

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

(21) **PI0710482-0 A2**

(22) Data de Depósito: 20/04/2007
(43) Data da Publicação: 16/08/2011
(RPI 2119)



(51) *Int.Cl.:*
C07K 16/18 2006.01

(54) Título: **MÉTODOS PARA SELEÇÃO DE ALTO RENDIMENTO DE LINHAGENS CELULARES**

(30) Prioridade Unionista: 21/04/2006 US 60/793,991

(73) Titular(es): Wyeth

(72) Inventor(es): Judy H. Chou, Nadine Barron, Peter Franchi, Sarah Koob

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

(86) Pedido Internacional: PCT US2007009815 de 20/04/2007

(87) Publicação Internacional: WO 2007/124143de 01/11/2007

(57) Resumo: MÉTODOS PARA SELEÇÃO DE ALTO RENDIMENTO DE LINHAGENS CELULARES. Trata-se de métodos de seleção de alto rendimento de linhagens celulares para uso em expressão protéica em alguns processos farmacêuticos, de desenvolvimento de fármaco, e biotecnológicos de modo que as linhagens celulares de alta produtividade sejam identificadas em termos de sua capacidade de produzir tanto níveis desejados de expressão protéica como qualidade apropriada de uma proteína de interesse.



PI0710482-0

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "MÉTODOS
PARA SELEÇÃO DE ALTO RENDIMENTO DE LINHAGENS CELULA-
RES".

Este pedido reivindica o benefício de prioridade de Pedido Provi-
sório No. U.S. 60/793.991, depositado em 21 de abril de 2006, cujo relatório
5 descritivo está incorporado a título de referência em sua totalidade.

Campo da Invenção

A presente invenção refere-se geralmente à área farmacêutica.
Mais especificamente, a invenção pertence a métodos para seleção de li-
nhagens celulares em termos de capacidade de produzir quantidades sufici-
10 entes e qualidade comparável de proteína para produção em escala indus-
trial.

Antecedentes da Invenção

A tecnologia de alto rendimento se tornou uma ferramenta im-
portante em pesquisa farmacêutica e biotecnológica. As metodologias analí-
15 ticas de alto rendimento utilizam procedimentos automatizados para analisar
rapidamente a atividade de proteínas, o nível de expressão de proteína, ex-
pressão genética, e a quantidade indeterminada de interações químicas que
ocorrem em um sistema biológico. Os dados gerados por essas metodologi-
as e tecnologias foram propostos para uso em uma ampla gama de campos,
20 tais como, pesquisa de câncer, descoberta de fármaco, e cristalografia (veja,
por exemplo, Abramovitz *et al.* (2006) *Proteome Sci.* 4(1): 5 [Epub ahead of
print]).

As análises de alto rendimento dependem da capacidade de
25 perceber uma interação química ou composto particular a partir de uma am-
pla variedade de reações químicas que ocorrem em um sistema. As tecno-
logias de alto rendimento foram usadas para sondar as interações químicas
específicas e níveis de expressão de milhares de genes em um curto perío-
do de tempo. Para realizar essa difícil tarefa, certas técnicas foram desen-
30 volvidas para utilizar sinais moleculares (por exemplo, fluoróforos) e análises
automatizadas para processar informações em uma taxa bastante rápida
(veja, por exemplo., Pinhasov *et al.* (2004) *Comb. Chem. High Throughput*

Screen. 7(2):133-40). Por exemplo, a tecnologia microarranjo vem sendo amplamente utilizada para sondar as interações de milhares de genes ao mesmo tempo, enquanto proporciona informações valiosas de genes específicos (veja, por exemplo, Mocellin and Rossi (2007) *Adv. Exp. Med. Biol.* 593:19-30).

Nos últimos anos, a purificação e expressão protéica de alto rendimento tanto automática como manual se tornou um meio acessível para selecionar e produzir rapidamente proteínas solúveis para estudos estruturais e funcionais (veja Cabrita *et al.* (2006) *BMC Biotechnol.* 6: 12). Os desenvolvimentos, tais como, ensaios baseados em placa de filtro para clonagem, expressão e purificação, clonagem independente de ligação (LIC), e auto-indução para expressão protéica foram combinados com sistemas automáticos para criar técnicas de produção paralela de proteínas que são simples e econômicas (veja, Cabrita *et al.* (2006) *BMC Biotechnol.* 6: 12; Aslanidis *et al.* (1990) *Nucleic Acids Res.* 18(20): 6069–6074). Essas abordagens forneceram aos pesquisadores ferramentas poderosas para produzir proteínas em níveis de escala industrial para uso em farmacêutica e desenvolvimento de fármacos.

Entretanto, a purificação e expressão de proteínas de células particulares apresentam dificuldades particulares. Uma vez que uma proteína de interesse foi identificada, é mais difícil se obter quantidades significativas daquela proteína em uma forma purificada. Como resultado, as linhagens celulares que produzem proteínas recombinantes são usadas para produzir proteínas em quantidades suficientes para desenvolvimento industrial.

Embora as linhagens celulares possam fornecer aos pesquisadores a oportunidade de produzir grandes quantidades de uma proteína particular, essas nem sempre são eficazes produtoras de proteínas. Certos clones de linhagem celular podem produzir níveis subótimos de proteína. Outros clones de linhagem celular podem produzir níveis ótimos de expressão protéica, porém deixaram de produzir um grupo (pool) completamente funcional de proteínas devido à modificação pós-traducional tanto com má for-

mação estrutural como inapropriada. Tais questões podem resultar em perda de tempo e recursos durante o desenvolvimento de um composto biologicamente relevante. Portanto, são necessárias metodologias de seleção de alto rendimento que fornecem informações de maneira rápida e confiável sobre a qualidade e quantidade de uma proteína expressa em uma linhagem celular particular. A presente invenção se refere a essas e outras finalidades importantes.

Sumário da Invenção

Ao analisar os níveis de expressão de uma proteína de interesse em uma linhagem celular antes de iniciar a produção em escala completa da proteína de interesse, não serão desperdiçados tempo e recursos significativos sobre linhagens celulares que possuem qualidade insuficiente para expressão de proteína de alto rendimento. A presente invenção se baseia, em parte, na descoberta que procedimentos de seleção de alto rendimento e procedimentos de purificação de alto rendimento podem ser realizados para determinar as linhagens celulares que produzem quantidades suficientes de uma proteína de interesse. Ademais, esses procedimentos podem ser utilizados para selecionar as linhagens celulares candidatas para determinar se essas produzem a proteína de interesse com uma qualidade desejada, por exemplo, atividade biológica. Essas técnicas de seleção de alto rendimento e purificação de alto rendimento (mais adiante neste documento referida juntamente como "seleção de alto rendimento") são, portanto, métodos valiosos para determinar as linhagens celulares adequadas de se utilizar em expressão protéica em escala industrial. Essa descoberta foi utilizada para proporcionar uma invenção que permita o uso de métodos de seleção de alto rendimento para identificar linhagens celulares que são úteis para produção em escala industrial de uma proteína de interesse.

Em um aspecto, a invenção proporciona um método de seleção de alto rendimento de linhagens celulares para expressão protéica. O método inclui a seleção de título de alto rendimento de linhagens celulares para determinar o nível de expressão protéica em cada linhagem celular. As linhagens celulares que produzem um nível desejado de expressão protéica

são selecionadas para purificação de alto rendimento subsequente da proteína. A linhagem celular é selecionada para expressão protéica se a linhagem celular produzir um nível desejado de expressão protéica e possuir uma qualidade apropriada.

5 Em algumas modalidades, a proteína é um anticorpo, ligante, receptor, subunidade de proteína, fragmento de proteína, proteína de fusão, proteína recombinante, e fragmento dessas. Em certas modalidades, a proteína é um anticorpo, um anticorpo recombinante, ou um fragmento $F(ab')_2$.

10 Em outras modalidades, o primeiro agente de ligação é selecionado do grupo que consiste em anticorpos, ligantes, receptores, proteínas de fusão, subunidades de proteínas, proteínas recombinantes, e fragmentos desses. Em modalidades particulares, o primeiro agente de ligação é a Proteína A ou estreptavidina. Ainda em outras modalidades, os agentes de ligação podem ser ligados a um suporte sólido, tais como, microesferas, placas, e chips de microarranjo. Em muitas modalidades, o suporte sólido compreende celulose, sefarose, poliacrilamida, vidro ou poliestireno.

15 Em outras modalidades, o segundo agente de ligação é selecionado do grupo que consiste em anticorpos, ligantes, receptores, proteínas de fusão, subunidades de proteínas, proteínas recombinantes, e fragmentos dessas. Em modalidades particulares, o segundo agente de ligação é um anticorpo e fragmentos desse. Em modalidades mais particulares, o anticorpo é um fragmento $F(ab')_2$, e ainda mais particularmente é um fragmento $F(ab')_2$ que se liga especificamente à parte F_c de um anticorpo.

20 Ainda em outras modalidades, o marcador detectável é um fluoróforo, corante químico, agente de ligação radioativo, agente de ligação quimiluminescente, agente eletroquimiluminescente, agente de ligação magnética, agente de ligação paramagnética, agente de ligação promagnética, enzima que produz um produto colorido, enzima que produz um produto quimiluminescente, e enzima que produz um produto magnético. Em modalidades muito particulares, o marcador detectável é rutênio ou múltiplos marcadores à base de rutênio.

30 Em algumas modalidades, o reagente compreende uma resina,

que, em modalidades particulares, possui um terceiro agente de ligação ligado a esse. Em certas modalidades, o terceiro agente de ligação é selecionado do grupo que consiste em anticorpos, ligantes, receptores, proteínas de fusão, subunidades de proteínas, proteínas recombinantes, e fragmentos desses. Enquanto que em modalidades particulares, o terceiro agente de ligação é Proteína A ou estreptavidina. Em algumas modalidades, a proteína é eluída do reagente utilizando vácuo. Em outras modalidades, a proteína é eluída por centrifugação. Ainda em outras modalidades, a proteína é eluída por fluxo de gravidade através da resina. Em muitas modalidades, a seleção das linhagens celulares incubadas utiliza uma estação de trabalho automática.

Em outro aspecto, a invenção proporciona um método de seleção de alto rendimento de linhagens celulares para expressão protéica. O método inclui uma etapa para incubar linhagens celulares em meio, e colocar um suporte sólido em contato com uma amostra de cada linhagem celular incubada. Nesse aspecto, o suporte sólido liga à sua superfície um primeiro agente de ligação que se liga a uma proteína em cada amostra. A proteína que é ligada pelo primeiro agente de ligação entra em contato com um segundo agente de ligação, que é ligado de maneira operável a um marcador detectável, que se liga à proteína. O nível de expressão protéica em cada amostra é determinado ao detectar o marcador ligado de maneira operável ao segundo agente de ligação ligado à proteína. O método também inclui a seleção das linhagens celulares que possuem um nível desejado de expressão protéica. Em alguns casos, isso será determinado ao comparar o nível de expressão protéica em cada linhagem celular com o nível médio de expressão protéica em todas as linhagens celulares. Por exemplo, um nível aumentado de expressão protéica comparado com o nível médio de expressão protéica em todas as linhagens celulares poderia ser o nível desejado de expressão protéica. Alternativamente, um nível reduzido de expressão protéica poderia ser o nível desejado de expressão protéica, que também poderia ser determinado ao comparar o nível de expressão protéica em cada linhagem celular selecionada com o nível médio de expressão protéica em

todas as linhagens celulares.

O método desse aspecto da invenção exige adicionalmente isolar os sobrenadantes das linhagens celulares selecionadas, e distribuir cada sobrenadante a um poço de uma placa com múltiplos poços. Os sobrenadantes entram então em contato com um reagente que se liga à proteína. A proteína é eluída do reagente e analisada para qualidade apropriada. De acordo com esse aspecto da invenção, uma linhagem celular é selecionada para expressão protéica se a linhagem celular for selecionada na etapa e) e a proteína expressa pela linhagem celular possuir qualidade apropriada. Em algumas modalidades, a proteína é um anticorpo, ligante, receptor, subunidade de proteína, fragmento de proteína, proteína de fusão, proteína recombinante, e fragmento desses. Em certas modalidades, a proteína é um anticorpo, um anticorpo recombinante, ou um fragmento $F(ab')_2$.

Em outras modalidades, o primeiro agente de ligação é selecionado do grupo que consiste em anticorpos, ligantes, receptores, proteínas de fusão, subunidades de proteínas, proteínas recombinantes, e fragmentos desses. Em modalidades particulares, o primeiro agente de ligação é Proteína A ou estreptavidina. Ainda em outras modalidades, os agentes de ligação podem ser ligados a um suporte sólido, tais como, microesferas, placas, e chips de microarranjo. Em muitas modalidades, o suporte sólido compreende celulose, sefarose, poliacrilamida, vidro ou poliestireno.

Em outras modalidades, o segundo agente de ligação é selecionado do grupo que consiste em anticorpos, ligantes, receptores, proteínas de fusão, subunidades de proteínas, proteínas recombinantes, e fragmentos desses. Em modalidades particulares, o segundo agente de ligação é um anticorpo e fragmentos desse. Em modalidades mais particulares, o anticorpo é um fragmento $F(ab')_2$, e ainda mais particularmente é um fragmento $F(ab')_2$ que se liga especificamente à parte F_c de um anticorpo.

Ainda em outras modalidades, o marcador detectável é um fluoróforo, corante químico, agente de ligação radioativo, agente de ligação quimiluminescente, agente eletroquimiluminescente, agente de ligação magnética, agente de ligação paramagnética, agente de ligação promagnética, en-

zima que produz um produto colorido, enzima que produz um produto quimi-luminescente, e enzima que produz um produto magnético. Em modalidades muito particulares, o marcador detectável é rutênio ou múltiplos marcadores à base de rutênio.

5 Em algumas modalidades, o reagente compreende uma resina, que, em modalidades particulares, possui um terceiro agente de ligação li-gado a esse. Em certas modalidades, o terceiro agente de ligação é selecio-nado do grupo que consiste em anticorpos, ligantes, receptores, proteínas
10 desses. Enquanto que em modalidades particulares, o terceiro agente de ligação é Proteína A ou estreptavidina. Em algumas modalidades, a proteína é eluída do reagente utilizando vácuo. Em outras modalidades, a seleção das linhagens celulares incubadas utiliza uma estação de trabalho automá-tica.

15 Em outro aspecto, a invenção proporciona um método de de-senvolvimento de processo de cultura celular. O método inclui uma etapa para incubar cada linhagem celular em uma condição diferente que será tes-tada. As amostras de linhagem celular são então colocadas em contato com um suporte sólido de cada linhagem celular de cada condição diferente.
20 Nesse aspecto, o suporte sólido liga à sua superfície um primeiro agente de ligação que se liga a uma proteína em cada amostra. A proteína que é ligada pelo primeiro agente de ligação entra em contato com um segundo agente de ligação, que é ligado de maneira operável a um marcador detectável, que se liga à proteína. O nível de expressão protéica em cada amostra é deter-minado ao detectar o marcador ligado de maneira operável ao segundo a-
25 gente de ligação ligado à proteína. O método também inclui a seleção das linhagens celulares que possuem um nível desejado de expressão protéica. Em alguns casos, isso será determinado ao comparar o nível de expressão protéica em cada linhagem celular com o nível médio de expressão protéica
30 em todas as linhagens celulares. Por exemplo, um nível aumentado de ex-pressão protéica comparado com o nível aumentado de expressão protéica comparado com o nível médio de expressão em todas as linhagens celula-

res poderia ser o nível desejado de expressão protéica. Alternativamente, um nível reduzido de expressão protéica poderia ser o nível desejado de expressão protéica, que também poderia ser determinado ao comparar o nível de expressão protéica em cada linhagem celular selecionada com o
 5 nível médio de expressão protéica em todas as linhagens celulares.

O método desse aspecto da invenção exige adicionalmente isolar os sobrenadantes das linhagens celulares selecionadas, e distribuir cada sobrenadante a um poço de uma placa com múltiplos poços. Os sobrenadantes entram então em contato com um reagente que se liga à proteína. A
 10 proteína é eluída do reagente e analisada para qualidade apropriada. De acordo com esse aspecto da invenção, uma condição de cultura celular adequada é identificada se a quantidade e qualidade de proteína foram aperfeiçoadas comparadas com outras condições testadas.

Em outras modalidades, o primeiro agente de ligação é selecionado do grupo que consiste em anticorpos, ligantes, receptores, proteínas de fusão, subunidades de proteínas, proteínas recombinantes, e fragmentos desses. Em modalidades particulares, o primeiro agente de ligação é Proteína A ou estreptavidina. Ainda em outras modalidades, os agentes de ligação podem ser ligados a um suporte sólido, tais como, microesferas, placas, e
 15 chips de microarranjo. Em muitas modalidades, o suporte sólido compreende celulose, sefarose, poliacrilamida, vidro ou poliestireno.
 20

Em outras modalidades, o segundo agente de ligação é selecionado do grupo que consiste em anticorpos, ligantes, receptores, proteínas de fusão, subunidades de proteínas, proteínas recombinantes, e fragmentos
 25 desses. Em modalidades particulares, o segundo agente de ligação é um anticorpo e fragmentos desse. Em modalidades ainda mais particulares, o anticorpo é um fragmento $F(ab')_2$, e ainda mais particularmente é um fragmento $F(ab')_2$ que se liga especificamente à parte Fc de um anticorpo.

Ainda em outras modalidades, o marcador detectável é um fluoróforo, corante químico, agente de ligação radioativo, agente de ligação quimiluminescente, agente eletroquimiluminescente, agente de ligação magnética, agente de ligação paramagnética, agente de ligação promagnética, en-
 30

zima que produz um produto colorido, enzima que produz um produto quimi-luminescente, e enzima que produz um produto magnético. Em modalidades muito particulares, o marcador detectável é rutênio ou múltiplos marcadores à base de rutênio.

5 Em algumas modalidades, o reagente compreende uma resina, que, em modalidades particulares, possui um terceiro agente de ligação li-gado a esse. Em certas modalidades, o terceiro agente de ligação é selecio-nado do grupo que consiste em anticorpos, ligantes, receptores, proteínas de fusão, subunidades de proteínas, proteínas recombinantes, e fragmentos
10 desses. Enquanto que em modalidades particulares, o terceiro agente de ligação é Proteína A ou estreptavidina. Em muitas modalidades, a proteína é eluída do reagente utilizando vácuo. Em muitas modalidades, a seleção das linhagens celulares incubadas utiliza uma estação de trabalho automática.

 Em certas modalidades, a condição que será testada é o meio
15 de crescimento celular. Em outras modalidades, a condição que será testada é a temperatura. Ainda em outras modalidades, a condição que será testada é a umidade. Ainda em mais modalidades, a condição que será testada é a pressão. Ainda em mais modalidades, a condição que será testada é a pres-são de oxigênio.

20 Ainda em outro aspecto, a invenção proporciona um método pa-rra a seleção de alto rendimento de linhagens celulares para produção de proteína. O método inclui uma primeira etapa para incubar as linhagens ce-lulares em meio. Uma amostra de cada linhagem celular é colocada sobre um suporte sólido, ou seja, o suporte sólido é colocado em contato com ca-
25 da amostra. Deve ser observado que o suporte sólido possui um primeiro agente de ligação ligado à sua superfície que se liga a uma proteína em ca-da amostra. O primeiro agente de ligação liga a proteína na amostra de célu-la. A proteína entra em contato com um segundo agente de ligação, que é ligado de maneira operável a um marcador detectável, que se liga à proteí-
30 na. O nível de expressão protéica é determinado em cada amostra ao detec-tar o marcador ligado de maneira operável ao segundo agente de ligação ligado à proteína. As linhagens celulares são selecionadas para produção de

proteína baseado na possibilidade de a linhagem celular possuir um nível desejado de expressão protéica quando comparado com o nível médio de expressão protéica nas linhagens celulares selecionadas.

Em algumas modalidades, a proteína é um anticorpo, ligante, receptor, subunidade de proteína, fragmento de proteína, proteína de fusão, proteína recombinante, e fragmento desses. Em certas modalidades, a proteína é um anticorpo, um anticorpo recombinante, ou um fragmento F(ab')₂.

Em outras modalidades, o primeiro agente de ligação é selecionado do grupo que consiste em anticorpos, ligantes, receptores, proteínas de fusão, subunidades de proteínas, proteínas recombinantes, e fragmentos desses. Em modalidades particulares, o primeiro agente de ligação é Proteína A ou estreptavidina. Ainda em outras modalidades, os agentes de ligação podem ser ligados a um suporte sólido, tais como, microesferas, placas, e chips de microarranjo. Em muitas modalidades, o suporte sólido compreende celulose, sefarose, poliacrilamida, vidro ou poliestireno.

Em outras modalidades, o segundo agente de ligação é selecionado do grupo que consiste em anticorpos, ligantes, receptores, proteínas de fusão, subunidades de proteínas, proteínas recombinantes, e fragmentos dessas. Em modalidades particulares, o segundo agente de ligação é um anticorpo e fragmentos desse. Em modalidades mais particulares, o anticorpo é um fragmento F(ab')₂, e ainda mais particularmente é um fragmento F(ab')₂ que se liga especificamente à parte Fc de um anticorpo.

Ainda em outras modalidades, o marcador detectável é um fluoróforo, corante químico, agente de ligação radioativo, agente de ligação quimiluminescente, agente eletroquimiluminescente, agente de ligação magnética, agente de ligação paramagnética, agente de ligação promagnética, enzima que produz um produto colorido, enzima que produz um produto quimiluminescente, e enzima que produz um produto magnético. Em modalidades muito particulares, o marcador detectável é rutênio ou múltiplos marcadores à base de rutênio. Em certas modalidades, o método compreende adicionalmente um teste de ácido siálico.

Breve Descrição das figuras

A descrição anterior e outros objetivos da presente invenção, as várias características dessa, bem como a própria invenção podem ser mais completamente entendidos a partir da seguinte descrição, quando lida juntamente com os desenhos em anexo, nos quais:

5 A figura 1 é uma representação pictórica de um teste de expressão protéica de alto rendimento que mostra a detecção de um anticorpo em uma amostra de célula.

10 A figura 2 é uma representação gráfica de um teste de seleção de alto rendimento que mostra a razão de sinal para fundo utilizando vários fragmentos $F(ab')_2$ conjugados com rutênio.

1 A figura 3 é uma representação gráfica de um teste de seleção de alto rendimento que mostra a razão de sinal para fundo utilizando vários fragmentos $F(ab')_2$ conjugados com rutênio.

15 A figura 4 é uma representação gráfica de um plano que mostra a sensibilidade de testes de seleção de alto rendimento para detectar GP1 α , receptor IL13, e proteína de fusão TNFR em concentrações diferentes.

20 A figura 5 é uma representação gráfica de um plano que mostra a sensibilidade de testes de seleção de alto rendimento para detectar anticorpos anti-GDF8, anti-CD22, e anti-Lewis Y em concentrações diferentes.

 A figura 6 é uma representação gráfica de um plano que mostra o tempo de teste requerido para o teste de seleção de título de alto rendimento e um teste HPLC.

25 A figura 7 é uma representação gráfica que mostra uma comparação entre o teste de seleção de alto rendimento e HPLC na determinação dos níveis de proteína de fusão TNFR nas amostras.

 A figura 8 é uma representação gráfica que mostra os níveis de expressão em clones como determinado por um teste de seleção de título de alto rendimento.

30 A figura 9 é uma representação gráfica que mostra uma comparação entre o teste de seleção de alto rendimento e HPLC na determinação dos níveis de anticorpos anti-Lewis Y nas amostras.

A figura 10 é uma representação gráfica que mostra uma comparação entre o teste de seleção de alto rendimento e HPLC na determinação dos níveis de PSGL e GP1ba nas amostras.

5 A figura 11 é uma representação gráfica que mostra uma comparação entre o teste de seleção de alto rendimento e HPLC na determinação dos níveis de anti-A β nas amostras.

A figura 12 é uma representação gráfica que mostra a porcentagem de proteína de alto peso molecular encontrada em amostras purificadas utilizando procedimentos de purificação diferentes.

10 A figura 13 é uma representação gráfica que mostra a porcentagem de proteína de alto peso molecular encontrada em amostras purificadas utilizando procedimentos de purificação diferentes.

A figura 14 é uma representação gráfica de um gráfico de barras que mostra a quantidade de proteína de alto peso molecular encontrada em amostras isoladas de linhagens celulares diferentes desenvolvidas em condições diferentes.

Descrição Detalhada da Invenção

A patente e literatura científica referidas aqui estabelecem o conhecimento que está disponível aos elementos versados na técnica. As patentes US depositadas, pedidos autorizados, pedidos estrangeiros publicados, e referências, inclusive seqüências de banco de dados do GenBank, que são citados aqui estão incorporados a título de referência com a mesma abrangência como se cada um estivesse específica e individualmente indicado para ser incorporado a título de referência.

25 1.1. Geral

Uma modalidade da presente invenção, em parte, proporciona métodos para selecionar linhagens celulares em termos de capacidade de produzir uma proteína de interesse. A invenção também descreve processos em termos de eficiência aprimorada na produção em escala industrial de proteínas para estudos farmacêuticos e biológicos. Em particular, a presente invenção permite a produção eficaz de proteínas que podem ser utilizadas em tratamentos farmacêuticos de doenças, tais como, câncer, doença de

Alzheimer, e diabetes. Além disso, as modalidades da invenção proporcionam um método para a seleção de alto rendimento de linhagens celulares para determinar a quantidade e qualidade de uma proteína de interesse produzida pelas linhagens celulares.

- 5 Consequentemente, um aspecto da invenção proporciona um método de seleção de alto rendimento de linhagens celulares para expressão protéica. O método utiliza um primeiro agente de ligação que se liga à proteína de interesse e um segundo agente de ligação que é ligado de maneira operável a um marcador detectável que se liga à proteína de interesse.
- 10 Em algumas modalidades, o primeiro agente de ligação é ligado a um suporte sólido, tais como, microesfera, microesfera magnética, uma placa, ou chip de microarranjo. O método também usa um reagente que se liga à proteína de interesse, e permite que a proteína seja purificada a partir de uma amostra derivada da linhagem celular. Em algumas modalidades da invenção, a
- 15 proteína é purificada a partir do reagente por meio de um vácuo que remove a proteína eluída do reagente e por meio de um filtro. Ainda em outras modalidades, a solução é permitida para fluir através do reagente por fluxo de gravidade.

- Como usado aqui, o termo "proteína terapêutica" é uma proteína
- 20 ou peptídeo que possui um efeito biológico sobre uma região no corpo onde essa atua ou sobre uma região do corpo onde essa atua remotamente através de intermediários. Uma proteína terapêutica pode ser, por exemplo, uma proteína secretada, tal como, um anticorpo, um fragmento de ligação a antígeno de um anticorpo, um receptor solúvel, uma fusão de receptor, uma
- 25 citocina, um fator de crescimento, uma enzima, ou um fator de coagulação, como descrito em mais detalhes abaixo no presente documento. A lista acima de proteínas é meramente exemplificativa em natureza, e não se destina a ser uma recitação limitativa. Um elemento versado na técnica irá entender que qualquer proteína pode ser usada de acordo com a presente invenção e
- 30 será capaz de selecionar a proteína particular que será produzida conforme necessário.

 Como usado aqui no relatório descritivo, os termos polipeptídeo,

proteína e peptídeo são sinônimos e são usados de maneira intercambiável. Consequentemente, como usado aqui, o tamanho de uma proteína, peptídeo ou polipeptídeo geralmente compreende mais de 2 aminoácidos. Por exemplo, uma proteína, peptídeo ou polipeptídeo pode compreender de cerca de 2 a cerca de 20 aminoácidos, de cerca de 20 a cerca de 40 aminoácidos, de cerca de 40 a cerca de 100 aminoácidos, de cerca de 100 aminoácidos a cerca de 200 aminoácidos, de cerca de 200 aminoácidos a cerca de 300 aminoácidos, e assim por diante.

Como usado aqui, um aminoácido se refere a qualquer aminoácido naturalmente ocorrente, qualquer derivado de aminoácido ou qualquer mimetizador de aminoácido conhecido na técnica. Em certas modalidades, os resíduos da proteína ou peptídeo são seqüenciais, sendo que nenhum não-aminoácido interrompe a seqüência de resíduos de aminoácido. Em outras modalidades, a seqüência pode compreender uma ou mais porções de não-aminoácido. Em modalidades particulares, a seqüência de resíduos da proteína ou peptídeo pode ser interrompida por uma ou mais porções de não-aminoácido.

Como usado aqui, o termo "anticorpo" é usado para se referir a qualquer molécula tipo anticorpo que possui uma região de ligação de antígeno, e inclui fragmentos de anticorpo, tais como, Fab', Fab, F(ab')₂, anticorpos de domínio único (DABs), Fv, scFv (Fv de cadeia simples), e similares. As técnicas para preparar e utilizar várias construções à base de anticorpo são bem conhecidas. Os meios para preparar e caracterizar os anticorpos também são bem conhecidos na técnica (Veja, por exemplo, Harlow and Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988; incorporado aqui a título de referência). Por exemplo, um anticorpo pode incluir ao menos uma, e de preferência, duas cadeias pesadas de comprimento total, e ao menos uma, e de preferência, duas cadeias leves. O termo "anticorpo" como usado aqui inclui um fragmento de anticorpo ou uma molécula variante, tal como, fragmento de ligação de antígeno (por exemplo, um Fab, F(ab')₂, Fv, um fragmento Fv de cadeia simples, um fragmento de cadeia pesada (por exemplo, um camélídeo VHH) e uma fusão de imuno-

globulina de domínio de ligação (por exemplo, SMIPTM).

O anticorpo pode ser um anticorpo monoclonal ou de especificidade única. O anticorpo também pode ser um anticorpo humano, humanizado, quimérico, enxertado por CDR, ou gerado in vitro. Ainda em outras modalidades, o anticorpo possui uma região constante de cadeia pesada selecionada entre, por exemplo, IgG1, IgG2, IgG3, ou IgG4. Em outra modalidade, o anticorpo possui uma cadeia leve selecionada entre, por exemplo, kappa ou lambda. Em outra modalidade, a região constante é alterada, por exemplo, modificada, para modificar as propriedades do anticorpo (por exemplo, para aumentar ou reduzir um ou mais entre: ligação de receptor Fc, glicosilação de anticorpo, inúmeros resíduos de cisteína, função de célula efetora, ou função complementar). Tipicamente, o anticorpo se liga especificamente a um antígeno predeterminado, por exemplo, um antígeno associado com um distúrbio, por exemplo, um distúrbio neurodegenerativo, metabólico, inflamatório, auto-imune e/ou maligno.

Small Modular ImmunoPharmaceuticals (SMIPTM) proporcionam um exemplo de uma molécula variante que compreende um polipeptídeo de domínio de ligação. SMIPs e seus usos e aplicações estão descritos, por exemplo, no Pedido de Patente U.S. Publicado. Nos. 2003/0118592, 2003/0133939, 2004/0058445, 2005/0136049, 2005/0175614, 2005/0180970, 2005/0186216, 2005/0202012, 2005/0202023, 2005/0202028, 2005/0202534, e 2005/0238646, e elementos da família de patente relacionada desses, estando todos aqui incorporadas por referência em sua totalidade.

Os anticorpos de domínio único podem incluir anticorpos cujas regiões de determinação complementares são parte de um polipeptídeo de domínio único. Exemplos incluem, porém sem caráter limitativo, anticorpos de cadeia pesada, anticorpos naturalmente desprovido de cadeias leves, anticorpos de domínio único derivados de anticorpos de 4 cadeias convencionais, anticorpos engenheirados e arcabouços de domínio único exceto aqueles derivados de anticorpos. Os anticorpos de domínio único podem ser qualquer um da técnica, ou quaisquer anticorpos de domínio único futuros.

Os anticorpos de domínio único podem ser derivados de qualquer espécie inclusive, porém sem caráter limitativo, camundongo, humano, camelo, lhama, cabra, coelho, bovino. De acordo com um aspecto da invenção, um anticorpo de domínio único como usado aqui é um anticorpo de domínio único naturalmente ocorrente conhecido como anticorpo de cadeia pesada desprovido de cadeias leves. Tais anticorpos de domínio único estão descritos no documento WO 9404678, por exemplo. Por razões de objetividade, esse domínio variável derivado de um anticorpo de cadeia pesada naturalmente desprovido de cadeia leve, é conhecido aqui como VHH ou nanocorpo (nobody) para distinguir o mesmo do VH convencional de imunoglobulinas de quatro cadeias. Tal molécula de VHH pode ser derivada de anticorpos elevados em espécie Camelidae, por exemplo, em camelo, lhama, dromedário, alpaca e guanaco. Outras espécies além da Camelidae podem produzir anticorpos de cadeia pesada naturalmente desprovidos de cadeia leve; tais como, VHHs estão dentro do escopo da invenção.

Exemplos de fragmentos de ligação incluídos dentro do termo "fragmento de ligação a antígeno" de um anticorpo incluem (i) um fragmento Fab, um fragmento monovalente que consiste nos domínios VL, VH, CL e CH1; (ii) um fragmento F(ab')₂, um fragmento bivalente que compreende dois fragmentos Fab ligados por uma ponte de bissulfeto na região de dobradiça; (iii) um fragmento Fd que consiste nos domínios VH e CH1; (iv) um fragmento Fv que consiste nos domínios VL e VH de um único braço de anticorpo, (v) um fragmento dAb, que consiste em um domínio VH; (vi) um domínio variável de camélídeo ou camelizado, por exemplo, um domínio VHH; (vii) um Fv de cadeia simples (scFv); (viii) um anticorpo bi-específico; e (ix) um ou mais fragmentos de uma molécula de imunoglobulina fundida em uma região Fc. Ademais, embora os dois domínios do fragmento Fv, VL e VH, seja codificados por genes separados, esses podem ser unidos, utilizando métodos recombinantes, por um ligante sintético que permite que esses sejam feitos como uma proteína de cadeia simples em que as regiões de VL e VH se unem para formar moléculas monovalentes (conhecido como Fv de cadeia simples (scFv); veja, por exemplo, Bird et al. (1988) Science 242:423-

26; Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85:5879-83). Tais anticorpos de cadeia simples também são destinados a serem incluídos dentro do termo "fragmento de ligação a antígeno" de um anticorpo. Esses fragmentos de anticorpo são obtidos utilizando técnicas convencionais conhecidas pelos elementos versados na técnica, e os fragmentos são avaliados para funcionarem da mesma maneira que os anticorpos intactos.

Exceto os anticorpos "bi-específicos" ou "bifuncionais", entende-se que um anticorpo tenha sítios de ligação idênticos. Um anticorpo "bi-específico" ou "bifuncional" é um anticorpo híbrido artificial que possui dois pares de cadeia pesada/leve diferentes e dois sítios de ligação diferentes. Os anticorpos bi-específicos podem ser produzidos por uma variedade de métodos que incluem fusão de hibridomas ou ligação de fragmentos Fab'. Veja, por exemplo, Songsivilai & Lachmann, Clin. Exp. Immunol. 79:315-321 (1990); Kostelny et al., J. Immunol. 148, 1547-1553 (1992).

Como usado aqui, o termo "linhagem celular" significa uma célula que é mantida em cultura e adquiriu a capacidade de se desenvolver em condições *ex vivo*. As linhagens celulares podem ser tanto imortalizadas como transientoriamente estabelecidas como "linhagens celulares primárias". Em certas modalidades, as linhagens celulares são estabelecidas por técnicas conhecidas (veja, por exemplo, Kwak et al. (2006) *Anim. Biotechnol.* 17(1): 51-8). Em algumas modalidades, as linhagens celulares são células produtoras de anticorpo, que podem ser produzidas por técnicas conhecidas (veja, por exemplo, Dessain et al. (2004) *J. Immunol. Methods.* 291(1-2): 109-22.). As linhagens celulares também podem ser obtidas de fontes comerciais, tais como, coleções de biologia celular ATCC (American Type Culture Collections, Mannassas, VA).

Como usado aqui, o termo "agente de ligação" significa uma molécula que pode se associar a qualquer outra molécula por meio de ligações covalentes, ligações de hidrogênio, ligações iônicas, forças de Van der Waals, forças de London, ou qualquer combinação das forças. Os agentes de ligação incluem, porém sem caráter limitativo, proteínas e fragmentos dessas, compostos peptidomiméticos, anticorpos e fragmentos desses, ácidos

nucléicos, toxinas, e moléculas pequenas.

Os agentes de ligação podem ficar dispostos sobre um suporte sólido derivatizado através de métodos bem conhecidos na técnica. Os suportes sólidos incluem, porém sem caráter limitativo, microesferas, microesferas magnéticas, chips de microarranjo, membranas de nitrocelulose, membranas de náilon, placas de múltiplos poços, e membranas de PVDF. Em algumas modalidades, o suporte sólido é uma placa em que um eletrodo fica disposto abaixo da placa, criando um campo magnético que atrai um agente de ligação ligado a um material magnético. As placas são usadas de acordo com os protocolos do fabricante (veja Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD).

Os suportes sólidos podem ser compostos de vidro, poliestireno, plástico, metais magnéticos, tais como, ferro, poliacrilamida, sefarose, celulose, ou qualquer suporte inerte que não afeta a capacidade de os agentes de ligação se ligarem a uma proteína. Os suportes sólidos são obtidos comercialmente junto a, por exemplo, Applied Biosystems, (Foster City, CA).

Ademais, em algumas modalidades, os agentes de ligação ficam dispostos sobre um suporte sólido tal como um chip de microarranjo utilizando métodos praticados pelos elementos versados na técnica por meio de um processo chamado "impressão" (veja, por exemplo, Schena *et. al.*, (1995) *Science*, 270(5235): 467-470). O termo "impressão," como usado aqui, se refere à colocação de pontos sobre o suporte sólido em tal estreita proximidade que permita que um número máximo de pontos seja disposto sobre um suporte sólido. O processo de impressão pode ser realizado, por exemplo, por uma impressora robotizada. VersArray CHIP Writer Prosystem (BioRad Laboratories) que utiliza Stealth Micro Spotting Pins (Telechem International, Inc, Sunnyvale, CA) é um exemplo não-limitativo de um dispositivo de impressão de chip que pode ser usado para produzir o microarranjo concentrado para esse aspecto.

Como usado aqui, o termo "qualidade apropriada" se refere à qualidade que está particularmente relacionada à proteína de interesse. Uma qualidade apropriada inclui, porém sem caráter limitativo, reações en-

zimáticas, interações de anticorpo-epítopo, e interações de ácido nucléico-proteína. Uma qualidade apropriada pode ser avaliada ao analisar um aspecto físico-químico particular da proteína de interesse. Por exemplo, a qualidade apropriada pode estar, se limitar aos tipos de testes que podem ser
5 usados, relacionada ao tamanho, carga, teor de carboidrato da proteína, atividade de ligação, e atividade enzimática. Análises de estrutura física, tal como, NMR podem ser usadas para determinar a estrutura terciária e secundária total da proteína. Ademais, os testes baseados em lectina e testes baseados em ácido siálico, que serão descritos de maneira mais completa
10 abaixo, podem ser usados para determinar os aspectos físico-químicos da proteína de interesse. Em outras palavras, a qualidade apropriada pode ser determinada visando não só as atividades químicas da proteína de interesse, como também a estrutura física da proteína de interesse.

Como usado aqui, o termo "eluir" significa extrair de uma resina
15 ou agente de ligação mediante o uso de um solvente. O processo de eluir uma proteína de interesse de uma resina ou agente de ligação pode envolver uma solução que contém uma molécula capaz de desalojar a proteína de interesse do agente de ligação. Ademais, a solução pode possuir um pH que altera as características de ligação da resina ou agente de ligação de modo
20 que a proteína de interesse não se associe mais à proteína de interesse. Deve ser observado que qualquer solução pode ser usada para eluir uma proteína na presente invenção desde que o processo não afete a funcionalidade ou qualidade total da proteína de interesse.

Como usado aqui, o termo "resina" significa qualquer produto
25 orgânico sólido ou semi-sólido de origem natural ou sintética. As resinas incluem qualquer material que pode ser conjugado a uma porção que permite a purificação de uma molécula de uma mistura complexa. As porções úteis na presente invenção incluem moléculas catiônicas, moléculas aniônicas, metais, metalóides, polissacarídeos, polipeptídeos, proteínas, ácidos nucléicos, peptídeos, moléculas orgânicas pequenas e compostos peptidomiméticos.
30 Em particular, as próprias resinas podem ser compostas de qualquer composto inerte inclusive, porém sem caráter limitativo, sephadex, poliesti-

reno, poliacrilamida, ou polissacarídeos neutros. As resinas podem ser comercialmente obtidas junto a, por exemplo, Clontech Laboratories, Inc. (Mountain View, CA).

O termo "alto rendimento" como usado aqui significa permitir que
5 uma metodologia rápida e simples determine a presença de expressão protéica desejada em uma linhagem celular. A expressão protéica desejada se refere tanto à quantidade como qualidade das moléculas biológicas expressas pelas linhagens celulares selecionadas pelas técnicas de alto rendimento. A metodologia de alto rendimento também pode incluir sistemas automáticos para processar as moléculas biológicas e processar dados automáticos
10 para seleção em grande escala.

Como usado aqui, o termo "seleção de título de alto rendimento" se refere a um procedimento usado para determinar a quantidade de proteína expressa por uma célula. A seleção de título de alto rendimento inclui o
15 uso de agentes de ligação para identificar uma proteína de interesse em uma amostra derivada de uma célula. Os agentes de ligação podem ser ligados de maneira operável a um marcador detectável ou um suporte sólido, sendo que todos serão descritos de maneira mais detalhada abaixo.

Como usado aqui, o termo "purificação de alto rendimento" significa o processo para purificar proteínas de múltiplas amostras de células ao
20 mesmo tempo ou substancialmente ao mesmo tempo.

Como usado aqui, o termo "desenvolvimento de processo de cultura celular" se refere a procedimentos para produzir a otimização das condições necessárias para produzir proteínas em quantidades e qualidades
25 suficientes para produção industrial ou em pequena escala. As condições que podem ser testadas utilizando processo de cultura celular incluem, porém sem caráter limitativo, concentração de sal, conteúdo do meio, temperatura de crescimento, pressão atmosférica, teor de oxigênio atmosférico, agitação de cultura, e teor de dióxido de carbono. O desenvolvimento de processo de cultura celular inclui as etapas de determinar a quantidade de uma
30 proteína (seleção de título de alto rendimento) e a qualidade de uma proteína (purificação de alto rendimento).

Os métodos para determinar a qualidade de uma proteína para propósitos de desenvolvimento de processo de cultura celular incluem, porém sem caráter limitativo, testes de ligação, testes baseados em lectina, testes baseados em ácido siálico, NMR, dicroísmo circular, espectrometria de massa, MALDI-TOF, análises enzimáticas, testes colorimétricos, e sequenciamento de aminoácido. Essas análises podem ser usadas em qualquer momento durante o método de desenvolvimento de processo de cultura celular. Em certas modalidades, os testes são realizados após o término da purificação de alto rendimento da proteína de interesse.

O termo "proteína de interesse" como usado aqui significa qualquer proteína, ou molécula tipo proteína, produzida para propósitos biológicos, médicos, medicinais, ou farmacêuticos. Por exemplo, uma proteína de interesse pode ser uma proteína terapêutica. As proteínas de interesse podem ser produzidas a partir de seqüências de ácido nucléico, seja cromossomais ou extracromossomais, que incluem, porém sem caráter limitativo, RNA pré-mensageiro, RNA mensageiro, RNA de transferência, RNA heteronuclear ("HnRNA"), RNA ribossômico, DNA de cadeia simples, e RNA de cadeia dupla. As fontes extracromossomais de seqüências de ácido nucléico podem incluir genomas virais de DNA de cadeia dupla, genomas virais de DNA de cadeia simples, genomas virais de RNA de cadeia dupla, genomas virais de RNA de cadeia simples, DNA bacteriano, DNA genômico mitocondrial, cDNA ou qualquer outra fonte externa de ácido nucléico que é capaz de gerar uma proteína de interesse. Uma proteína de interesse pode ser qualquer estrutura ou combinação de estruturas. Por exemplo, as proteínas de interesse incluem, porém sem caráter limitativo, proteínas recombinantes, proteínas que contêm uma estrutura quaternária, proteínas glicosiladas, proteínas lipidadas, oligopeptídeos, peptídeos, domínios de proteína, subunidades de proteína, anticorpos ou fragmentos desses, e moléculas tipo anticorpo. As proteínas de interesse também incluem, por exemplo, proteínas de fusão. As proteínas de fusão possuem geralmente todo ou uma parte substancial de um peptídeo de marcação, ligado na terminação N ou C, a todo ou uma parte de um segundo polipeptídeo ou proteína. Por exemplo, as fusões

podem empregar seqüências líderes de outras espécies para permitir a expressão recombinante de uma proteína em um hospedeiro heterólogo. Outra fusão útil inclui a adição de um domínio imunologicamente ativo, tal como, um epítopo de anticorpo, para facilitar a purificação da proteína de fusão.

- 5 Uma proteína de fusão pode incluir uma porção de marcação, por exemplo, um fragmento de receptor solúvel ou um ligante, e uma cadeia de imunoglobulina, um fragmento Fc, regiões constantes de cadeia pesada dos vários isotipos, inclusive: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA1, IgA2, IgD, e IgE). Por exemplo, a proteína de fusão pode incluir o domínio extracelular de um receptor, e, por exemplo, fundida, uma cadeia Fc de imunoglobulina humana (por exemplo, IgG humano, por exemplo, IgG1 humano ou IgG4 humano, ou uma forma modificada desses). Em uma modalidade, a seqüência Fc humana foi modificada em um ou mais aminoácidos, por exemplo, modificada nos resíduos 254 e 257 da seqüência tipo selvagem para reduzir a ligação de receptor Fc. As proteínas de fusão podem incluir adicionalmente uma seqüência ligante que une a primeira porção à segunda porção, por exemplo, o fragmento de imunoglobulina. Por exemplo, a proteína de fusão pode incluir um ligante peptídico, por exemplo, um ligante peptídico de cerca de 4 a 20, mais preferivelmente, 5 a 10, aminoácidos de comprimento; o ligante peptídico possui 8 aminoácidos de comprimento. Por exemplo, a proteína de fusão pode incluir um ligante peptídico que possui a fórmula (Ser-Gly-Gly-Gly-Gly)y onde y é 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, ou 8. Em outras modalidades, as seqüências de aminoácido adicionais podem ser adicionadas à terminação N ou C da proteína de fusão para facilitar a expressão, flexibilidade estérica, detecção e/ou isolamento ou purificação.
- 10
- 15
- 20
- 25

A inclusão de um sítio de clivagem na ou próxima à junção de fusão irá facilitar a remoção do polipeptídeo estranho após a purificação. Outras fusões úteis incluem a ligação de domínios funcionais, tais como, sítios ativos de enzimas, domínios de glicosilação, sinais de marcação celular ou regiões de transmembrana. Exemplos de proteínas ou peptídeos que podem ser incorporados em uma proteína de fusão incluem proteínas citotáticas, proteínas citocidais, agentes pró-apoptose, agentes anti-

30

angiogênicos, hormônios, citocinas, fatores de crescimento, fármacos à base de peptídeo, anticorpos, anticorpos de fragmentos Fab, antígenos, proteínas receptoras, enzimas, lectinas, proteínas MHC, proteínas de adesão celular e proteínas de ligação. Os métodos para gerar as proteínas de fusão são bem conhecidos pelos versados na técnica. Tais proteínas podem ser produzidas, por exemplo, por ligação química utilizando reagentes de reticulação bifuncionais, por meio da síntese da proteína de fusão completa, ou por ligação de uma seqüência de DNA que codifica o peptídeo de marcação a uma seqüência de DNA que codifica o segundo peptídeo ou proteína, seguidas pela expressão da proteína de fusão intacta.

Em certas modalidades, uma proteína de fusão é um inibidor do fator de necrose tumoral, por exemplo, na forma de alfa e beta receptores de fator de necrose tumoral (TNFR-1; EP 417.563 publicado em 20 de março de 1991; e TNFR-2, EP 417.014 publicado em 20 de março de 1991, cada um está incorporado aqui a título de referência em sua totalidade), e é analisado de acordo com a presente invenção (para revisão, veja Naismith and Sprang, J Inflamm. 47(1-2):1-7, 1995-96, incorporado aqui a título de referência em sua totalidade). De acordo com algumas modalidades, um inibidor do fator de necrose tumoral compreende um receptor TNF solúvel. Em certas modalidades, um inibidor do fator de necrose tumoral compreende um TNF solúvel fundido com qualquer parte de uma proteína imunoglobulina, inclusive a região Fc de uma imunoglobulina. Em certas modalidades, os inibidores de TNF da presente invenção são formas solúveis de TNFR I e TNFR II. Em certas modalidades, os inibidores de TNF da presente invenção são proteínas de ligação de TNF solúveis. Em certas modalidades, os inibidores de TNF da presente invenção são TNFR-Fc, por exemplo, etanercept. Como usado aqui, "etanercept", se refere a um TNFR-Fc, que é um dímero de duas moléculas da parte extracelular do receptor p75 TNF- α , cada molécula consiste em uma parte Fc de 235 aminoácidos de IgG1 humana. De acordo com a invenção, um composto anti-envelhecimento, tal como carnosina, é usado para reduzir a quantidade de proteína mal-enovelada e/ou agregada durante a produção de TNFR-Fc.

As proteínas ou peptídeos podem ser feitos por meio de qualquer técnica conhecida pelos elementos versados na técnica, inclusive a expressão de proteínas, polipeptídeos ou peptídeos através de técnicas biológicas moleculares padrão, o isolamento de proteínas ou peptídeos de fontes naturais, ou a síntese química de proteínas ou peptídeos. As regiões de codificação de genes conhecidos podem ser amplificadas e/ou expressas utilizando as técnicas descritas aqui ou como conhecidas pelos elementos versados na técnica (veja, por exemplo, Kaleeba et al. (2006) Science 311 (5769):1921-4). Alternativamente, várias preparações comerciais de proteínas, polipeptídeos e peptídeos são conhecidas pelos elementos versados na técnica.

Ademais, como usado aqui, o termo "nível desejado de expressão" significa a quantidade de proteína necessária, dependendo das características físico-químicas da proteína, para permitir a purificação subsequente da proteína. Os níveis desejados de expressão de uma proteína de interesse dependem de inúmeros fatores relacionados aos métodos de produção que serão utilizados. Por exemplo, o nível de expressão de uma linhagem celular particular permite a análise de qualidade e quantidade de proteína bem como a purificação eficaz da proteína. O nível desejado de expressão protéica de uma linhagem celular, portanto, é determinado por um elemento versado na técnica e, vista das características da proteína e os métodos de purificação e teste que serão usados nas proteína.

Em certas modalidades, os níveis desejados de expressão protéica são selecionados com base nas exigências particulares da proteína de interesse. Por exemplo, um elemento versado na técnica pode selecionar um nível desejado de expressão protéica que será um nível aumentado de expressão de uma proteína de interesse para aumentar a quantidade de proteína produzida. Em outras modalidades, um nível reduzido de expressão da proteína de interesse é selecionado para ser o nível desejado de expressão protéica no caso de proteínas, tal como, uma toxina, que são tóxicas em altos níveis na célula que produz a toxina. Ademais, um nível reduzido de expressão protéica é selecionado em situações quando a proteína de interesse

forma corpos de inclusão em altos níveis de concentração. Portanto, o nível de expressão protéica selecionado por um elemento versado na técnica depende das características da proteína de interesse.

Ao determinar a quantidade e qualidade de uma proteína produzida por uma linhagem celular, uma amostra de linhagem celular é tipicamente necessária para a avaliação de expressão protéica e qualidade de proteína. Em certas modalidades, uma amostra de linhagem celular é isolada utilizando meios que são conhecidos na técnica, tal como, lise celular e isolamento de sobrenadante (veja, por exemplo, Vara *et al.* (2005) *Biomaterials* 26(18): 3987-93; Iyer *et al.* (1998) *J. Biol. Chem.* 273(5):2692-7). Alternativamente, as amostras de linhagem celular são isoladas de um meio que possui uma proteína secretada, tal como, um anticorpo, proteína de matriz extracelular, ou proteína do soro. Em tais modalidades, o meio é a amostra que será testada em termos de quantidade e qualidade de proteína. Em uma modalidade, a amostra de meio é usada em um ensaio para testar a quantidade de proteína, na ausência de qualquer etapa de purificação anterior, como adicionalmente descrito aqui.

Outro aspecto da invenção proporciona um método de seleção de alto rendimento de linhagens celulares para produção de proteína. Nesse método, os níveis de expressão protéica são determinados ao colocar um suporte sólido em contato com uma amostra de linhagem celular que contém uma proteína. Em uma modalidade, a amostra de linhagem celular é o meio de cultura celular. O suporte sólido ligou à sua superfície um primeiro agente de ligação que é capaz de se ligar à proteína. O método também inclui um segundo agente de ligação que se liga à proteína ligada pelo primeiro agente de ligação e imobilizada sobre o suporte sólido. O segundo agente de ligação é ligado de maneira operável a um marcador detectável. As linhagens celulares são selecionadas com base no nível desejado de expressão requerido pela proteína.

O nível de expressão de uma proteína particular pode ser medido pela técnica de "dot blot" em que um primeiro agente de ligação é imobilizado sobre uma membrana tal como nitrocelulose, náilon, ou PVDF (veja,

por exemplo, Heinicke *et al.* (1992) *J. Immunol. Methods*. 152(2): 227-36.). A tecnologia de microarranjo de proteína também pode ser usada para determinar a expressão de proteínas em uma amostra. Alternativamente, uma amostra é colocada em um poço de uma placa de múltiplos poços que contém o primeiro agente de ligação. Em tais modalidades, técnicas similares, tais como, ensaios ELISA são comuns (veja, por exemplo, Ausubel, *et al.* (1996) *Current Protocols in Molecular Biology*, Vol. 1, pp. 4.2.1-4.2.9, John Wiley & Sons, Inc.

Em algumas modalidades, a seleção de alto rendimento e/ou purificação das amostras de linhagem celular são realizadas utilizando uma estação de trabalho automática. Ademais, o desenvolvimento de processo de cultura celular pode ser realizado utilizando estações de trabalho automáticas. As estações de trabalho automáticas são comumente utilizadas na técnica para realizar diversos experimentos em um curto período de tempo. Exemplos de estações de trabalho automáticas incluem, porém sem caráter limitativo, TECAN Genesis Workstation (TECAN Schweiz AG, Mannedorf, CH) and the Biomek FX Workstation (Beckman Coulter, Fullerton, CA). Os métodos de uso podem ser obtidos a partir dos fabricantes de estações de trabalho automáticas e são bem conhecidos na técnica.

1.2. Agentes de ligação

Os aspectos da invenção utilizam agentes de ligação para ligar uma proteína de interesse. Em certas modalidades, um agente de ligação é um anticorpo ou fragmento desse. Quando o agente de ligação que se liga especificamente a uma proteína for um anticorpo, o anticorpo pode ser, sem caráter limitativo, um anticorpo policlonal, um anticorpo monoclonal, um anticorpo quimérico, um anticorpo humanizado, um anticorpo geneticamente engenheirado, um anticorpo bi-específico (quando uma das especificidades do anticorpo bi-específico se ligar especificamente à proteína triosefosfato isomerase), fragmentos de anticorpo (inclusive, porém sem caráter limitativo, "Fv," "F(ab')₂", "F(ab)", e "Dab"); e cadeias simples que representam a parte reativa de um anticorpo ("SC-MAb"). Os métodos para formar anticorpos e outros agentes de ligação são bem conhecidos (veja, por exemplo, Coligan

et al. (1991) *Current Protocols in Immunology*, John Wiley and Sons, Inc.; Jones *et al.* (1986) *Nature* 321: 522-525; Marx (1985) *Science* 229: 455-456; Rodwell (1989) *Nature* 342: 99-100; Clackson (1991) *Br. J. Rheumatol.* 3052: 36-39; Reichman *et al.* (1988) *Nature* 332: 323-327; Verhoeyen, *et al.* 5 (1988) *Science* 239: 1534-1536).

O agente de ligação pode ser um anticorpo ou fragmento desse que se liga à parte Fc de um anticorpo. Em certas modalidades, o agente de ligação permite a detecção de anticorpos em uma amostra de linhagem celular. Em modalidades particulares, um anticorpo, que é o segundo agente de 10 ligação, é marcado de maneira detectável com um marcador eletroquimiluminescente detectável, tal como, rutênio. Ademais, o segundo agente de ligação pode ser um fragmento $F(ab')_2$ marcador de maneira detectável com um marcador eletroquimiluminescente detectável, tal como, rutênio.

A detecção de uma proteína de interesse utilizando fragmentos 15 $F(ab')_2$ é mostrada na figura 1. O fragmento $F(ab')_2$ é ligado de maneira operável a um marcador detectável, tal como, um Ori-Tag. Na figura 1, o fragmento $F(ab')_2$ reconhece a parte Fc de um anticorpo, que é uma proteína de interesse nesse exemplo pictorial. O anticorpo foi imobilizado sobre uma microesfera, que possui Proteína A ou estreptavidina conjugada com esse (fi- 20 gura 1). A ligação do fragmento $F(ab')_2$ é observada como uma geração de luz (figura 1).

É importante observar que os anticorpos usados como um primeiro agente de ligação em um aspecto da presente invenção podem ser acoplados à superfície de um suporte sólido. O acoplamento do primeiro a- 25 gente de ligação aprimora a resistência de sinal da reação e produz resultados aprimorados. Os agentes de acoplamento comuns incluem, porém sem caráter limitativo, silanização utilizando (3-mercaptopropil) trimetoxisilano, revestimento de agarose, e películas poli-L-lisina. Adicionalmente, os anticorpos recombinantes podem ser engenheirados para incluir um marcador 30 que facilita o acoplamento ao suporte. Por exemplo, um anticorpo recombinante que possui um marcador histidina pode ser acoplado a suportes revestidos com níquel.

Ademais, os compostos, tais como, peptídeos, compostos peptidomiméticos, e moléculas pequenas podem ser usados como agentes de ligação. Os agentes de ligação podem ser sintetizados a partir de peptídeos ou outras biomoléculas, inclusive, porém sem caráter limitativo, sacarídeos, ácidos graxos, esteróis, isoprenóides, purinas, pirimidinas, derivados ou análogos estruturais desses, ou suas combinações e similares. As bibliotecas de exibição de fagos e bibliotecas combinatórias químicas podem ser usadas para desenvolver e selecionar compostos sintéticos que são agentes de ligação aceitáveis de uma proteína de interesse. O uso de agentes de ligação potenciais feitos de peptídeos, bio-oligômeros aleatórios (Patente No. U.S. 5.650.489), benzodiazepinas, diversômeros, tais como, didantoínas, benzodiazepinas e dipeptídeos, peptidomiméticos não-peptídais com um arcabouço de beta-D-glucose, oligocarbamatos ou peptidil fosfonatos também é previsto na invenção.

Em certos exemplos, os agentes de ligação podem ser peptídeos que são projetados especificamente para interagir, se ligar, ou se associar a uma proteína. Os agentes de ligação peptídicos também podem interagir, se associar, ou se ligar a uma seqüência de aminoácido de qualquer outra proteína. Os peptídeos podem ser submetidos a modificações químicas direcionadas ou aleatórias, tais como, acilação, alquilação, esterificação, amidificação, etc.

A identificação e seleção de agentes de ligação peptídicos é adicionalmente facilitada ao determinar as características estruturais da proteína de interesse, *por exemplo*, utilizando cristalografia de raio-X, difração de nêutrons, espectrometria de ressonância magnética nuclear, e outras técnicas para determinação de estrutura. Os algoritmos de computador podem facilitar ainda a identificação do agente de ligação. Tais algoritmos de computador que são empregados são capazes de selecionar um banco de dados de peptídeos e moléculas pequenas de estrutura tridimensional conhecida para candidatos que se adaptam geometricamente no sítio da proteína alvo (veja, por exemplo, Chen and Kellogg (2005) *J. Comput. Aided Mol. Des.* 19(2):69-82). A maioria dos algoritmos desse tipo proporciona um mé-

todo para encontrar uma ampla classificação de estruturas químicas que são complementares ao formato de uma bolsa de ligação ou região de um domínio de uma proteína. Cada conjunto de peptídeos de um banco de dados particular pode ser comparado para determinar os peptídeos particulares
 5 que possuem maior potencial para interagir com uma proteína de interesse.

Os compostos da presente invenção também podem ser compostos peptidomiméticos que podem ser ao menos parcialmente não-naturais. O composto peptidomimético pode ser um mimetizador de molécula pequena de uma parte de qualquer seqüência de aminoácido desejada. O
 10 composto pode possuir estabilidade, eficácia, potência e biodisponibilidade aumentadas devido ao mimetizador. Ademais, o composto pode possuir toxicidade reduzida. O composto peptidomimético pode possuir permeabilidade da mucosa intestinal. O composto pode ser sinteticamente preparado. O composto da presente invenção pode incluir aminoácidos L,D ou não-
 15 naturais, alfa aminoácidos, alfa aminoácidos dissustituídos, N-alkil aminoácidos, ácido láctico (um análogo isoeletrônico de alanina). A cadeia principal de peptídeo do composto pode ter ao menos uma ligação substituída por PSI-[CH=CH] (Kempf *et al.* (1991) *Int. J. Pept. Protein Res.* 38(3): 237-41). O composto pode incluir adicionalmente trifluorotirosina, p-Cl-fenilalanina, p-Br-fenilalanina, poli-L-propargilglicina, poli-D,L-alil glicina, ou poli-L-alil glicina.
 20

Um exemplo da presente invenção é um composto peptidomimético em que o composto possui uma ligação, uma cadeia principal de peptídeo ou um componente aminoácido substituído por um mimetizador adequado. Exemplos de aminoácidos não-naturais que podem ser mimetizadores de aminoácido adequados incluem, porém sem caráter limitativo, β -alanina, ácido L- α -amino butírico, ácido L- γ -amino butírico, ácido L- α -amino isobutírico, ácido L- ϵ -amino capróico, ácido 7-amino heptanóico, ácido L-aspartico, ácido L-glutâmico, cisteína (acetamindometil), N- ϵ -Boc-N- α -CBZ-L-lisina, N- ϵ -Boc-N- α -Fmoc-L-lisina, sulfona L-metionina, L-norleucina, L-
 25 norvalina, N- α -Boc-N- δ -CBZ-L-ornitina, N- δ -Boc-N- α -CBZ-L-ornitina, Boc-p-nitro-L-fenilalanina, Boc-hidroxiprolina, Boc-L-tioprolina. (Blondelle, *et al.* (1994) *Antimicrob. Agents Chemother.* 38(10): 2280-6; Pinilla, *et al.* (1995)

Biopolymers. 37(3): 221-40).

Às vezes, os agentes de ligação podem ser moléculas pequenas que se ligam, interagem, ou se associam a uma proteína. Tal molécula pequena pode ser uma molécula orgânica que é capaz de penetrar na bicamada lipídica de uma célula. As moléculas pequenas incluem, porém sem caráter limitativo, toxinas, agentes quelantes, metais, e compostos metalóides. As moléculas pequenas podem ser ligadas ou conjugadas a um agente alvo para guiar especificamente a molécula pequena até uma célula particular.

Em algumas modalidades, um agente de ligação é uma sequência de ácido nucléico, que pode ser uma sequência de comprimento total, fragmentos de sequências de comprimento total ou oligonucleotídeos sintetizados que se ligam sob condições fisiológicas a uma proteína tal como um fator de transcrição. O "ácido nucléico" se refere a um polímero que compreende dois ou mais nucleotídeos e inclui polímeros de cadeia simples, dupla e tripla. "Nucleotídeo" se refere tanto a compostos naturalmente ocorrentes como não-naturalmente ocorrentes e compreende uma base heterocíclica, um açúcar, e um grupo de ligação, tal como, um éster fosfato. Por exemplo, os grupos estruturais podem ser adicionados à unidade ribosil ou desoxirribosil do nucleotídeo, tal como, um grupo metila ou alila na posição 2'-O ou um grupo flúor que substitui o grupo 2'-O. O grupo de ligação, tal como um fosfodiéster, do ácido nucléico pode ser substituído ou modificado, por exemplo, por metil fosfonatos ou O-metil fosfatos. As bases e açúcares também podem ser modificados, como conhecido na técnica. O "ácido nucléico", para os propósitos dessa descrição, também inclui "ácidos nucléicos peptídicos" em que as bases de ácido nucléico nativas ou modificadas são ligadas a uma cadeia principal de poliamida.

Os agentes de ligação da presente invenção podem ser conjugados a um marcador detectável. De acordo com a invenção, um "marcador detectável" é uma porção que pode ser percebida. Em algumas modalidades, um marcador detectável é ligado de maneira operável a um agente de ligação. Por "ligado de maneira operável", entende-se que o marcador detectável é ligado ao agente de ligação tanto por uma ligação covalente como

não-covalente (por exemplo, iônica). Os métodos para criar ligações covalentes são conhecidos (veja protocolos gerais, por exemplo, em Wong, S. S. (1991) *Chemistry of Protein Conjugation and Cross-Linking*, CRC Press; Burkhart et al. (1999) *The Chemistry and Application of Amino Crosslinking Agents or Aminoplasts*, John Wiley & Sons Inc.).

De acordo com a invenção, um agente de ligação marcado de maneira detectável que é conjugado a uma porção detectável. Outro agente de ligação marcado de maneira detectável da invenção é uma proteína de fusão, onde parceiro é o agente de ligação e o outro parceiro é um marcador detectável. Ainda um exemplo não-limitativo adicional de um agente de ligação marcado de maneira detectável é uma primeira proteína de fusão que compreende um agente de ligação e uma primeira porção com alta afinidade e uma segunda porção, e uma segunda proteína de fusão que compreende uma segunda porção e um marcador detectável. Por exemplo, um agente de ligação que se liga especificamente a uma proteína é ligado de maneira operável a uma porção de estreptavidina. Uma segunda proteína de fusão que compreende uma porção de biotina ligada de maneira operável a uma porção de fluoresceína é adicionada à proteína de fusão de agente de ligação-estreptavidina, onde a combinação da segunda proteína de fusão com a proteína de fusão de agente de ligação-estreptavidina resulta em um agente de ligação marcado de maneira detectável (ou seja, um agente de ligação marcado de maneira operável a um marcador detectável). Em modalidades particulares, o marcador detectável é detectável por um dispositivo ou sistema de imagens médico. Por exemplo, quando o sistema de imagens médico for uma máquina de raio-X, o marcador detectável que pode ser detectado pela máquina de raio-X é um marcador radioativo (por exemplo, ^{32}P). Nota-se que um agente de ligação não precisa ser diretamente conjugado à porção detectável. Por exemplo, um agente de ligação (por exemplo, um anticorpo) que é especificamente ligado a si mesmo ou por um agente de ligação detectável secundário (por exemplo, um anticorpo secundário de cabra anti-camundongo marcado FITC) é ligado de maneira operável a uma porção detectável (ou seja, a porção FITC).

Os marcadores detectáveis pode ser, sem caráter limitativo, fluoróforos (por exemplo, fluoresceína (FITC), ficoeritrina, rodamina), corantes químicos, ou compostos que são radioativos, quimiluminescentes, eletroquimiluminescentes, magnéticos, paramagnéticos, promagnéticos, ou enzimas que produzem um produto que pode ser colorido, quimiluminescente, ou magnético. O sinal é detectável por qualquer meio adequado, inclusive meio espectroscópico, fotoquímico, bioquímico, imunoquímico, elétrico, óptico ou químico. Em certos casos, o sinal é detectável por dois ou mais meios. Em certas modalidades, os marcadores de proteína incluem corantes fluorescentes, radiomarcadores, marcadores eletroquimiluminescentes, e quimiluminescentes.

Por exemplo, os aminoácidos de agentes de ligação podem ser conjugados aos corantes fluorescentes Cy5/ Cy3. Esses corantes são frequentemente usados na técnica (veja, por exemplo, Linder *et al.* (2002) *Electrophoresis*. 23(5): 740-9). Os marcadores fluorescentes podem ser selecionados a partir de uma variedade de classes estruturais, inclusive os exemplos não-limitativos, tais como, 1 e 2-aminonaftaleno, p,p'diaminostilbenos, pirenos, sais de fenantridina quaternários, 9-aminoacridinas, p,p'-diaminobenzofenona iminas, antracenos, oxacarbocianina, marocianina, 3-aminoequilenina, perileno, bisbenzoxazol, bis-p-oxazolil benzeno, 1,2-benzofenazina, retinol, sais bis-3-aminopridínio, helebrigenina, tetraciclina, esterofenol, enzimidazolil fenilamina, 2-oxo-3-cromo, indol, xanteno, 7-hidroxycumarina, fenoxazina, salicilato, estrofantidina, porfirinas, triarilmetas, flavina, corantes xanteno (por exemplo, corantes fluoresceína e rodamina); corantes cianina; corantes 4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indaceno e proteínas fluorescentes (por exemplo, proteína verde fluorescente, ficobiliproteína).

Outros corantes úteis são corantes quimiluminescentes e podem incluir, sem caráter limitativo, aminoácidos conjugados com biotina. Em modalidades particulares, as sondas eletroquimiluminescentes são conjugadas com os agentes de ligação. Como usado aqui, "eletroquimiluminescência" é uma reação quimiluminescente que ocorre subsequentemente a uma reação

eletroquímica. As sondas eletroquimiluminescentes incluem, porém sem caráter limitativo, luminol, éster acridan, rutênio, quelato de rutênio, e tribipiridina de rutênio, éster NHS. As sondas eletroquimiluminescentes podem ser comercialmente obtidas junto a, por exemplo, BioVeris Corp. (Gaithersburg, MD).

1.3 Análises Analíticas

Os aspectos da presente invenção também utilizam análises da qualidade da proteína. Essas análises podem ser utilizadas durante a seleção de título de alto rendimento da proteína de interesse. A qualidade da proteína também pode ser determinada durante o desenvolvimento de processo de cultura celular. Como parte da qualidade da proteína, a estrutura da proteína inclui a estrutura primária, secundária, terciária, e quaternária de uma proteína bem como modificações pós-traducionais, tais como, glicosilação, lipidação, e fosforilação. Ademais, o tamanho, formato, e carga da proteína afetam a qualidade da proteína. A estrutura física de uma proteína possui um efeito significativo sobre a capacidade de uma proteína para realizar suas funções normais. No contexto de reações enzimáticas, a estrutura da proteína é essencialmente importante para qualidade enzimática total. No contexto de anticorpos ou fragmentos desses, o tamanho, formato, carga de superfície, glicosilação, e fosforilação de aminoácidos do anticorpo possui um efeito significativo sobre a especificidade do epítipo do anticorpo.

Em algumas modalidades, NMR, análises Matrix assisted laser desorption/time-of-flight ("MALDI-TOF"), e dicroísmo circular são usados para determinar a estrutura física de uma proteína (veja, por exemplo, Patente Nos. U.S. 6.930.305; 7.005.272; e 7.029.872). Tais técnicas proporcionam uma análise detalhada da estrutura física total da proteína. Essas técnicas são bem conhecidas.

Em modalidades particulares, a cromatografia de exclusão por tamanho é usada para determinar o tamanho da proteína de interesse (veja, por exemplo, Brooks *et al.* (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97(13): 7064–7067). Ademais, a cromatografia de troca catiônica pode ser usada para determinar a carga de uma proteína (veja, por exemplo, Zhang and Glatz

(1999) *Biotechnol. Prog.* 15(1): 12-18). Outras técnicas que podem ser utilizadas para identificar a estrutura de uma proteína de interesse incluem, porém sem caráter limitativo, HPLC em fase reversa, eletroforese capilar SDS, eletroforese de zona capilar, e HPLC de troca aniônica e alto pH. Essas técnicas podem ser praticadas utilizando procedimentos que são bem conhecidos.

Outros testes estruturais incluem o teste baseado em ácido siálico e o teste baseado em lectina. Esses testes identificam o nível de glicosilação encontrado sobre a superfície de uma proteína, que informa sobre a qualidade da proteína. Os testes baseados em ácido siálico foram usados para determinar o nível de carboidratos presente em uma amostra, e essas técnicas são conhecidas (veja, por exemplo, Patente Nos. U.S. 5.807.553 e 5.855.901). Os testes baseados em lectina também detectam a presença de carboidrato em uma amostra, porém através de um mecanismo de uma interação proteína-carboidrato (veja, por exemplo, Patente No. U.S. 5.633.148). Os testes baseados em lectina foram usados amplamente na técnica para ligação de carboidrato, e estão descritos, por exemplo, na Patente No. U.S. 6.331.319.

Além de determinar a estrutura física de uma proteína, a capacidade de uma proteína realizar certas funções pode ser avaliada (veja, por exemplo, Patente No. U.S. 7.029.862). Também, a função de ligação de uma proteína ou polipeptídeo (por exemplo, codificada por hibridização de ácido nucléico) pode ser detectada em testes de ligação ou inibição de ligação, utilizando frações de membrana que contêm receptor ou receptor de expressão celular, por exemplo (veja, por exemplo, Van Riper *et al.* (1993) *J. Exp. Med.*, 177: 851-856; Sledziewski *et al.*, U.S. Pat. No. 5,284,746). Assim, a capacidade de a proteína ou polipeptídeo codificado se ligar a um ligante, um inibidor e/ou promotor, pode ser avaliada. As propriedades antigênicas de proteínas ou polipeptídeos codificados por ácidos nucléicos da presente invenção podem ser determinadas por métodos imunológicos que empregam anticorpos que se ligam a uma proteína, tal como, immunoblotting, imunoprecipitação e imunoensaio (por exemplo, radioimunoensaio, ELISA).

A função de sinalização de uma proteína ou polipeptídeo (por exemplo, codificada por hibridização de ácido nucléico) pode ser detectada por análises enzimáticas. A função estimulatória de uma proteína ou polipeptídeo (por exemplo, codificada por hibridização de ácido nucléico) pode ser detectada por testes padrão de quimiotaxia ou liberação de mediador, utilizando células que expressam a proteína ou polipeptídeo (por exemplo, testes que monitoram a quimiotaxia, exocitose (*por exemplo*, degranulação de enzimas, tais como, esterases (por exemplo, serina esterases), perforina, granzimas) ou liberação de mediador (por exemplo, histamina, leucotrieno) em resposta a um ligante ou um promotor (veja, por exemplo, Taub *et al.* (1995) *J. Immunol.*, 155: 3877-3888; Baggiolini, M. and C. A. Dahinden (1994) *Immunology Today*, 15: 127-133 e referências citadas aqui). As funções características de um receptor de proteína também podem ser avaliadas por outros métodos adequados.

Para demonstrar os métodos de acordo com a invenção, os métodos de seleção como descrito acima foram realizados em várias linhagens celulares como propósito de identificar aquelas linhagens celulares que produziram tanto uma quantidade suficiente de proteína como qualidade suficiente de proteína.

20 Exemplos

Os elementos versados na técnica irão reconhecer, ou ser capazes de verificar, utilizando não mais que a experimentação comum, inúmeros equivalentes às substâncias e procedimentos específicos descritos aqui. Tais equivalentes são destinados a serem incluídos no escopo das reivindicações que seguem os exemplos abaixo.

Exemplo 1

Seleção de alto rendimento de Análise Protéica de Fc Humano

1. Preparação de Padrões Anti-A β

Um tampão de curva padrão (SCB) foi preparado ao misturar 20 ul de Meio R5CD1, e 24 ml de tampão de análise (PBS w/ 0,05 % de Tween 20 e 1 % de albumina de soro bovino) em 16 placas de análise (Corning/Costar, Corning, NY). 0,3 mg/ml de um padrão intermediário foi prepa-

rado utilizando 6 ul de 32,5 mg/ml de padrão de referência e 644 ul de SCB (preparados frescos toda vez). Um ug/ml padrão foi colocado em um poço designado A1 e em um poço adicional designado H1 em uma placa de poço profundo de 2ml. O poço A1 continha 6 ul de 0,3 mg/ml de intermediário padrão e 1794 ul de SCB em 16 placas de análise. Esse processo foi repetido para o poço H1. As diluições em série foram preparadas ao aprisionar 900 ul de solução nos poços e adicionar 900 ul de SCB a cada uma das 16 placas de análise. Foram distribuídos 50 ul das diluições por poço padrão.

2. Preparação de Controles

Os controles foram preparados para produzir uma concentração de 120 ug/ml de controle intermediário. Resumidamente, 6 ul de 32,5 mg/ml de padrão de referência e 1619 ul de Meio R5CD1 foram misturados. As diluições de 1:40 foram preparadas ao misturar 5 ul de 120ug/ml de controle intermediário e 195 ul de Tampão de Análise, enquanto que as diluições de 1:400 foram preparadas ao misturar 20 ul de controle diluído de 1:40 e 180 ul de Tampão de Análise. As diluições de diluição 1:1200 foram preparadas ao obter 80 ul de controle diluído 1:400 e misturar em 160 ul de Tampão de Análise a cada duas placas de análise. As diluições 1:1200 foram distribuídas em quantidades de 50 ul por 0,1 poço de controle.

Ademais, os controles que contêm 0,01 µg/ml de controle foram preparados ao misturar 150 ul de 120 ug/ml de controle intermediário em (preparado como descrito acima) 1350 ul de Meio. A diluição 1:40 foi preparada ao misturar 5 ul de 12ug/ml de controle intermediário em 195 ul de Tampão de Análise. A diluição 1:400 foi preparada ao misturar 20 ul de controle diluído 1:40 em 180 ul de Tampão de Análise e a diluição 1:1200 foi preparada ao misturar 80 ul de controle diluído 1:400 em 160 ul de Tampão de Análise /2 placas de análise. Os controles foram distribuídos em alíquotas de 50 ul de controle diluído 1:1200 por 0,01 poço de controle.

2. Preparação de Fragmento F(ab')₂ Marcado por ORI

A preparação de fragmento F(ab')₂ Anti-Fc marcado por ORI (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, PA) foi realizada utilizando o seguinte protocolo. Resumidamente, 50 µl de DMSO foram adi-

cionados a um frasco de éster ORITAG NHS (BioVeris, Gaithersburg, MD). A mistura foi turbilhonada no ajuste máximo até ORITAG no fundo do frasco se dissolver. Então, 1638 µl de anticorpo IgG de cabra Anti-Humano de Fragmento F(ab')₂ affiniPure foram adicionados a 50 µl de éster ORITAG NHS dissolvido a 1638 ul. A mistura foi turbilhonada e incubada em temperatura ambiente durante 60 minutos em um invólucro escuro. O frasco foi girado sobre um oscilador durante a incubação.

A reação foi interrompida ao adicionar 20 µl de 2M de glicina, e o tubo foi envolvido com uma folha metálica e incubado durante 10 minutos em temperatura ambiente. Durante a incubação, duas colunas PD10 (Pharmacia, Piscataway, NJ) com PBS foram equilibradas com 0,1% de NaN₃ e usadas de acordo com o protocolo do fabricante. Os tubos de reação foram centrifugados durante 5 segundos para coletar todo o volume no tubo. Então, 854 ul da reação foram adicionados a cada coluna PD10. As amostras foram carregadas nas colunas e eventualmente 8 tubos de alíquotas de 0,5 ml foram coletados de cada coluna.

A concentração de proteína foi determinada pelo kit BCA Protein Assay. Ademais, o anticorpo restante não-marcado da segunda etapa foi usado como padrão para determinar a concentração de proteína. A absorvância das amostras de proteína foi medida em 455 nm.

As frações com concentrações de proteína apropriadas e boa razão de ORI-TAG: Proteína foram acumuladas. A albumina de soro bovino foi adicionada ao frasco final para formar 1% de soluções BSA. Os frascos foram armazenados a 40 °C.

25 3. Preparação e Reação de Amostra de Linhagem Celular

Uma diluição de 1:40 foi preparada ao misturar 5 ul de uma amostra de uma linhagem celular que gera GP1bα, IL13R, anticorpo anti-CD22, anticorpo anti-Lewis Y, anticorpo anti-Aβ, ou proteína de fusão TNFR e 195 ul de Tampão de Análise, enquanto uma diluição 1:400 de amostra foi preparada ao misturar 20 ul de amostra diluída 1:40 e 180 ul de Tampão de Análise. Por fim, uma diluição de 1:1200 foi preparada obtendo 70 ul de amostras diluídas 1:400 e misturando as amostras com 140 ul Tampão de

Análise. Essa diluição final foi distribuída em 50 µl a cada poço de amostra. 1:400 também foram distribuídos nos poços de amostra em outra placa de análise.

5 O fragmento $F(ab')_2$ marcado foi distribuído em alíquotas de 5350 µl que compreendem 6 µl de fragmento $F(ab')_2$ em 5344 µl de Tampão a cada placa de análise. Havia 50 µl de solução por poço.

As microesferas de proteína A foram obtidas junto a Dynal Bio-
tech (Carlsbad, CA). As microesferas foram distribuídas em 30 µl de quanti-
dades em 5 ml de tampão de análise por placa. As soluções foram distribuí-
10 das em volumes de 50 µl por poço.

Todos os reagentes e amostras foram distribuídos às placas
como se segue: O padrão de carga, controle, e amostras, primeiramente,
foram carregados nos poços. Então, o fragmento $F(ab')_2$ marcado por ORI
anti-Fc foi carregado. Por fim, as microesferas de Proteína A foram carrega-
15 das.

A mistura foi incubada durante 2 horas em temperatura ambiente
com mistura, e estudada no analisador M8 ou M384 com o método "FcHu-
man150."

4. Análise de Dados

20 As Diretrizes de Aceitação Padrão (Standard Acceptance Guide-
lines) usadas para os experimentos foram ao menos 8 dentre 10 padrões o
CV das leituras entre as réplicas de ponto padrão deveriam ser cerca de
20%. Ademais, as Diretrizes de Aceitação de Controle devem estar dentro
de 80 a 120 %. Também, as Diretrizes de Aceitação de Amostra requerem
25 que o CV das leituras entre as réplicas de amostra seja cerca de 20%. Ape-
nas as leituras que estão dentro dessas faixas foram levadas em considera-
ção

5. Resultados

A marcação do fragmento $F(ab')_2$ com rutênio direcionado contra
30 PSGL mostrou um sinal significativamente maior às razões de ruído (figura
2). Os dados de 0,1 µg/ ml e 0,4 µg/ ml de fragmentos $F(ab')_2$ foram normali-
zados contra ruído e colocados sobre o gráfico de barras. Os fragmentos

F(ab')₂ de Jackson 1, Jackson 2, Rockland 1 e Southern Biotech aumentaram as razões de sinal para ruído quando marcados com rutênio (figura 2). Esses experimentos foram confirmados utilizando fragmentos F(ab')₂ direcionados contra anti-CD22 (figura 3).

5 Esses resultados foram adicionalmente detalhados em experimentos utilizando fragmentos F(ab')₂ direcionados contra as proteínas de fusão Fc GP1b α , receptor IL13, e proteína de fusão TNFR (figura 4). O gráfico mostra que à medida que a concentração das proteínas de fusão alvo aumenta, a detecção das proteínas com os fragmentos F(ab')₂ aumenta (figura 4). Resultados similares também foram obtidos utilizando anticorpos
10 anti-GDF8, anti-CD22, e anti-Lewis Y como o alvo em vez das proteínas de fusão Fc (figura 5).

Ao utilizar os fragmentos F(ab')₂ marcados para identificar a quantidade de proteína em uma amostra, a metodologia de seleção de título
15 foi testada contra os procedimentos de coluna padrão, tal como, HPLC. Os resultados mostraram que a metodologia de seleção de título obteve uma taxa muito mais rápida do que a cromatografia HPLC para determinar o título das proteínas (figura 6). O tempo requerido para obter as leituras de quantidade de proteína foi mais de 10 vezes maior utilizando HPLC comparada
20 com a seleção de título de alto rendimento quando acima de até 700 amostras foram analisadas (figura 6).

Além de a seleção de alto rendimento ser mais rápida do que os procedimentos em coluna padrão, essa é bastante precisa ao determinar a quantidade de proteína (figuras 7, 9, 10 e 11). Quando HPLC e os procedimentos de seleção de título detalhados acima forem comparados, quantida-
25 des de título quase idênticas foram identificadas em proteína anti-Lewis Y, PSGL, anti-A β , e proteína de fusão TNFR (figuras 7, 9, 10 e 11). Consequentemente, o teste de seleção de título detalhado aqui foi mais rápido e apresentou eficácia similar às técnicas em coluna padrão para determinar a
30 quantidade de proteína.

A seleção de alto rendimento utilizada acima foi capaz de identificar linhagens celulares que expressam a quantidade de anticorpo apropria-

da (figura 8). Como mostrado na figura 8, a seleção de título de alto rendimento permitida para a identificação dos maiores produtores do anticorpo de interesse, que é indicada pelo título crescente ($\mu\text{g}/\text{ml}$) por clone. Nesses experimentos, o clone de título superior está com o número 1, o segundo clone de título superior está com número dois, e assim por diante. Portanto, os clones superiores foram rapidamente identificados pela análise.

Exemplo 2

Purificação e Identificação de Alto rendimento de Condições de Cultura Celular Adequadas

1. Purificação Manual de Proteínas Utilizando Centrifugação

O procedimento de seleção de título de alto rendimento do Exemplo 1 pode estar associado ao procedimento de purificação de alto rendimento detalhado abaixo para aprimorar o desenvolvimento potencial de desenvolvimento de cultura celular.

A resina fina surgiu em 20% de Etanol. A solução de 20% de Etanol Adicional foi adicionada para constituir 50% do volume determinado. A solução foi cuidadosamente misturada e dispensada em alíquotas de 200 μL por poço de uma placa de filtro (Whatman 7700-2804, long drip, 25 μm , 96 poços x 800 μL , Whatman LabSciences, Orange, NJ). As placas de filtro foram empilhadas em cima de microplacas vazias (Corning/Costar, Corning, NY), e centrifugadas (Sorvall Legend RT) durante 3 min a 700 rpm (aproximadamente igual a 104 G) para remover os 20% de Etanol. Então, 200 μL por poço de água RODI foram adicionados, e as placas foram centrifugadas durante 3 minutos sobre microplacas vazias. Esse processo foi repetido duas vezes.

O tampão de lavagem foi adicionado a alíquotas de 200 μL por poço. As placas foram centrifugadas durante 3 minutos sobre microplacas vazias. Esse processo foi repetido mais duas vezes. Quando todas as amostras atingirem ao menos 170 $\mu\text{g}/\text{mL}$, a diluição mínima foi realizada para que os títulos do mesmo conjunto de amostras estejam aproximadamente na mesma faixa ($\pm 20\%$). As amostras foram diluídas para ficarem próximas à concentração mais baixa. Qualquer amostra sob 170 $\mu\text{g}/\text{mL}$ foi carregada

mais de uma vez. Quando o carregamento múltiplo for requerido, as amostras são diluídas apenas para garantir que a massa total de proteína carregada fique na mesma faixa (+/- 20%). Quando o carregamento múltiplo for realizado, as amostras requeridas foram adicionadas primeiro e adicionadas
5 nos poços vazios de 200 uL de tampão de lavagem. As placas de filtro foram centrifugadas conforme necessário.

Todas as amostras foram carregadas juntamente com os reforços de material de referência e amostras padrão de meio como de costume. As amostras foram carregadas na resina de Proteína A (Proteína A Mab Select, Amersham Biosciences) em um volume de carga de 500 uL. Um padrão
10 de reforço foi preparado em meio com a concentração próxima ao conjunto total de amostras de teste. O material de reforço e amostra padrão em meio foram carregados em 500ul/poço.

A resina foi ressuspensa com a amostra ao misturar-se com uma
15 pipeta de múltiplos canais. A resina e amostra foram incubadas durante 5 a 10 minutos em temperatura ambiente. A mistura foi então centrifugada a 700 rpm durante 3 minutos, e o fluxo de amostra foi coletado em uma microplaca de poço profundo (Whatman 7710-5750, Whatman LabSciences, Orange, NJ). Então, 200 uL por poço de tampão de lavagem (5 mM de Tris, 20, 50 ou
20 100 mM de NaCl, pH 7,5) foram adicionados e a mistura foi centrifugada durante 3 minutos sobre microplacas vazias. O tampão de lavagem foi adicionado a 200 uL por poço. As amostras foram centrifugadas durante 3 minutos sobre microplacas vazias. Então, 4uL de Tris (2,0 M de Tris, pH 8,5, ou 1,0 M de Tris pH 8,5) foram adicionados à mistura para neutralização à placa de
25 coleta de UV (Corning/Costar, Corning, NY) antes de realizar a eluição. O tampão de eluição (50 mM de Glicina, 20 ou 50 ou 100 mM de NaCl, pH 2,5 ou 3,0) foi adicionado a volumes de 200 uL por poço à placa de filtro. A resina e o tampão de eluição foram misturados com uma pipeta de múltiplos canais. A placa de filtro foi então centrifugada durante 3 minutos sobre a
30 placa de coleta. As placas foram lidas a A280 sobre um leitor de placa Spectra Max (Molecular Devices).

2. Determinações de Qualidade de Proteína Utilizando Cromatografia em

Coluna

Para teste CEX: A eluição foi transferida em alíquotas de 50 uL em uma placa Agilent que contém 100 uL de CEX em fase móvel A. A solução foi misturada. Os procedimentos de purificação em coluna foram realizados utilizando procedimentos padrão.

Para teste SEC: A eluição foi transferida em volumes de 130 uL para uma placa Agilent. A solução foi misturada. Os procedimentos de purificação em coluna foram realizados utilizando procedimentos padrão.

Para teste baseado em HIC e ácido siálico: Quatro microlitros de 2M de Tris foram adicionados à placa de UV e diretamente eluídos em placa de UV. A solução foi misturada e analisada em A_{280} sobre um leitor de placa Spectra Max.

3. Resultados

Também, a purificação de alto rendimento de amostras utilizando as técnicas acima permitiu uma purificação rápida de até 96 amostras por placa. As técnicas de purificação produziram uma purificação rápida de amostras sem uma redução no nível de purificação (figura 12 e 13). Como determinado pela quantidade de proteína de alto peso molecular presente em cada amostra, as técnicas de purificação de alto rendimento bem como outras técnicas (figuras 12 e 13). Em particular, quando se compara a purificação de alto rendimento com a purificação de Proteína A padrão (figuras 12 e 13).

Ademais, a quantidade de proteína de alto peso molecular foi usada para determinar a qualidade da proteína gerada por células que se desenvolvem em condições de cultura celular diferentes (figura 14). Como mostrado na figura 14, os vários meios testados mostraram quantidades diferentes de proteína de alto peso molecular após a purificação que pareciam ser dependentes do meio. Em particular, certas condições de meio mostraram estatisticamente aprimoramentos significativos na quantidade de proteína de alto peso molecular quando comparadas com outros meios (figura 14, setas grandes). Portanto, o procedimento de desenvolvimento de processo de cultura celular utilizado acima identificou o meio que mostrou característi-

cas de crescimento aprimoradas para purificação a jusante.

Equivalentes

- Os elementos versados na técnica irão reconhecer, ou ser capazes de verificar, utilizando apenas a experimentação comum, inúmeros equivalentes às composições e procedimentos específicos descritos aqui. Tais equivalentes são considerados para estarem dentro do escopo dessa invenção, e são cobertos pelas seguintes reivindicações.
- 5

REIVINDICAÇÕES

1. Método de seleção de alto rendimento de linhagens celulares para expressão protéica, que compreende:

- 5 a) selecionar amostras obtidas de linhagens celulares para determinar o nível de expressão de uma proteína de interesse em cada linhagem celular ao colocar as amostras em contato com um primeiro agente de ligação;
- b) colocar a proteína de interesse em contato com um segundo agente de ligação ligado de maneira operável a um marcador detectável;
- 10 c) determinar o nível de expressão da proteína de interesse;
- d) determinar a qualidade apropriada da proteína de interesse;
- e) selecionar a linhagem celular de expressão protéica de alto rendimento da proteína de interesse;

onde uma linhagem celular é selecionada se a linhagem celular produzir um
15 nível desejado de expressão e a qualidade apropriada da proteína de interesse.

2. Método, de acordo com a reivindicação 1, em que a proteína de interesse é selecionada do grupo que consiste em anticorpos, ligantes, receptores, subunidades de proteínas, fragmentos de proteínas, proteínas de fusão, proteínas recombinantes, e fragmentos desses.
20

3. Método, de acordo com a reivindicação 2, em que a proteína de interesse é um anticorpo, um anticorpo recombinante, ou um fragmento F(ab')₂.

4. Método, de acordo com a reivindicação 1, em que o primeiro
25 agente de ligação é selecionado do grupo que consiste em anticorpos, ligantes, receptores, proteínas de fusão, subunidades de proteínas, proteínas recombinantes, e fragmentos desses.

5. Método, de acordo com a reivindicação 4, em que o primeiro agente de ligação é Proteína A ou estreptavidina.

30 6. Método, de acordo com a reivindicação 4, em que o primeiro agente de ligação pode ser ligado a um suporte sólido selecionado do grupo que consiste em microesferas, placas, e chips de microarranjo.

7. Método, de acordo com a reivindicação 6, em que o suporte sólido compreende celulose, sefarose, poliacrilamida, vidro ou poliestireno.

8. Método, de acordo com a reivindicação 1, em que uma qualidade apropriada da proteína de interesse é selecionada do grupo que consiste em carga, tamanho, atividade enzimática, interação anticorpo-epítopo, ligação de ácido nucléico, teor de carboidrato, estrutura secundária, estrutura terciária, e atividade de ligação.

9. Método, de acordo com a reivindicação 1, em que o segundo agente de ligação é selecionado do grupo que consiste em anticorpos, ligantes, receptores, proteínas de fusão, subunidades de proteínas, proteínas recombinantes, e fragmentos desses.

10. Método, de acordo com a reivindicação 9, em que o segundo agente de ligação é um anticorpo ou fragmentos desse.

11. Método, de acordo com a reivindicação 10, o anticorpo é um fragmento $F(ab')_2$.

12. Método, de acordo com a reivindicação 11, em que o fragmento $F(ab')_2$ se liga especificamente à parte F_c de um anticorpo.

13. Método, de acordo com a reivindicação 1, em que o segundo agente de ligação marcado com rutênio é marcado com um segundo marcador detectável selecionado do grupo que consiste em fluoróforos, corantes químicos, agentes de ligação radioativos, agentes de ligação quimiluminescentes, agentes eletroquimiluminescente, agentes de ligação magnética, agentes de ligação paramagnética, agentes de ligação promagnética, enzimas que produzem um produto colorido, enzimas que produzem um produto quimiluminescente, e enzimas que produzem um produto magnético

14. Método, de acordo com a reivindicação 12, em que o fragmento $F(ab')_2$ é ligado de maneira operável a dois ou mais marcadores à base de rutênio.

15. Método, de acordo com a reivindicação 1, em que as amostras entram em contato por meio de um terceiro agente de ligação ligado a uma resina.

16. Método, de acordo com a reivindicação 15, em que o terceiro

agente de ligação é selecionado do grupo que consiste em anticorpos, ligantes, receptores, proteínas de fusão, subunidades de proteínas, proteínas recombinantes, e fragmentos desses.

17. Método, de acordo com a reivindicação 16, em que o terceiro
5 agente de ligação é Proteína A ou estreptavidina.

18. Método, de acordo com a reivindicação 17, em que o terceiro agente de ligação é ligado a um suporte sólido.

19. Método, de acordo com a reivindicação 1, em que a resina é isolada da mistura e a proteína de interesse expressa é eluída a partir do
10 terceiro agente de ligação.

20. Método, de acordo com a reivindicação 19, em que a proteína de interesse é eluída por um método selecionado do grupo que consiste em eluição a vácuo e fluxo de gravidade.

21. Método, de acordo com a reivindicação 1, em que as linhagens celulares são selecionadas utilizando uma estação de trabalho automática.
15

22. Método de seleção de alto rendimento de linhagens celulares para expressão e produção protéica, que compreende:

a) colocar um suporte sólido em contato com uma amostra isolada de uma linhagem celular, sendo que o suporte sólido possui um primeiro agente de ligação ligado à sua superfície, sendo que o primeiro agente de
20 ligação é capaz de se ligar a uma proteína de interesse;

b) colocar a amostra em contato com um segundo agente de ligação que se liga à proteína de interesse, sendo que o segundo agente de
25 ligação é ligado de maneira operável a um marcador detectável;

c) determinar o nível de expressão da proteína de interesse ao detectar o marcador ligado de maneira operável ao segundo agente de ligação que é ligado à proteína de interesse; e

d) comparar o nível de expressão da proteína de interesse em
30 cada linhagem celular com o nível médio de expressão da proteína de interesse e selecionar a linhagem celular com base na comparação,

em que a linhagem celular é selecionada em termos de produ-

ção de proteína se o nível de expressão da proteína de interesse na linhagem celular for maior ou menor que o nível médio de expressão da proteína de interesse em todas as linhagens celulares.

5 23. Método, de acordo com a reivindicação 22, que compreende adicionalmente isolar os sobrenadantes das linhagens celulares selecionadas, e colocar os sobrenadantes em contato com um reagente que se liga à proteína de interesse.

24. Método, de acordo com a reivindicação 23, em que o reagente é ligado a um suporte sólido.

10 25. Método, de acordo com a reivindicação 24, em que o suporte sólido é uma placa de múltiplos poços.

26. Método, de acordo com a reivindicação 23, em que a proteína de interesse ligada é eluída do reagente e avaliada em termos de qualidade apropriada.

15 27. Método, de acordo com a reivindicação 26, em que a linhagem celular é selecionada em termos de expressão protéica se a linhagem celular for selecionada na etapa e), e a proteína de interesse expressa possui a qualidade apropriada.

20 28. Método, de acordo com a reivindicação 22, em que a proteína de interesse é selecionada do grupo que consistem em anticorpos, ligantes, receptores, subunidades de proteínas, fragmentos de proteínas, proteínas de fusão, proteínas recombinantes, e fragmentos desses.

25 29. Método, de acordo com a reivindicação 28, em que a proteína de interesse é um anticorpo, um anticorpo recombinante, ou um fragmento F(ab')₂.

30 30. Método, de acordo com a reivindicação 22, em que o primeiro agente de ligação é selecionado do grupo que consiste em anticorpos, ligantes, receptores, proteínas de fusão, subunidades de proteínas, proteínas recombinantes, e fragmentos desses.

31. Método, de acordo com a reivindicação 30, em que o primeiro agente de ligação é Proteína A ou estreptavidina.

32. Método, de acordo com a reivindicação 22, em que os agen-

tes de ligação podem ser ligados a um suporte sólido selecionado do grupo que consiste em microesferas, placas, e chips de microarranjo.

33. Método, de acordo com a reivindicação 24, em que o suporte sólido compreende celulose, sefarose, poliacrilamida, vidro, ou poliestireno.

5 34. Método, de acordo com a reivindicação 22, em que o segundo agente de ligação é selecionado do grupo que consiste em anticorpos, ligantes, receptores, proteínas de fusão, subunidades de proteínas, proteínas recombinantes, e fragmentos desses.

35. Método, de acordo com a reivindicação 34, em que o segundo agente de ligação é um anticorpo ou fragmentos desse.

36. Método, de acordo com a reivindicação 35, em que o anticorpo é um fragmento F(ab')₂.

37. Método, de acordo com a reivindicação 35, em que o anticorpo é um fragmento F(ab')₂ que se liga especificamente à parte Fc de um anticorpo.

38. Método, de acordo com a reivindicação 22, em que o marcador detectável é selecionado do grupo que consiste em fluoróforos, corantes químicos, agentes de ligação radioativos, agentes de ligação quimiluminescentes, agentes eletroquimiluminescentes, agentes de ligação magnética, agentes de ligação paramagnética, agentes de ligação promagnética, enzimas que produzem um produto colorido, enzimas que produzem um produto quimiluminescente, e enzimas que produzem um produto magnético.

39. Método, de acordo com a reivindicação 38, em que o marcador detectável é rutênio.

25 40. Método, de acordo com a reivindicação 22, em que um reagente compreende uma resina que possui um terceiro agente de ligação ligado a essa, sendo que o terceiro agente de ligação é capaz de se ligar à proteína de interesse.

41. Método, de acordo com a reivindicação 40, em que o terceiro agente de ligação é selecionado do grupo que consiste em anticorpos, ligantes, receptores, proteínas de fusão, subunidades de proteínas, proteínas recombinantes, e fragmentos desses.

42. Método, de acordo com a reivindicação 41, em que o terceiro agente de ligação é Proteína A ou estreptavidina.

43. Método, de acordo com a reivindicação 40, em que a resina é isolada, e a proteína de interesse é eluída a partir do terceiro agente de
5 ligação.

44. Método, de acordo com a reivindicação 43, em que a proteína de interesse é eluída a partir do terceiro agente de ligação utilizando um método selecionado do grupo que consiste em eluição a vácuo e fluxo de gravidade.

10 45. Método, de acordo com a reivindicação 22, em que a seleção das linhagens celulares incubadas utiliza uma estação de trabalho automática.

46. Método para desenvolvimento de processo de cultura celular, que compreende:

15 a) incubar cada linhagem celular em uma condição de cultura celular diferente;

b) colocar cada amostra de linhagem celular em contato com o primeiro agente de ligação ligado a um suporte sólido, sendo que o primeiro agente de ligação se liga a uma proteína de interesse nas amostras de
20 linhagem celular;

c) colocar a proteína de interesse ligada pelo primeiro agente de ligação em contato com um segundo agente de ligação, que é ligado de maneira operável a um marcador detectável;

25 d) determinar o nível de expressão da proteína de interesse ao detectar o marcador ligado de maneira operável ao segundo agente de ligação que é ligado à proteína de interesse; e

e) selecionar a linhagem celular baseada no nível detectado de expressão da proteína de interesse,

30 em que uma linhagem celular é selecionada se o nível de expressão da proteína de interesse na linhagem celular for maior ou menor que o nível médio de expressão da proteína de interesse em todas as linhagens celulares.

47. Método, de acordo com a reivindicação 46, que compreende adicionalmente isolar os sobrenadantes das linhagens celulares selecionadas, e colocar os sobrenadantes em contato com um reagente que se liga à proteína de interesse.

5 48. Método, de acordo com a reivindicação 47, em que o reagente é ligado a um suporte sólido.

49. Método, de acordo com a reivindicação 48, em que o suporte sólido é uma placa de múltiplos poços.

10 50. Método, de acordo com a reivindicação 47, em que a proteína de interesse ligada é eluída a partir do reagente e avaliada em termos de qualidade apropriada.

15 51. Método, de acordo com a reivindicação 50, em que a linhagem celular é selecionada em termo de expressão protéica se a linhagem celular for selecionada na etapa e), e a proteína de interesse expressa possui a qualidade apropriada.

52. Método, de acordo com a reivindicação 46, em que a proteína de interesse é selecionada do grupo que consiste em anticorpos, ligantes, receptores, subunidades de proteínas, fragmentos de proteínas, proteínas de fusão, proteínas recombinantes, e fragmentos desses.

20 53. Método, de acordo com a reivindicação 52, em que a proteína de interesse é um anticorpo, um anticorpo recombinante, ou um fragmento F(ab')₂.

25 54. Método, de acordo com a reivindicação 46, em que o primeiro agente de ligação é selecionado do grupo que consiste em anticorpos, ligantes, receptores, proteínas de fusão, subunidades de proteínas, proteínas recombinantes, e fragmentos desses.

55. Método, de acordo com a reivindicação 54, em que o primeiro agente de ligação é Proteína A ou estreptavidina.

30 56. Método, de acordo com a reivindicação 46, em que os agentes de ligação podem ser ligados a um suporte sólido selecionado do grupo que consiste em microesferas, placas, e chips de microarranjo.

57. Método, de acordo com a reivindicação 48, em que o suporte

sólido compreende celulose, sefarose, poliacrilamida, vidro ou poliestireno.

58. Método, de acordo com a reivindicação 46, em que o segundo agente de ligação é selecionado do grupo que consiste em anticorpos, ligantes, receptores, proteínas de fusão, subunidades de proteínas, proteínas recombinantes, e fragmentos desses.

59. Método, de acordo com a reivindicação 58, em que o segundo agente de ligação é um anticorpo ou fragmentos desse.

60. Método, de acordo com a reivindicação 59, em que o anticorpo é um fragmento $F(ab')_2$.

61. Método, de acordo com a reivindicação 59, em que o anticorpo é um fragmento $F(ab')_2$ que se liga especificamente à parte F_c de um anticorpo.

62. Método, de acordo com a reivindicação 46, em que o marcador detectável é selecionado do grupo que consiste em fluoróforos, corantes químicos, agentes de ligação radioativos, agentes de ligação quimiluminescentes, agentes eletroquimiluminescentes, agentes de ligação magnética, agentes de ligação paramagnética, agentes de ligação promagnética, enzimas que produzem um produto colorido, enzimas que produzem um produto quimiluminescente, e enzimas que produzem um produto magnético.

63. Método, de acordo com a reivindicação 62, em que o marcador detectável é rutênio.

64. Método, de acordo com a reivindicação 46, em que um reagente compreende uma resina que se liga a um terceiro agente de ligação ligado a essa, sendo que o terceiro agente de ligação é capaz de se ligar à proteína de interesse.

65. Método, de acordo com a reivindicação 64, em que o terceiro agente de ligação é selecionado do grupo que consiste em anticorpos, ligantes, receptores, proteínas de fusão, subunidades de proteínas, proteínas recombinantes, e fragmentos desses.

66. Método, de acordo com a reivindicação 65, em que o terceiro agente de ligação é Proteína A ou estreptavidina.

67. Método, de acordo com a reivindicação 64, em que a resina

é isolada, e a proteína de interesse é eluída do terceiro agente de ligação.

68. Método, de acordo com a reivindicação 67, em que a proteína de interesse é eluída a partir do terceiro agente de ligação utilizando um método selecionado do grupo que consiste em eluição a vácuo e fluxo de gravidade.
- 5

69. Método, de acordo com a reivindicação 46, em que a seleção das linhagens celulares incubadas utiliza uma estação de trabalho automática.

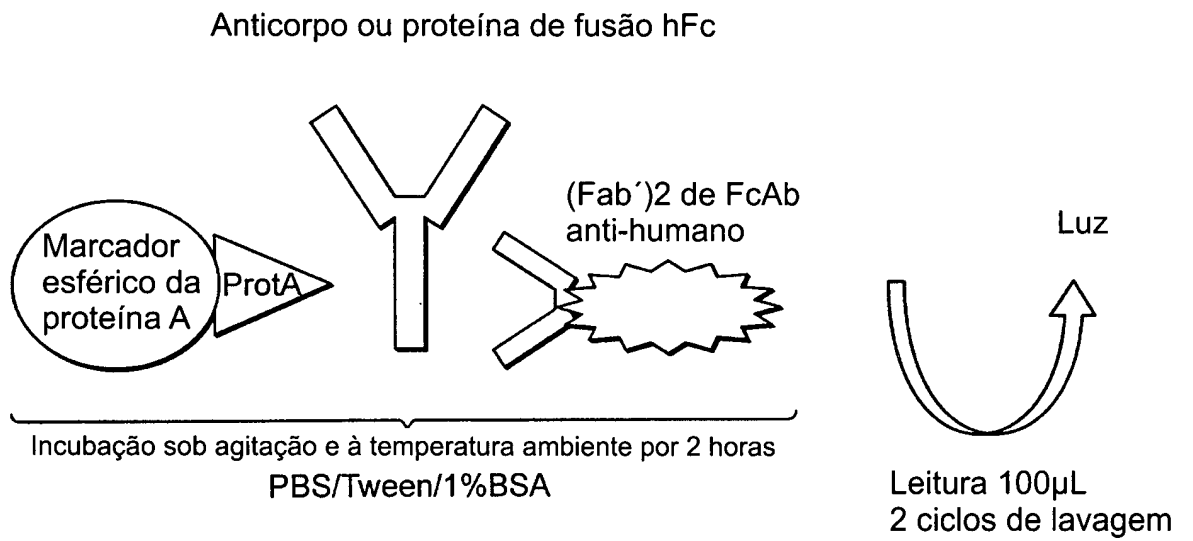


FIG. 1

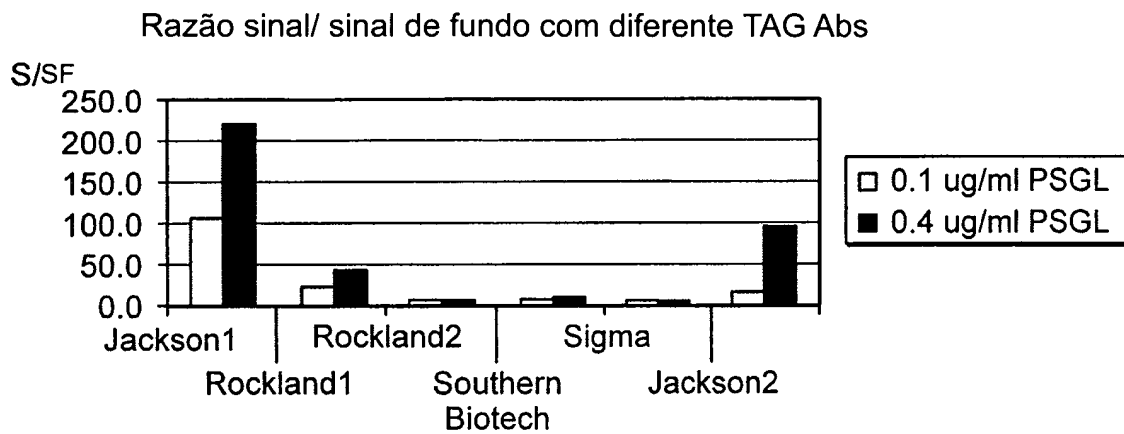


FIG. 2

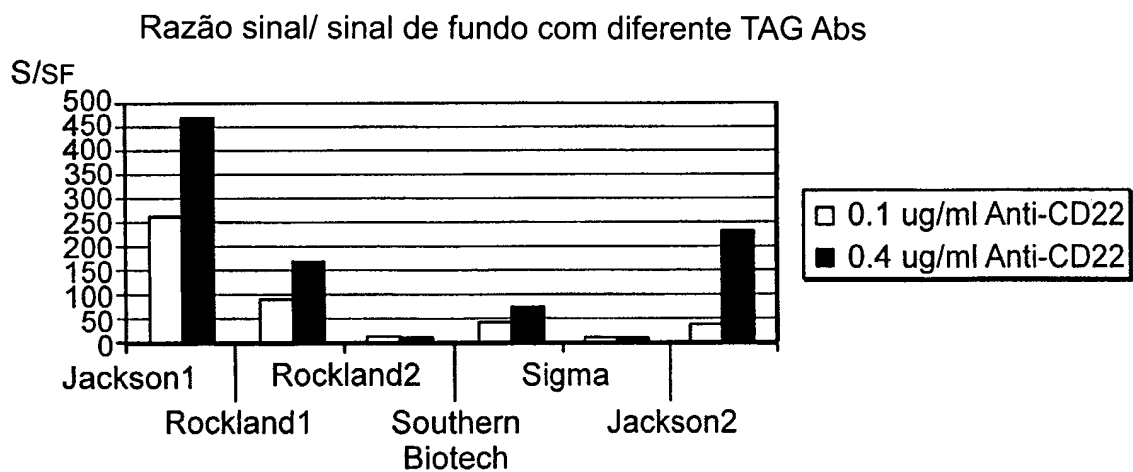
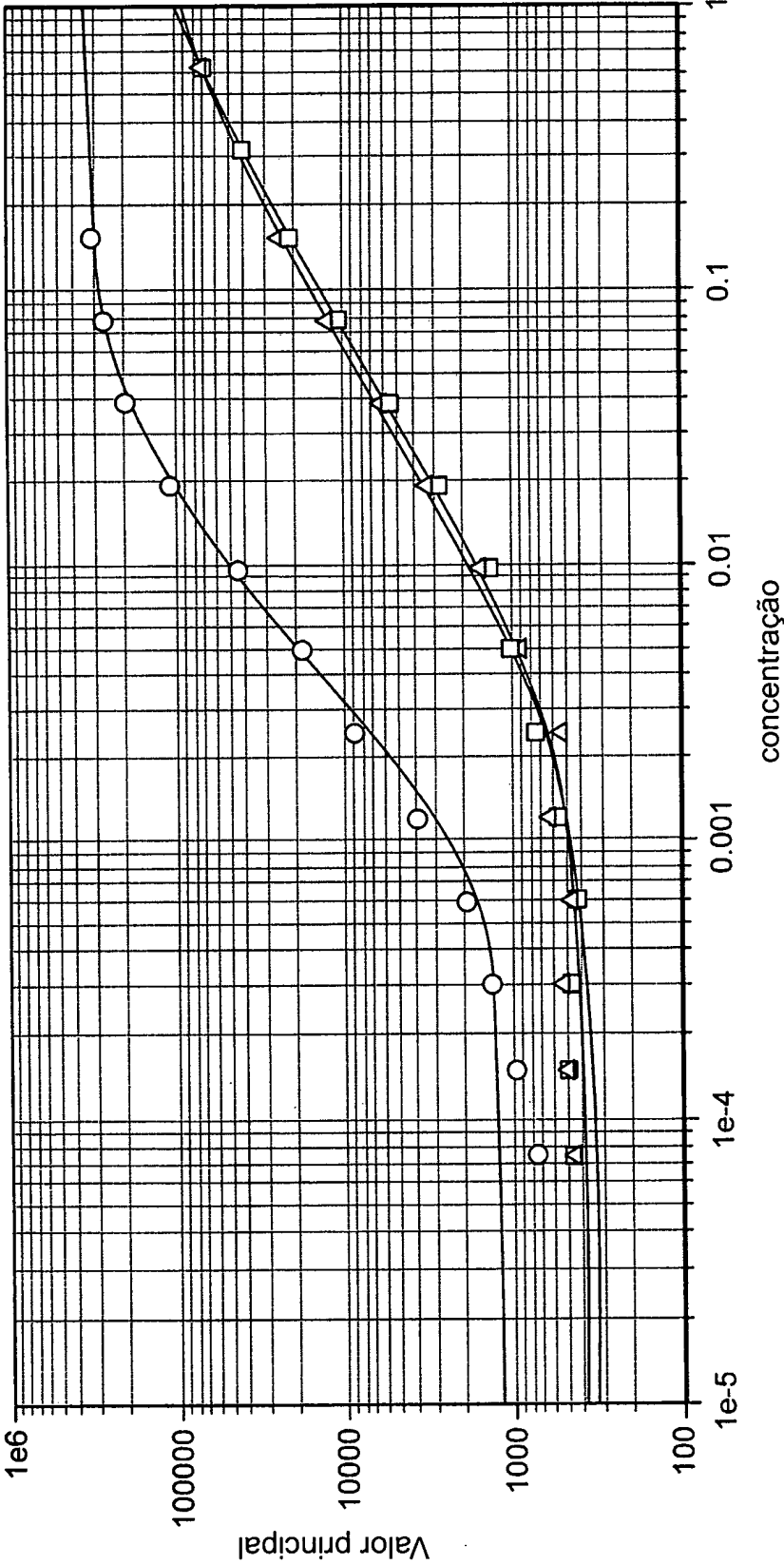


FIG. 3

FIG. 4

Análise de proteína Fc



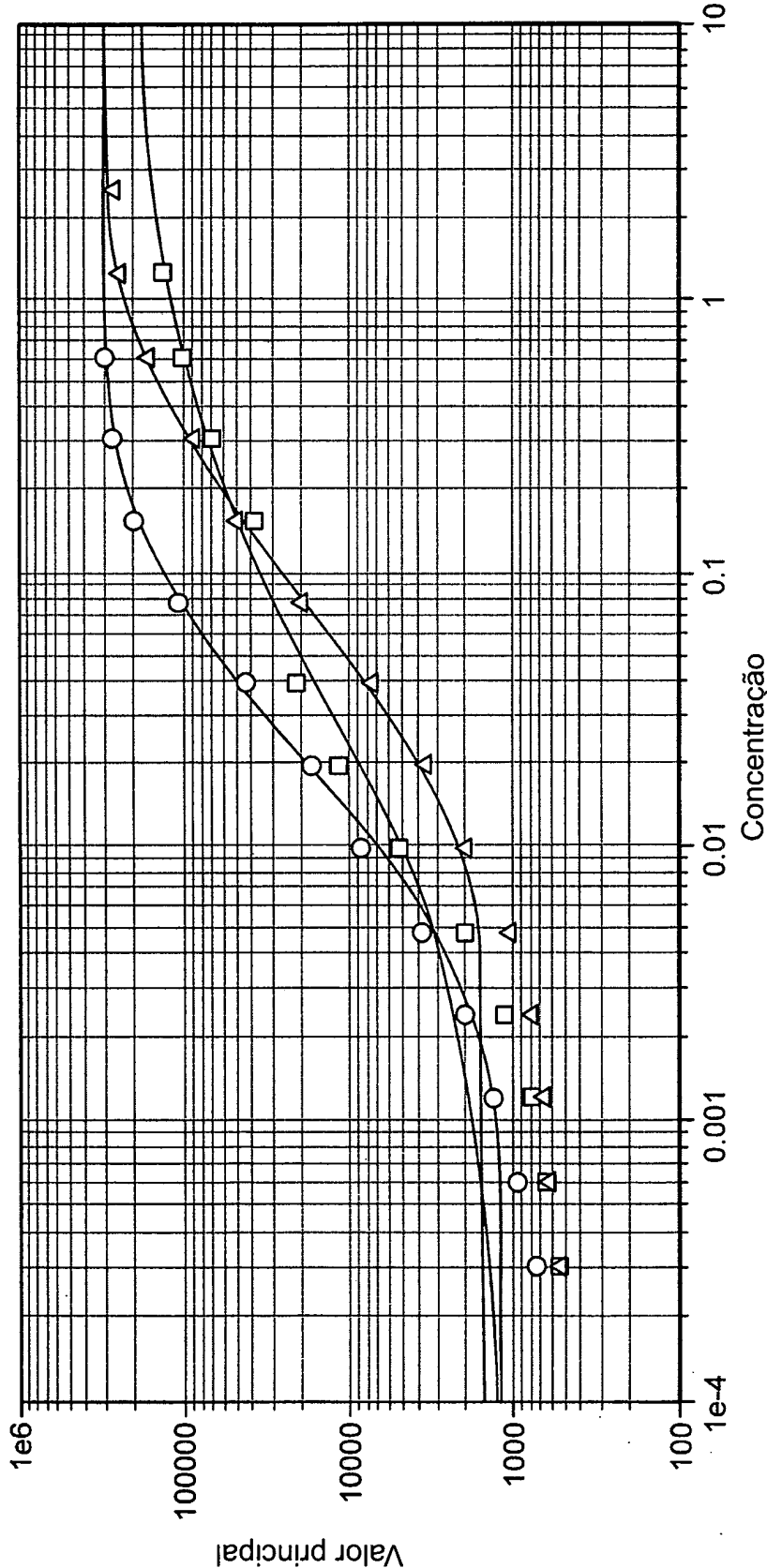
○ GP1b: Concentração x valor principal

□ IL13R: Concentração x valor principal

△ TNFR Proteína de fusão: Concentração x valor principal

FIG. 5

Análise de proteína Fc



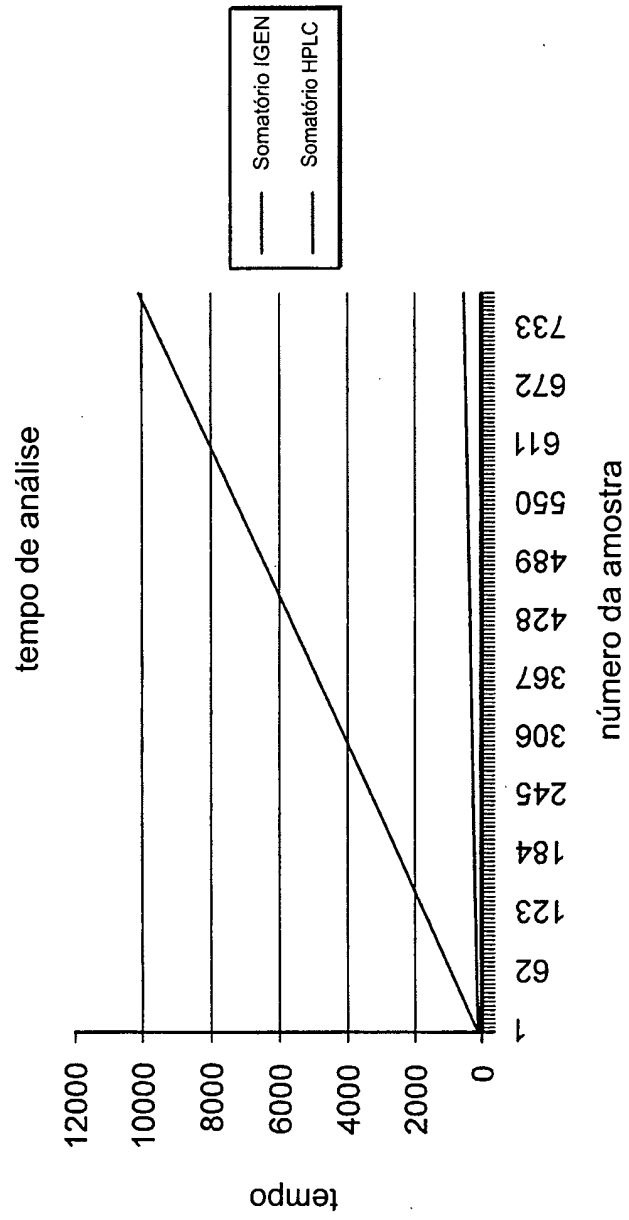


FIG. 6

Comparação da proteína de fusão THFR w/ IGEN e HPLC

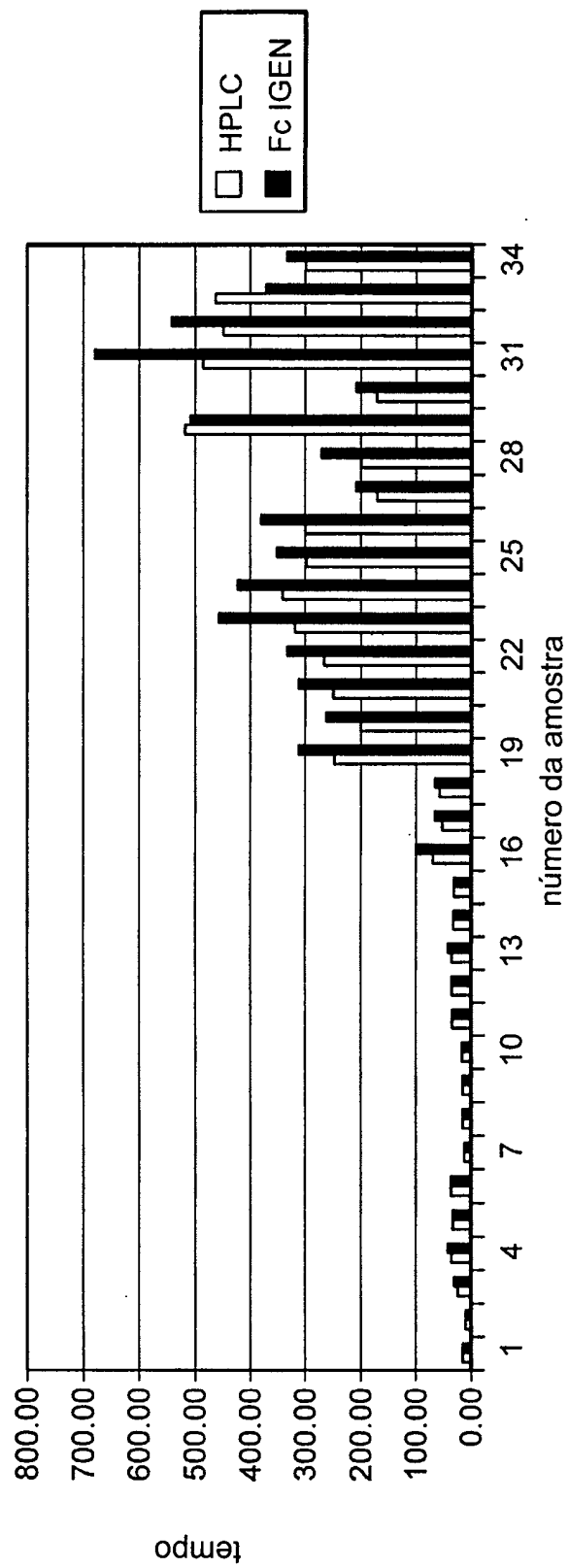


FIG. 7

Comparação de todos os clones na primeira classificação

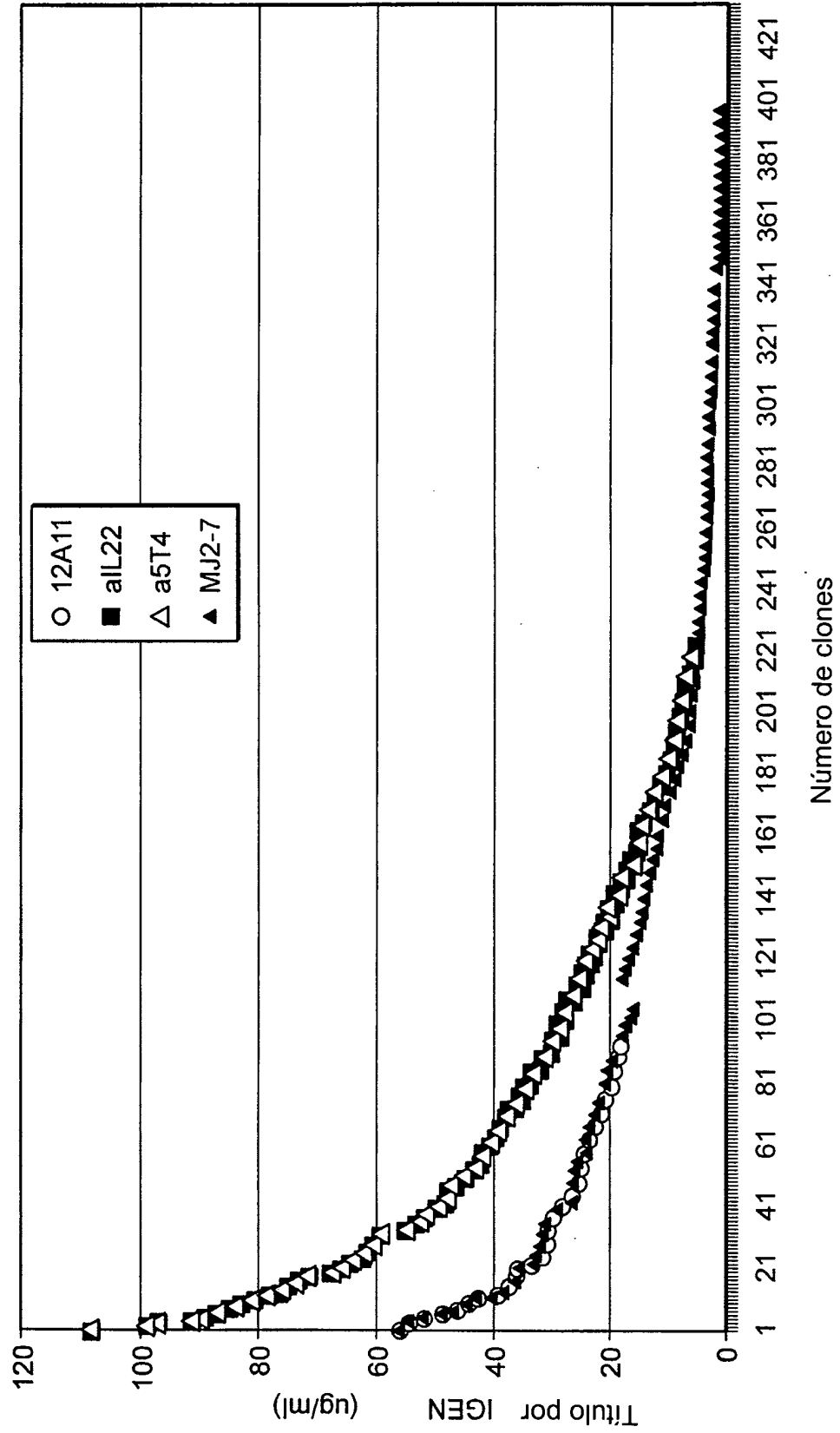


FIG. 8

8/10

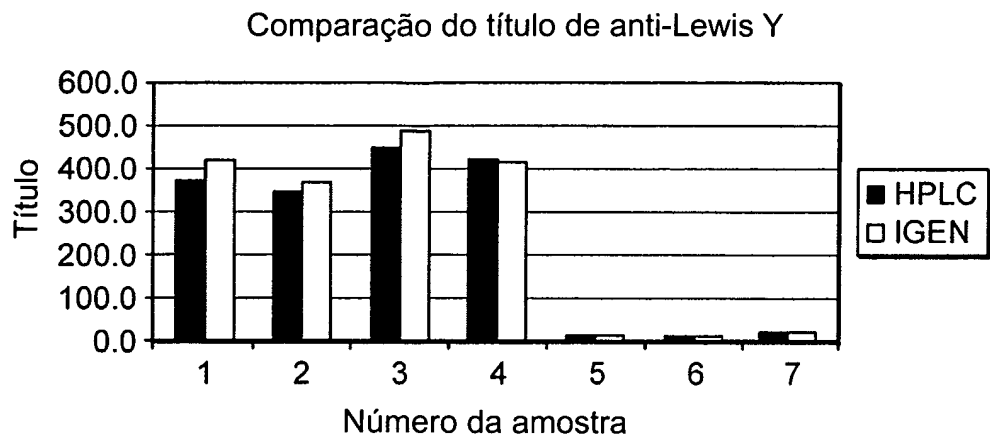


FIG. 9

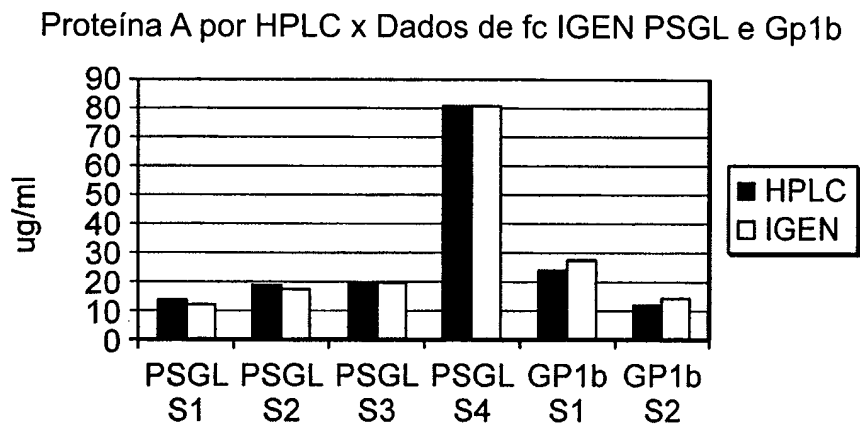


FIG. 10

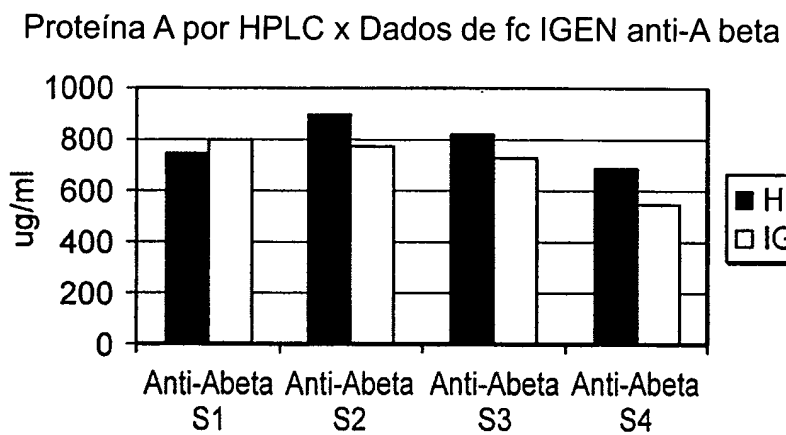


FIG. 11

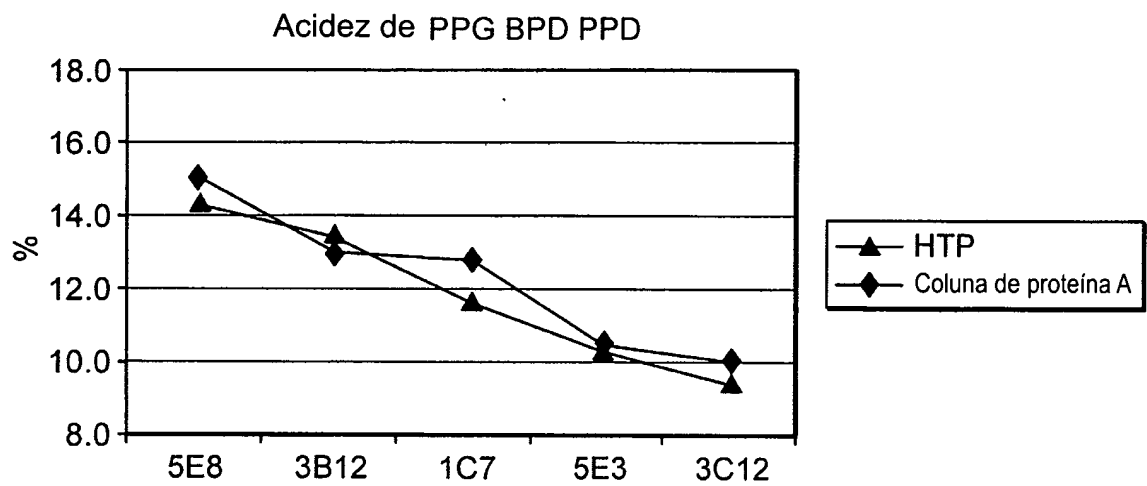


FIG. 12

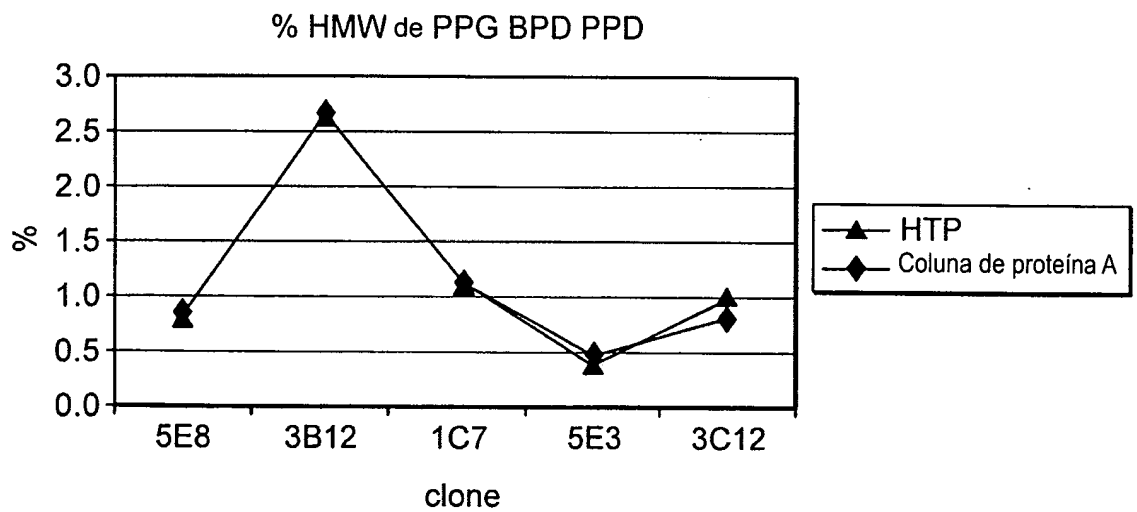


FIG. 13

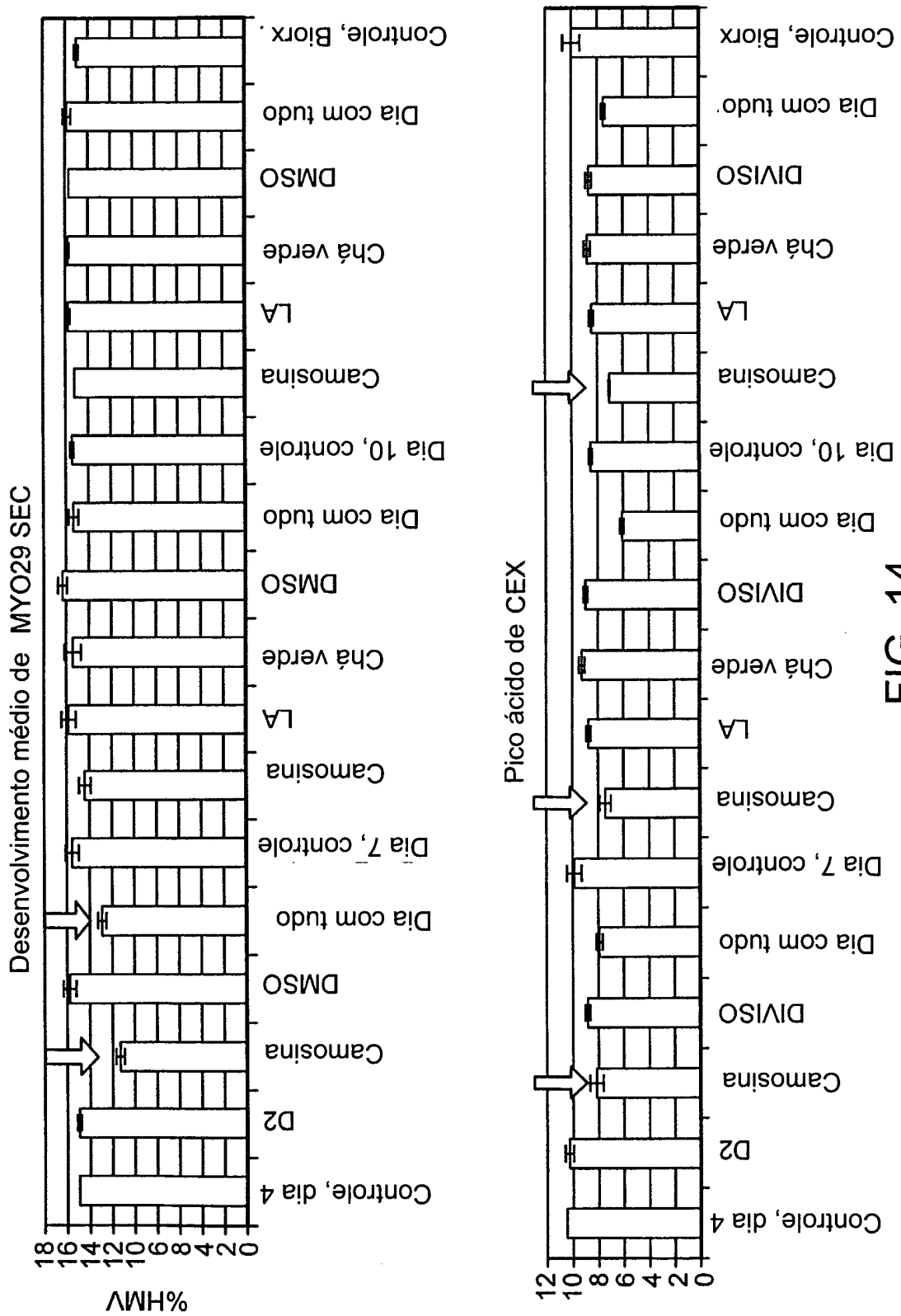


FIG. 14

RESUMO

Patente de Invenção: **"MÉTODOS PARA SELEÇÃO DE ALTO RENDIMENTO DE LINHAGENS CELULARES"**.

Trata-se de métodos de seleção de alto rendimento de linhagens
5 celulares para uso em expressão protéica em alguns processos farmacêuticos, de desenvolvimento de fármaco, e biotecnológicos de modo que as linhagens celulares de alta produtividade sejam identificadas em termos de sua capacidade de produzir tanto níveis desejados de expressão protéica como qualidade apropriada de uma proteína de interesse.