% a cerca de 31,5% de glicosilação N-ligada conforme medido através de HPAEC.

319. Composição de acordo com a reivindicação 297 em que:

5 (a) a composição é caracterizada por MCP-1 em menos de ou igual a 5 ng/mg de moléculas de CTLA4-Ig; e

(b) as moléculas de CTLA4-Ig têm uma proporção molar média de ácido N-acetil neuramínico (NANA) para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 5 a cerca de 18.

320. Composição de acordo com a reivindicação 319 em que:

10 (a) as moléculas de CTLA4-Ig exibem um perfil de carboidrato dos Domínios I-V, em que o Domínio I compreende picos os quais representam oligossacarídeos a-sialilados, o Domínio II compreende picos os quais representam oligossacarídeos mono-sialilados, o Domínio III compreende picos os quais representam oligossacarídeos di-sialilados, o Domínio IV
15 compreende picos os quais representam oligossacarídeos tri-sialilados e o Domínio V compreende picos os quais representam oligossacarídeos tetra-sialilados; e

(b) glicosilação dos Domínios III e IV compreende cerca de 25% a cerca de 36% de glicosilação N-ligada conforme medido através de HPA-
20 EC

321. Composição de acordo com a reivindicação 319 em que:

(a) as moléculas de CTLA4-Ig exibem um perfil de carboidrato dos Domínios I-V, em que o Domínio I compreende picos os quais representam oligossacarídeos a-sialilados, o Domínio II compreende picos os quais representam oligossacarídeos mono-sialilados, o Domínio III compreende picos os quais representam oligossacarídeos di-sialilados, o Domínio IV compreende picos os quais representam oligossacarídeos tri-sialilados e o Domínio V compreende picos os quais representam oligossacarídeos tetra-sialilados;
25 e

30 (b) glicosilação do Domínio I compreende cerca de 24,5% a cerca de 35,2% de glicosilação N-ligada conforme medido através de HPAEC, glicosilação do Domínio II compreende cerca de 26,3% a cerca de 34,1% de

glicosilação N-ligada conforme medido através de HPAEC e glicosilação do Domínio III compreende cerca de 21,9% a cerca de 31,5% de glicosilação N-ligada conforme medido através de HPAEC.

5 322. Composição de acordo com a reivindicação 319 em que as moléculas de CTLA4-Ig exibem um perfil de carboidrato substancialmente o mesmo conforme na Figura 16.

323. Composição de acordo com a reivindicação 319 em que as moléculas de CTLA4-Ig têm um perfil de carboidrato representado no cromatograma da Fig. 47.

10 324. Composição de acordo com a reivindicação 300 em que:

(a) a composição é caracterizada por MCP-1 a \square 5 ng/mg de dímero de CTLA4-Ig; e

(b) as moléculas de CTLA4-Ig têm uma proporção molar média de grupos ácido siálico para dímero de CTLA4-Ig de cerca de 6 a cerca de
15 18.

325. Composição de acordo com a reivindicação 324 em que as moléculas de CTLA4-Ig têm um cromatograma de acordo com a Fig. 13 ou a Fig. 17.

326. Composição de acordo com a reivindicação 297 em que:

20 (a) a composição é caracterizada por MCP-1 a menos do que ou igual a 5 ng/mg de moléculas de CTLA4-Ig;

(b) a composição é caracterizada por proteína CHO em menos do que ou igual a 50 ng/mg de moléculas de CTLA4-Ig;

(c) a composição é caracterizada por DNA em menos do que ou
25 igual a 2,5 pg/ng de moléculas de CTLA4-Ig;

(d) a composição é caracterizada por endotoxinas bacterianas LAL em menos do que ou igual a 0,42 EU/mg de moléculas de CTLA4-Ig;

(e) as moléculas de CTLA4-Ig têm uma proporção molar média de ácido N-glicolil neuramínico (NGNA) para moléculas de CTLA4-Ig de me-
30 nos do que ou igual a 1,5; e

(f) menos do que ou igual a 2,5% das moléculas de CTLA4-Ig são oxidadas e menos do que ou igual a 2,0% das moléculas de CTLA4-Ig são deamidadas.

327. Composição de acordo com a reivindicação 300 em que:

5 (a) a composição é caracterizada por MCP-1 a \square 5 ng/mg de dímero de CTLA4-Ig;

(b) a composição é caracterizada por proteína de célula hospedeira CHO a \square 50 ng/mg de dímero de CTLA4-Ig; e

10 (c) a composição é caracterizada por DNA a \square 2,5 pg/mg de dímero de CTLA4-Ig.

328. Composição compreendendo molécula de CTLA4-Ig em que:

(a) as moléculas de CTLA4-Ig têm uma proporção de ácido siálico de \square 8,0 moles por mol de molécula de CTLA4-Ig;

15 (b) as moléculas de CTLA4-Ig têm \square 4,0% de espécies de elevado peso molecular;

(c) as moléculas de CTLA4-Ig têm \square 95% de dímeros;

(d) as moléculas de CTLA4-Ig têm \square 0,5% de espécies de baixo peso molecular;

20 (e) as moléculas de CTLA4-Ig têm uma proporção molar média de GlcNAc de 15-35 moles por mol de proteína;

(f) as moléculas de CTLA4-Ig têm uma proporção molar média de GalNAc de 1,7-3,6 moles por mol de proteína;

25 (g) as moléculas de CTLA4-Ig têm uma proporção molar média de galactose de 8-17 moles por mol de proteína;

(h) as moléculas de CTLA4-Ig têm uma proporção molar média de manose de 7,7-22 moles por mol de proteína; e

(i) ligação a B7 de 70-130%;

ou um equivalente farmacêutico da mesma.

30 329. Composição compreendendo moléculas de CTLA4^{A29YL104E}.

Ig em que:

(a) as moléculas de CTLA4^{A29YL104E}-Ig têm uma proporção de ácido siálico de \square 5,0 moles por mol total de proteína de CTLA4^{A29YL104E}-Ig;

(b) as moléculas de CTLA4^{A29YL104E}-Ig têm \square 4,0% de espécies de elevado peso molecular;

5 (c) as moléculas de CTLA4^{A29YL104E}-Ig têm \square 95% de dímeros;

(d) as moléculas de CTLA4^{A29YL104E}-Ig têm \square 1% de espécies de baixo peso molecular; e

(e) ligação a B7 de 70-130%;

ou um equivalente farmacêutico da mesma.

10 330. Composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig em que:

(a) as moléculas de CTLA4-Ig têm uma proporção de ácido siálico de 38,0 moles por mol de proteína;

15 (b) as moléculas de CTLA4-Ig têm \square 2,5% de espécies de elevado peso molecular;

(c) as moléculas de CTLA4-Ig têm \square 97% de dímeros;

(d) as moléculas de CTLA4-Ig têm \square 0,5% de espécies de baixo peso molecular;

20 (e) as moléculas de CTLA4-Ig têm uma proporção molar de GlcNAc de 15-35 moles por mol de proteína;

(f) as moléculas de CTLA4-Ig têm uma proporção molar de GalNAc de 1,7-3,6 moles por mol de proteína;

(g) as moléculas de CTLA4-Ig têm uma proporção molar média de galactose de 8-17 moles por mol de proteína;

25 (h) as moléculas de CTLA4-Ig têm uma proporção molar média de fucose de 3,5-8,3 moles por mol de proteína;

(i) as moléculas de CTLA4-Ig têm uma proporção molar média de manose de 7,2-22 moles por mol de proteína; e

(j) ligação a B7 de 70-130%;

30 ou um equivalente farmacêutico da mesma.

331. Composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig em

que:

(a) as moléculas de CTLA4-Ig têm uma proporção molar média de GlcNAc por mol de dímero de CTLA4-Ig de cerca de 15 a cerca de 35;

(b) as moléculas de CTLA4-Ig têm uma proporção molar média de GalNAc por mol de dímero de CTLA4-Ig de cerca de 1,7 a cerca de 3,6;

5 (c) as moléculas de CTLA4-Ig têm uma proporção molar média de galactose por mol de dímero de CTLA4-Ig de cerca de 8 a cerca de 17;

(d) as moléculas de CTLA4-Ig têm uma proporção molar média de fucose por molécula de dímero de CTLA4-Ig de cerca de 3,5 a cerca de 8,3;

10 (e) as moléculas de CTLA4-Ig têm uma proporção molar média de manose por mol de dímero de CTLA4-Ig de cerca de 7,2 a cerca de 22;

(f) as moléculas de CTLA4-Ig têm uma proporção molar média de ácido siálico por molécula de dímero de CTLA4-Ig de cerca de 6 a cerca de 12;

15 (g) as moléculas de CTLA4-Ig têm um pI, conforme determinado a partir de visualização sobre um gel de focalização isoelétrica, em uma faixa de cerca de $2,4 \pm 0,2$ a cerca de $5,0 \pm 0,2$;

(h) a composição é caracterizada por MCP-1 de menos do que ou igual a 5 ppm;

20 (i) as moléculas de CTLA4-Ig têm menos do que 2,5% de tetrâmeros;

(j) as moléculas de CTLA4-Ig têm menos do que 0,5% de monômeros;

25 (k) os polipeptídeos de CTLA4-Ig da população têm um aminoácido pelo menos 95% idêntico a qualquer uma de SEQ ID NOs: 2 e 5-10; e

(l) as moléculas de CTLA4-Ig são capazes de ligação a CD80 e CD86.

332. Composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig em que:

30 (a) as moléculas de CTLA4-Ig têm uma área de menos do que ou igual a 10 por cento de espécies de elevado peso molecular de CTLA4-Ig, conforme determinado através de cromatografia por exclusão de tamanho e detecção espectrofotométrica;

(b) as moléculas de CTLA4-Ig têm uma área de mais de ou igual a 93,0% de dímeros de CTLA4-Ig, conforme determinado através de cromatografia por exclusão de tamanho e detecção espectrofotométrica;

5 (c) as moléculas de CTLA4-Ig têm uma área de menos de ou igual a 2,0 por cento de monômeros de CTLA4-Ig, conforme determinado através de cromatografia por exclusão de tamanho e detecção espectrofotométrica

(d) a composição é caracterizada por uma quantidade de DNA não excedendo a um máximo de 25 picograma/mg de moléculas de CTLA4-Ig;

(e) a composição é caracterizada por uma quantidade de MCP-1 não excedendo a um máximo de 50 ng/ml de moléculas de CTLA4-Ig no total;

15 (f) a composição é caracterizada por uma quantidade de proteína de célula hospedeira não excedendo a um máximo de 200 ng/mg de moléculas de CTLA4-Ig;

(g) a composição é caracterizada por uma quantidade de endotoxina bacteriana não excedendo a um máximo de 0,7 EU/mg de moléculas de CTLA4-Ig;

20 (h) as moléculas de CTLA4-Ig têm uma proporção molar média de ácido N-acetil neuramínico (NANA) para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 5 a cerca de 18;

(i) as moléculas de CTLA4-Ig têm uma proporção molar média de N-acetil galactosamina (GalNAc) para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 0,5 a 7,0;

(j) as moléculas de CTLA4-Ig têm uma proporção molar média de N-acetil glicosamina (GlcNAc) para moléculas de CTLA4-Ig de 14 a 35;

(k) as moléculas de CTLA4-Ig têm uma proporção molar média de galactose para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 10 a cerca de 40;

30 (l) as moléculas de CTLA4-Ig têm uma proporção molar média de fucose para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 0,5 a cerca de 12; e

(m) as moléculas de CTLA4-Ig têm uma proporção molar média de manose para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 5 a cerca de 25.

333. Composição de acordo com a reivindicação 332 em que as moléculas de CTLA4-Ig compreendem qualquer uma ou mais de SEQ ID NOs: 2, 5, 6,
5 7, 8, 9, 10 ou 18 e em que:

(a) as moléculas de CTLA4-Ig têm uma área de menos do que ou igual a cerca de 5,0 por cento de espécies de elevado peso molecular de CTLA4-Ig, conforme determinado através de cromatografia por exclusão de tamanho e detecção espectrofotométrica;

10 (b) as moléculas de CTLA4-Ig têm uma área de mais do que ou igual a 95,0 por cento de dímeros de CTLA4-Ig, conforme determinado através de cromatografia por exclusão de tamanho e detecção espectrofotométrica;

15 (c) as moléculas de CTLA4-Ig têm uma área de menos do que ou igual a 0,5 por cento de espécies de baixo peso molecular, conforme determinado através de cromatografia por exclusão de tamanho e detecção espectrofotométrica;

20 (d) a composição é caracterizada por uma quantidade de DNA não excedendo a um máximo de 2,5 picograma/mg de moléculas de CTLA4-Ig;

(e) a composição é caracterizada por uma quantidade de MCP-1 não excedendo a um máximo de 3,0 ng/ml de moléculas de CTLA4-Ig no total;

25 (f) a composição é caracterizada por uma quantidade de proteína de célula hospedeira não excedendo a um máximo de 25 ng/mg de moléculas de CTLA4-Ig;

(g) a composição é caracterizada por uma quantidade de endotoxina bacteriana não excedendo a um máximo de 0,35 EU/mg de moléculas de CTLA4-Ig;

30 (h) as moléculas de CTLA4-Ig têm uma proporção molar média de ácido N-acetil neuramínico (NANA) para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 8,0 a cerca de 12,0;

(i) as moléculas de CTLA4-Ig têm uma proporção molar média de N-acetil galactosamina (GalNAc) para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 1,7 a cerca de 3,6;

5 (j) as moléculas de CTLA4-Ig têm uma proporção molar média de N-acetil glicosamina (GlcNAc) para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 15 a cerca de 35;

(k) as moléculas de CTLA4-Ig têm uma proporção molar média de galactose para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 8,0 a cerca de 17;

10 (l) as moléculas de CTLA4-Ig têm uma proporção molar média de fucose para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 3,5 a cerca de 8,3;

(m) as moléculas de CTLA4-Ig têm uma proporção molar média de manose para moléculas CTLA4-Ig de cerca de 7,7, a cerca de 22;

15 (n) as moléculas de CTLA4-Ig têm uma proporção molar média de ácido N-glicolil neuramínico (NGNA) para moléculas de CTLA4-Ig de menos do que ou igual a 1,5;

(o) uma área de menos do que ou igual a 3,5 por cento das moléculas de CTLA4-Ig é espécies oxidadas da mesma e uma área de menos do que ou igual a 2,5 por cento das moléculas de CTLA4-Ig é espécies deamidadas da mesma; e

20 (p) as moléculas de CTLA4-Ig exibem um perfil de carboidrato dos Domínios I-V, em que o Domínio I compreende picos os quais representam oligossacarídeos a-sialilados, o Domínio II compreende picos os quais representam oligossacarídeos mono-sialilados, o Domínio III compreende picos os quais representam oligossacarídeos di-sialilados, o Domínio IV
25 compreende picos os quais representam oligossacarídeos tri-sialilados e o Domínio V compreende picos os quais representam oligossacarídeos tetra-sialilados e em que glicosilação do Domínio I compreende cerca de 24,5% a cerca de 35,2% de glicosilação N-ligada, conforme medido através de HPA-
EC, glicosilação do Domínio II compreende cerca de 26,3% a cerca de
30 34,1% de glicosilação N-ligada conforme medido através de HPAEC e glicosilação do Domínio III compreende cerca de 21,9% a cerca de 31,5% de glicosilação N-ligada conforme medido através de HPAEC.

334. Composição de acordo com a reivindicação 332 em que as moléculas de CTLA4-Ig compreendem qualquer uma ou mais de SEQ ID NOs:4, 11, 12, 13, 14, 15, 16 ou 24 e em que:

5 (a) as moléculas de CTLA4-Ig têm uma área de menos do que ou igual a 5,0 por cento de espécies de elevado peso molecular de CTLA4-Ig, conforme determinado através de cromatografia por exclusão de tamanho e detecção espectrofotométrica;

10 (b) as moléculas de CTLA4-Ig têm uma área maior do que ou igual a 95,0 por cento de dímeros de CTLA4-Ig, conforme determinado através de cromatografia por exclusão de tamanho e detecção espectrofotométrica;

15 (c) as moléculas de CTLA4-Ig têm uma área de menos do que ou igual a 1,0 por cento de espécies de baixo peso molecular de CTLA4-Ig, conforme determinado através de cromatografia por exclusão de tamanho e detecção espectrofotométrica;

(d) a composição é caracterizada por uma quantidade de DNA não excedendo a um máximo de 2,5 picogramas/mg de moléculas de CTLA4-Ig;

20 (e) a composição é caracterizada por uma quantidade de MCP-1 não excedendo a um máximo de 5,0 ng/mg de moléculas de CTLA4-Ig no total;

(f) a composição é caracterizada por uma quantidade de proteína de célula hospedeira não excedendo a um máximo de 50 ng/mg de moléculas de CTLA4-Ig;

25 (g) a composição é caracterizada por uma quantidade de endotoxina bacteriana não excedendo a um máximo de 0,42 EU/mg de moléculas de CTLA4-Ig;

30 (h) as moléculas de CTLA4-Ig têm uma proporção molar média de ácido N-acetil neuramínico (NANA) para moléculas de CTLA4-Ig de mais do que ou igual a 5,0;

(i) as moléculas de CTLA4-Ig têm uma proporção molar média de N-acetil galactosamina (GalNAc) para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 0,8 a cerca de 4;0;

5 (j) as moléculas de CTLA4-Ig têm uma proporção molar média de N-acetil glicosamina (GlcNAc) para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 14 a cerca de 35;

(k) as moléculas de CTLA4-Ig têm uma proporção molar média de galactose para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 8,0 a cerca de 14;

10 (l) as moléculas de CTLA4-Ig têm uma proporção molar média de fucose para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 1,7 a cerca de 9,3; e

(m) as moléculas de CTLA4-Ig têm uma proporção molar média de manose para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 9 a cerca de 18.

335. Composição de acordo com a reivindicação 303 em que:

15 (a) as moléculas de CTLA4-Ig têm menos de 6% de multímeros de CTLA4-Ig maiores do que a forma dimérica;

(b) as moléculas de CTLA4-Ig têm mais de 90% de dímeros de CTLA4-Ig;

(c) as moléculas de CTLA4-Ig têm menos de 1% de monômeros de CTLA4-Ig;

20 (d) a composição é caracterizada por DNA a 2,5 pg/mg de dímero de CTLA4-Ig;

(e) a composição é caracterizada por proteína de célula hospedeira CHO a \square 50 ng/mg de dímero de CTLA4-Ig;

25 (f) as moléculas são caracterizadas por uma proporção molar média de galactose por mol de dímero de CTLA4-Ig de cerca de 8 a cerca de 17; e

(g) as moléculas de CTLA4-Ig são caracterizadas por uma proporção molar média de manose por mol de dímero de CTLA4-Ig de cerca de 7,2 a cerca de 22.

30

336. Composição de acordo com a reivindicação 335 em que:

(a) as moléculas de CTLA4-Ig são caracterizadas por uma proporção molar média de N-acetil glicosamina (GlcNAc) por mol de dímero de CTLA4-Ig de cerca de 15 a cerca de 35;

5 (b) as moléculas de CTLA4-Ig são caracterizadas por uma proporção molar média de N-acetil galactosamina (GalNAc) por mol de dímero de CTLA4-Ig de cerca de 1,7 a cerca de 3,6;

(c) as moléculas de CTLA4-Ig são caracterizadas por uma proporção molar média de fucose por mol de dímero de CTLA4-Ig de cerca de 3,5 a cerca de 8,3; e

10 (d) as moléculas de CTLA4-Ig têm uma proporção molar média de grupos ácido siálico para dímero de CTLA4-Ig de cerca de 6 a cerca de 18.

337. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 335 ou 336 em que:

15 (a) as moléculas de CTLA4-Ig têm menos de 5% de multímeros de CTLA4-Ig maiores do que a forma dimérica;

(b) as moléculas de CTLA4-Ig têm mais de 95% de dímeros de CTLA4-Ig;

20 (c) as moléculas de CTLA4-Ig têm menos de 0,5% de monômeros de CTLA4-Ig; e

(d) a composição é caracterizada por MCP-1 a \leq 5 ng/mg de dímero de CTLA4-Ig.

338. Composição isolada composta de moléculas de CTLA4-Ig em que, após administração da composição a seres humanos, a produção
25 de anticorpos que se ligam à moléculas de CTLA4-Ig ocorre em uma incidência, em seres humanos, de menos do que ou igual a 7,4% e produção de anticorpos que se ligam às porções de CTLA4 das moléculas de CTLA4-Ig ocorre, em seres humanos, em uma incidência de menos do que ou igual a 4,9% e em que as incidências são medidas em um ensaio imunoenzimático (ELISA) ou um ensaio eletroquimioluminescente (ECL).
30

339. Composição de acordo com a reivindicação 338 em que, após administração da composição a seres humanos, a produção de anti-

corpos que neutralizam as moléculas de CTLA4-Ig ocorre em uma incidência de menos do que ou igual a 75% dos seres humanos tendo anticorpos que se ligam à porção de CTLA4 da molécula de CTLA4-Ig, conforme medido em um ensaio de repórter de luciferase célula-baseado.

5 340. Método para fornecer uma proporção de forma de cadeia simples:dímero de uma proteína, tal proteína capaz de existir na forma dimérica bem como em cadeia simples, compreendendo as etapas de: (1) fornecimento e/ou manutenção (tal como durante a etapa (2)) de um meio de cultura líquido à cultura de células expressando a referida proteína, na qual
10 concentração de cisteína é selecionada para proporcionar a referida proporção e (2) cultura das referidas células para expressar a referida proteína; em que adição e/ou aumento na concentração de cisteína no referido meio de cultura líquida proporciona uma maior proporção de forma com cadeia simples de tal proteína e remoção, diminuição ou eliminação da concentração
15 de cisteína no referido meio de cultura líquido diminui a proporção de forma com cadeia simples da referida proteína.

 341. Método para reduzir a proporção de forma de agregado:dímero de uma proteína, tal proteína capaz de existir na forma de agregado bem como dimérica, durante purificação de tal proteína, compreendendo o uso de um ou mais líquidos os quais são soluções salinas de não-
20 agregado.

 342. Método para diminuição da proporção de forma de dímero:cadeia simples de uma proteína, tal proteína capaz de existir na forma de dímero, bem como na forma de cadeia simples compreendendo as etapas
25 de (1) fornecimento e/ou manutenção (tal como durante a etapa (2)) um meio de cultura de célula líquido para a cultura de células expressando a referida proteínas, tal meio contendo iodoacetamida e (2) cultura das referidas células para expressar a referida proteína.

 343. Método para diminuição da proporção de forma de agregado:dímero de uma proteína, tal proteína capaz de existir na forma de agregado, bem como na forma de dímero compreendendo as etapas de (1) fornecimento e/ou manutenção (tal como durante a etapa (2)) um meio de cul-
30

tura de célula líquido para a cultura de células expressando a referida proteínas, tal meio contendo iodoacetamida e (2) cultura das referidas células para expressar a referida proteína.

5 344. Método para desagregação de moléculas recombinantes baseadas em IgG-Fc compreendendo a etapa de contato de uma composição compreendendo tais moléculas na forma agregada com um agente caotrópico em uma quantidade e durante um tempo suficiente para desagregar pelo menos uma porção de tais moléculas agregadas.

10 345. Método de acordo com a reivindicação 344 em que o referido contato ocorre em uma coluna de cromatografia.

346. Composição isolada compreendendo moléculas de CTLA4-Ig em que, quando administrada a um indivíduo em uma dose intravenosa de cerca de 10 mg/kg, as moléculas de CTLA4-Ig são capazes de exibir:

- 15 (a) uma área sob a curva (AUC) de cerca de 44400 $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{ml}$;
(b) um volume de distribuição de cerca de 0,09 L/kg;
(c) uma concentração de pico (Cmax) de cerca de 292 $\mu\text{g}/\text{ml}$; e
(d) uma taxa de *clearance* de cerca de 0,23 ml/b/kg.

20 347. Composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig em que as moléculas de CTLA4-Ig têm uma proporção molar média de ácido N-acetil neuramínico (NANA) para moléculas de CTLA4-Ig de cerca de 13 a cerca de 18.

348. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 297-318, 319-331, 332-337, 346, 347 em que a composição é substancialmente purificada.

25 349. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 297-318, 319-331, 332-337, 346, 347 em que a composição é uma composição farmacêutica.

30 350. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 297-318, 319-328, 330, 331, 332, 335-337, 346, 347 em que as moléculas de CTLA4-Ig compreendem um ou mais polipeptídeos tendo SEQ ID NOs: 2, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10.

351. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 297-318, 319-328, 330, 331, 332, 335-337, 346, 347 em que as moléculas de CTLA4-Ig compreendem um ou mais polipeptídeos tendo SEQ ID NO: 18.

5 352. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 297-318, 331, 332, 335-337, 346, 347 em que as moléculas de CTLA4-Ig compreendem um ou mais polipeptídeos tendo SEQ ID NOs: 4, 11, 12, 13, 14, 15 ou 16.

10 353. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 297-318, 331, 332, 335-337, 346, 347 em que as moléculas de CTLA4-Ig compreendem um ou mais polipeptídeos tendo SEQ ID NO: 24.

15 354. Uso de uma composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 349 a 353 na fabricação de um produto farmacêutico para tratamento ou prevenção de doença enxerto versus hospedeiro (GVED), tratamento ou prevenção de rejeição a uma célula transplantada, tratamento de psoríase, tratamento de lupus, tratamento de doença reumática, tratamento de artrite reumatóide ou tratamento de esclerose múltipla.

20 355. Uso de uma composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 349 a 353 na fabricação de um produto farmacêutico para tratamento ou prevenção de doença enxerto versus hospedeiro (GVED), tratamento ou prevenção de rejeição de um órgão transplantado, tratamento de um distúrbio imune associado à rejeição a transplante de enxerto, tratamento de psoríase, tratamento de lupus, tratamento de doença reumática, tratamento de artrite reumatóide ou tratamento de esclerose múltipla.

25 356. Método para obtenção de uma composição compreendendo uma população isolada de moléculas de CTLA4-Ig de um meio de cultura líquido, o meio compreendendo uma população inicial de moléculas de CTLA4-Ig em que (1) moléculas de CTLA4-Ig da população inicial têm um ou mais resíduos de ácido siálico, (2) o número de resíduos de ácido siálico por
30 molécula de CTLA4-Ig varia dentro da população inicial, (3) a população inicial compreende dímero de CTLA4-Ig e agregados de elevado peso molecular e (4) o meio de cultura líquido contém MCP-1, o método compreendendo:

(a) coleta do meio de cultura líquido de uma cultura de células de mamífero expressando moléculas de CTLA4-Ig;

(b) separação das moléculas de CTLA4-Ig de componentes celulares;

5 (c) separação das moléculas de CTLA4-Ig da MCP-1;

(d) separação de dímeros de CTLA4-Ig de agregados de elevado peso molecular de CTLA4-Ig; e

(e) separação das moléculas de CTLA4-Ig em duas ou mais frações, em que pelo menos uma fração tem uma maior proporção molar de ácido siálico para moléculas de CTLA4-Ig comparado com pelo menos uma fração;

em que as etapas (b), (c), (d) e (e) são realizadas simultaneamente ou em qualquer ordem, de modo a obter a referida composição.

357. Método de acordo com a reivindicação 356 em que: (a) as moléculas de CTLA4-Ig da composição são caracterizadas por uma proporção molar média de NANA para moléculas de CTLA4-Ig de mais do que ou igual a 8,0 e uma área de espécies de elevado peso molecular de CTLA4-Ig de menos do que ou igual a 2,5 por cento, conforme determinado através de cromatografia por exclusão de tamanho e detecção espectrofotométrica; e

20 (b) a composição compreende uma quantidade de MCP-1 de menos do que ou igual a 3 ng/mg de moléculas de CTLA4-Ig.

358. Método de acordo com a reivindicação 356 em que (a) as moléculas de CTLA4-Ig da composição são caracterizadas por uma proporção molar média de NANA para moléculas de CTLA4-Ig de mais do que ou igual a 5,0 e uma área de espécies de elevado peso molecular de CTLA4-Ig de menos do que ou igual a 4,0 por cento, conforme determinado através de cromatografia por exclusão de tamanho e detecção espectrofotométrica; e

25 (b) a composição compreende não mais do que 5 ppm de MCP-1.

359. Método para isolamento de uma composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig, o método compreendendo:

30

(i) obtenção de uma fração solúvel de uma cultura líquida compreendendo células de mamífero que produzem moléculas de CTLA4-Ig;

(ii) sujeição da fração solúvel à cromatografia de troca de ânions para obter um produto de proteína eluído;

(iii) sujeição do produto de proteína da etapa (ii) à cromatografia de interação hidrofóbica de modo a obter um produto de proteína enriquecido;

(iv) sujeição do produto de proteína de (iii) à cromatografia por afinidade para obter um produto de proteína eluído e enriquecido; e

(v) sujeição do produto de proteína de (iv) à cromatografia de troca de ânions de modo a isolar uma composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig.

360. Método para isolamento de uma composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig, o método compreendendo:

(i) obtenção de um sobrenadante de cultura de célula de uma cultura líquida compreendendo células de mamífero que produzem moléculas de CTLA4-Ig;

(ii) sujeição do sobrenadante à cromatografia de troca de ânions para obter um produto de proteína eluído;

(iii) sujeição do produto de proteína da etapa (ii) à cromatografia de interação hidrofóbica de modo a obter um produto de proteína enriquecido;

(iv) sujeição do produto de proteína de (iii) à cromatografia por afinidade para obter um produto de proteína eluído e enriquecido; e

(v) sujeição do produto de proteína de (iv) à cromatografia de troca de ânions de modo a isolar uma composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig;

em que as moléculas de CTLA4-Ig da composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig têm uma proporção de ácido siálico de $\geq 8,0$ moles por mol de proteína;

em que as moléculas de CTLA4-Ig da composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig têm menos de 3% de multímeros de CTLA4-Ig maiores do que a forma dimérica; e

em que a composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig é caracterizada por MCP-1 \leq 5 ng/mg de dímero de CTLA4-Ig.

361. Método de acordo com a reivindicação 359 em que (a) a composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig obtida na etapa (ii) é caracterizada por uma área de menos do que ou igual a 25,7 por cento de espécies de elevado peso molecular de CTLA4-Ig, conforme determinado através de cromatografia por exclusão de tamanho e detecção espectrofotométrica, (b) a composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig obtida na etapa (iii) é caracterizada por uma área de menos do que ou igual a 2,5 por cento de espécies de elevado peso molecular de CTLA4-Ig, conforme determinado através de cromatografia por exclusão de tamanho e detecção espectrofotométrica, (c) a composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig obtida na etapa (iv) é caracterizada por uma área de menos de ou igual a 2,5 por cento de espécies de elevado peso molecular, conforme determinado através de cromatografia por exclusão de tamanho e detecção espectrofotométrica e (d) a composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig obtida na etapa (v) é caracterizada por uma área de menos do que ou igual a 2,0 por cento de espécies de elevado peso molecular, conforme determinado através de cromatografia por exclusão de tamanho e detecção espectrofotométrica.

362. Método de acordo com a reivindicação 359 em que (a) a composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig obtida na etapa (iii) é caracterizada por menos do que 5600 ng/ml de MCP-1, (b) a composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig obtida na etapa (iv) é caracterizada por menos do que 38 ng/ml de MCP-1 e (c) a composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig obtida na etapa (v) é caracterizada por menos do que 9,5 ng/mg de MCP-1.

363. Método de acordo com a reivindicação 63 em que: (a) a cromatografia de troca de ânions da etapa (ii) é realizada usando uma coluna tendo uma resina de troca de ânions compreendendo um grupo funcional amina primária, secundária, terciária ou quaternária; um tampão de lavagem compreendendo HEPES a cerca de 75 mM e NaCl a cerca de 360 mM e

tendo um pH de cerca de 8,0; e um tampão de eluição compreendendo HEPES a cerca de 25 mM e NaCl a cerca de 850 mM e tendo um pH de cerca de 7,0; (b) a cromatografia de interação hidrofóbica da etapa (iii) é realizada usando: uma resina de interação hidrofóbica compreendendo um grupo funcional fenila, um octila, um propila, um alcóxi, um butila ou um isoamila; e um único tampão de lavagem compreendendo HEPES a cerca de 25 mM e NaCl a cerca de 850 mM e tendo um pH de cerca de 7,0; (c) a cromatografia por afinidade da etapa (iv) é realizada usando: uma resina de cromatografia por afinidade compreendendo proteína A; um tampão de lavagem compreendendo Tris a cerca de 25 mM e NaCl a cerca de 250 mM e tendo um pH de cerca de 8,0; e um tampão de eluição compreendendo glicina a cerca de 100 mM e tendo um pH de cerca de 3,5; e (d) a cromatografia de troca de ânions da etapa (v) é realizada usando: um tampão de lavagem compreendendo HEPES a cerca de 25 mM e NaCl de cerca de 120 mM a cerca de 130 mM e tendo um pH de cerca de 8,0; e um tampão de eluição compreendendo HEPES a cerca de 25 mM e NaCl a cerca de 200 mM e tendo um pH de cerca de 8,0.

364. Método para isolamento de uma composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig, o método compreendendo:

(i) obtenção de uma fração solúvel de uma cultura líquida compreendendo células de mamífero que produzem moléculas de CTLA4-Ig e, em qualquer ordem:

(ii) sujeição da fração solúvel à cromatografia por afinidade de modo a obter uma composição eluída compreendendo moléculas de CTLA4-Ig;

(iii) sujeição da fração solúvel à cromatografia de troca de ânions de modo a obter uma composição eluída e enriquecida compreendendo moléculas de CTLA4-Ig;

em que a etapa de cromatografia por afinidade é realizada primeiro.

365. Método de acordo com a reivindicação 364 em que a cromatografia por afinidade da etapa (ii) é realizada usando um tampão de eluição compreendendo guanidina ou uréia.

5 366. Método de acordo com a reivindicação 364 compreendendo:

(i) obtenção de uma fração solúvel de uma cultura líquida compreendendo células de mamífero que produzem moléculas de CTLA4-Ig;

(ii) sujeição da fração solúvel à cromatografia por afinidade para obter um produto de proteína eluído;

10 (iii) sujeição do produto de proteína da etapa (ii) à cromatografia de troca de ânions de modo a obter um produto de proteína enriquecido e eluído; e

(iv) sujeição do produto de proteína da etapa (iii) à cromatografia de interação hidrofóbica para obter uma composição mais enriquecida compreendendo moléculas de CTLA4-Ig.

15 367. Método de acordo com a reivindicação 366 em que a composição obtida na etapa (iv) é caracterizada por uma área de espécies de elevado peso molecular de menos de cerca de 2,5%, conforme determinado através de cromatografia por exclusão de tamanho e detecção espectrofotométrica e o percentual de proteína celular é menos do que cerca de 95
20 ng/ml e o percentual MCP-1 é menos do que cerca de 5 ppm.

368. Método de acordo com a reivindicação 366 em que: (a) a cromatografia por afinidade da etapa (ii) é realizada usando uma resina compreendendo proteína A; um tampão de lavagem compreendendo
25 NaH_2PO_4 a cerca de 25 mM e NaCl a cerca de 150 mM e tendo um pH de cerca de 7,5; e um tampão de eluição compreendendo glicina a cerca de 250 mM e tendo um pH de cerca de 3; (b) a cromatografia de troca de ânions da etapa (iii) é realizada usando uma coluna tendo uma resina de troca ânions compreendendo um grupo funcional amina primária, secundária, terciária ou
30 quaternária; um tampão de lavagem compreendendo HEPES a cerca de 50 mM e NaCl a cerca de 135 mM e tendo um pH de cerca de 7; e um tampão de eluição compreendendo HEPES a cerca de 50 mM e NaCl a cerca de 200

mM e tendo um pH de cerca de 7; (c) a cromatografia de interação hidrofóbica da etapa (iv) é realizada usando: uma resina de interação hidrofóbica compreendendo um grupo funcional fenila, um octila, um propila, um alcóxi, um butila ou um isoamila; e um único tampão de lavagem compreendendo
5 HEPES a cerca de 50 mM e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a cerca 1,2M e tendo um pH de cerca de 7.

369. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 365-368 em que as moléculas de CTLA4-Ig compreende um ou mais polipeptídeos tendo SEQ ID NOs: 2, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10.

10 370. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 365-368 em que as moléculas de CTLA4-Ig compreendem um ou mais polipeptídeos tendo SEQ ID NO: 18.

15 371. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 365-368 em que as moléculas de CTLA4-Ig compreendem um ou mais polipeptídeos tendo SEQ ID NOs: 4, 11, 12, 13, 14, 15 ou 16.

372. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 365-368 em que as moléculas de CTLA4-Ig compreendem um ou mais polipeptídeos tendo SEQ ID NO: 24.

20 373. Composição compreendendo moléculas de CTLA4-Ig obtidas através do método de acordo com qualquer uma das reivindicações 36