



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

(21) **PI0806367-2 A2**

(22) Data de Depósito: 10/01/2008  
(43) Data da Publicação: 06/09/2011  
(RPI 2122)



(51) *Int.Cl.:*  
A61K 31/198  
C07K 1/30  
C07K 1/36  
C07K 16/00  
C07K 16/28

(54) **Título:** MÉTODOS DE PURIFICAÇÃO DE ANTICORPOS

(30) **Prioridade Unionista:** 22/01/2007 US 60/886,068,  
13/12/2007 US 61/013,446

(73) **Titular(es):** Genentech, Inc.

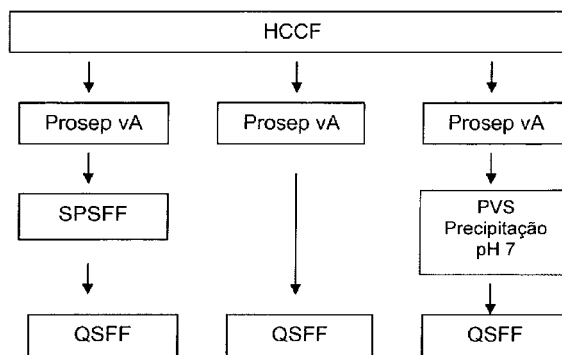
(72) **Inventor(es):** Robert L. Fahrner

(74) **Procurador(es):** Carolina Nakata

(86) **Pedido Internacional:** PCT US2008050747 de  
10/01/2008

(87) **Publicação Internacional:** WO 2008/091740de  
31/07/2008

(57) **Resumo:** MÉTODOS DE PURIFICAÇÃO DE ANTICORPOS. São apresentados métodos para isolar e purificar anticorpos, adicionando um polieletrólito a um fluido de cultura celular, tal como um fluido de cultura de células coletadas, e precipitando o complexo anticorpo-polieletrólito ou um complexo de impurezas do polieletrólito





## **“MÉTODOS DE PURIFICAÇÃO DE ANTICORPOS”**

### **REFERÊNCIAS CRUZADAS AOS PEDIDOS RELACIONADOS**

Este é um pedido não provisório arquivado sob 37 CFR §1.53(b), que reivindica a prioridade com base no 35 USC §119(e) para o pedido  
5 provisório nº 60/886068, depositado em 22 de janeiro de 2007, e para o pedido provisório nº 61/013446 depositado em 13 de dezembro de 2007, cada qual é integralmente incorporado ao presente como referência

### **CAMPO DA INVENÇÃO**

A invenção está relacionada a métodos para a purificação de  
10 proteínas.

### **ANTECEDENTES DA INVENÇÃO**

A purificação econômica de proteínas em larga escala é um problema cada vez mais importante para a indústria biotecnológica. Geralmente, as proteínas são produzidas por cultura celular, usando linhagens  
15 de células de mamíferos ou de bactérias que são projetadas para produzir a proteína de interesse pela inserção de um plasmídeo recombinante contendo o gene para essa proteína. Uma vez que as linhagens de células utilizadas são organismos vivos, elas devem ser alimentadas com um meio de crescimento complexo, contendo açúcares, aminoácidos e fatores de crescimento,  
20 geralmente fornecida a partir de preparações à base de soro animal. Separação da proteína desejada a partir da mistura de compostos utilizados na alimentação das células e dos subprodutos das próprias células a um grau de pureza suficiente para ser utilizado como um terapêutico humano representa um enorme desafio.

25 Proteínas terapêuticas recombinantes são comumente produzidas em diversas linhagens celulares de mamíferos, incluindo a linhagem de mieloma murino NS0 e células de Ovário de Hamster Chinês (CHO) (Anderson, DC e Krummen, L. (2002) *Curr. Opin. Biotech.* 13: 117-123; Chu, L. e

Robinson, D.K. (2001) *Curr. Opin. Biotechnol.* 12:180-187). Cada linhagem de células apresenta vantagens e desvantagens em termos de produtividade e características das proteínas produzidas pelas células. A escolha de linhagens celulares de produção comercial frequentemente está equilibrada entre a  
5 necessidade de alta produtividade com a capacidade de liberar o produto com atributos de qualidade necessários para um dado produto. Uma importante classe de proteínas terapêuticas recombinantes que muitas vezes necessitam de processos de elevada titulação são os anticorpos monoclonais. Alguns anticorpos monoclonais necessitam de funções efectoras, mediada através da  
10 região Fc, para suscitar as suas funções biológicas. Um exemplo é o rituximab (RITUXAN<sup>®</sup>, Genentech, Inc. e Biogen-Idec), um anticorpo monoclonal quimérico que se liga à superfície de células CD-20 e resulta na depleção de células B (Cartron *et al* (2002) *Blood* 99: 754-758 ; Idusogie *t al* (2000) *J. Immunol.* 164: 4178-4184). Outros anticorpos, como o bevacizumab  
15 (AVASTIN<sup>®</sup>, Genentech, Inc.), um anticorpo anti-VEGF humanizado (fator de crescimento vascular endotelial), não exigem funções efectoras Fc para a suas atividades.

Avanços nas técnicas de cultivo celular e fermentação aumentaram grandemente os títulos de proteínas alvo em culturas líquidas.  
20 Este aumento na eficiência a montante levou a um estrangulamento no processamento subsequente na etapa de coleta celular. A coleta de células, ou clarificação das células coletadas na cultura líquida, é um processo importante em quase todas as purificações subsequentes de produtos de base biotecnológica. Quando o produto é interno à células, a coleta da célula é  
25 utilizada para diminuir o volume de líquido das células a serem processadas nas etapas de extração do produto. Quando o produto é extracelular, a coleta da célula é utilizada para separar o produto proveniente das células dos restos celulares, por exemplo, o isolamento de um anticorpo extracelular a partir da

cultura de células de mamíferos (Anthony S. Lubiniecki, Ed. (1990) *Large-Scale Mammalian Cell Culture Technology*, Marcel Dekker; Hansjoerg Hauser, Roland Wagner, Eds. (1997) *Mammalian Cell Biotechnology in Protein Production*, Walter Gruyter Publishing).

5 Os procedimentos de purificação de proteínas a partir de restos celulares dependem inicialmente do local de expressão da proteína. Algumas proteínas podem ser induzidas a serem secretadas diretamente a partir da célula para o meio de crescimento circundante em torno do crescimento, outros são feitos intracelularmente. Para esta última proteína, o primeiro passo de um  
10 processo de purificação envolve a lise celular, que pode ser feita através de uma variedade de métodos, incluindo o cisalhamento mecânico, choque osmótico ou tratamentos enzimáticos. Tal rompimento libera todo o conteúdo da célula para o homogenato e, além disso, produz fragmentos sub-celulares que são difíceis de se eliminar, devido à pequena dimensão destes. Estes  
15 geralmente são removidos por centrifugação diferencial ou por filtração. O mesmo problema aparece, embora em menor escala, com as proteínas diretamente secretadas devido à morte natural das células e liberação da proteínas intracelulares da célula hospedeira no decurso da execução da produção de proteína.

20 Durante a purificação de anticorpos terapêuticos devem ser removidas, impurezas da célula, incluindo proteínas da célula hospedeira, produto variantes, DNA da célula hospedeira, pequenas moléculas, contaminantes relacionados com os processo, endotoxinas e partículas virais (Fahrner, RL *et al* (2001) *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* 18:301-327). As  
25 técnicas de purificação utilizadas deve ser escalonáveis, eficiente, de custo compensador, confiável e que cumpra os requisitos rigorosos de pureza do produto final. As técnicas de purificação atuais normalmente envolvem várias separações cromatográficas empregando modos ortogonais de separação. Um

típico processo poderá incluir algumas das seguintes etapas: precipitação (Patente US 7.169.908), diálise, eletroforese, ultrafiltração, cromatografia por afinidade, cromatografia de troca catiônica, cromatografia de troca aniônica e/ou cromatografia por interação hidrofóbica. As etapas de cromatografia da  
5 coluna convencional são eficazes e fiáveis, mas geralmente tem baixo rendimento de produto (kg processado/h). Como os anticorpos monoclonais tornaram-se amplamente utilizados, é necessário um processo mais eficiente de produção em escala.

Técnicas de cromatografia exploram as propriedades físicas e  
10 químicas de proteínas para se alcançar um elevado grau de purificação. Estas propriedades físicas e químicas incluem tipicamente tamanho, ponto isoelétrico, distribuição de carga, locais de hidrofobicidade e afinidade para ligantes (Janson, JC e L. Ryden (eds.). (1989) *Protein Purification: Principles, High Resolution Methods and Applications*. VCH Publishers, Inc., Nova York).

15 Os diferentes modos de separação da cromatografia incluem: cromatografia de troca-iônica, de focagem isoelétrica, filtração em gel (por exclusão de tamanho), interação hidrofóbica, fase reversa, e por afinidade. Cromatografia de troca iônica (IEX), incluindo a cromatografia de troca aniônica e de troca catiônica separa o analito (por exemplo, proteínas) pelas diferenças de cargas  
20 em sua superfície líquida. A IEX é uma ferramenta primária para a separação das proteínas expressas a partir dos restos celulares e outras impurezas. Hoje, a IEX é uma das técnicas mais frequentemente utilizadas para a purificação de proteínas, peptídeos, ácidos nucleicos e outras biomoléculas de interesse, oferecendo alta resolução e separações por grupos com alta capacidade de  
25 carga. A técnica é capaz de separar espécies de moléculas que têm apenas pequenas diferenças em suas propriedades de carga, por exemplo, duas proteínas diferindo pela carga de um aminoácido. Estas características tornam a IEX bem adaptada para as etapas de captura, purificação intermediária ou

polimento em um protocolo de purificação e a técnica é utilizada a, partir de uma purificação de micro escala e a analisada por meio da purificação de kgs do produto.

Técnicas cromatográficas são fiáveis, mas a capacidade e rendimento podem ser problemáticas para aplicações em grande escala. As etapas de cromatografia em coluna convencional são eficazes e fiáveis, mas geralmente tem baixo rendimento de produto (kg processado/h). Como proteínas recombinantes tornam-se mais amplamente utilizadas, um processo de produção em escala de forma mais eficiente é necessário. O rendimento de uma etapa de cromatografia é normalmente limitado pela capacidade da resina cromatográfica para as proteínas de interesse. Com o aumento da carga de proteína na coluna, a resolução da proteína de interesse a partir das impurezas freqüentemente diminui.

Polieletrólitos são conhecidos por formar complexos com proteínas que tomam formas de complexos solúveis (Dellacherie, E. (1991) *Am. Chem. Soc., Div. Polym. Chem. Prepr.* 32 (1): 602), precipitados amorfos (Mattiasson *et al* (1998) *Polym. Plast. Technol. Eng.* 37(3):303-308; Clark *et al* (1987) *Biotech. Progress* 3(4):241; Fisher *et al* (1988) *Biotechnol. Bioeng.* 32:777; Shieh *et al* (1991) *Am. Chem. Soc., Div. Polym. Chem. Prepr.* 32(1)606; Sternberg *et al* (1974) *Biochimica et Biophysica Acta* 342:195-206; Documento WO 2004/014942), ou coacervatos (Wang *et al* (1996) *Biotechnol. Prog.* 12:356-362; Veis, A. (1991) *Am. Chem. Soc. Div. Polym. Chem. Prepr.* 32(1) 596). Proteólise de anticorpos monoclonais pela papaína, na presença de poliglicação-antígeno (ácido polimetacrílico) forma fragmentos Fab (Dainiak *et al* (2000) *Analytical Biochem.* 277:58-66).

Complexos proteína-polieletrólito coacervado, ou seja, separado em duas fases líquidas distintas quando a fase de coacervado contém a maior parte de complexo e a outra fase é a fase de equilíbrio (Burgess, DJ "*Complex*

*Coacervation: Microcapsule Formation*" em *Macromolecular Complexes in Chemistry and Biology*, Dubin, P.L., et al Eds. (1994) Springer-Verlag, Berlim; Dubin et al (1994) *Sep. Purif. Methods* 23:1-16). Coacervação de polieletrólitos da proteínas é um processo complicado e não é útil para uma vasta gama de proteínas. As associações intermoleculares nos complexos proteína-polieletrólito são devido as interações eletrostáticas, pontes de hidrogênio e forças hidrofóbicas (Cooper et al (2005) *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 10:52-78; Mattison et al (1999) *Macromol. Symp.* 140:53-76). Embora se saiba que a adição de um polieletrólito a uma solução de proteína pode levar a formação de complexos proteína-polieletrólito e grandes aglomerados e eventualmente a um coacervato e/ou precipitação, o processo reverso pode aparecer pela adição de polieletrólito segundo a qual a re-dissolução de proteína ocorre, frustrando a tentativa de isolamento da proteína ou purificação (Carlsson et al (2003) *J. Am. Chem. Soc.* 125:3140-3149). A precipitação de proteínas pelo uso de polieletrólitos pode fornecer uma alternativa de custo compensador para a separação por cromatografia. Utilizando esta técnica, pode ser possível explorar a química funcional das técnicas de cromatografia para atingi níveis similares de purificação protéica em solução. Especificamente, o rendimento da etapa de precipitação deixaria de ser limitado pela capacidade de uma determinada resina de cromatografia.

#### **DESCRIÇÃO RESUMIDA DA INVENÇÃO**

A invenção fornece métodos relacionados ao isolamento e purificação de proteínas derivadas a partir de fluídos de cultura celular.

Um aspecto da invenção é um processo de purificação de proteína pela precipitação de uma proteína com um polieletrólito, tal como um polieletrólito poliânion.

A invenção fornece também um processo de purificação de proteína pela precipitação das impurezas do fluido de cultura celular com um

polieletrólito polycation. A etapa de precipitação pode ser seguida pela cromatografia de troca catiônica, cromatografia de troca aniônica, e outras etapas de precipitação.

Os métodos da invenção incluem um processo de não afinidade para a purificação de um anticorpo .

Um aspecto da invenção é um método de purificação de anticorpos compreendendo:

(a) o ajuste da acidez ou concentração de sal de uma mistura que contém um anticorpo onde o anticorpo é derivado de um fluido coletado de cultura de células;

(b) A adição de um polieletrólito carregado negativamente no qual um precipitado proteína-polieletrólito é formado;

(c) a separação do precipitado proteína-polieletrólito das impurezas selecionadas a partir dos agregados de proteínas, fragmentos de proteínas, proteínas da célula hospedeira, insulina, gentamicina, DNA e proteína A lixiviada;

(d) o isolamento do precipitado proteína-polieletrólito; e

(e) a ressuspensão do precipitado proteína-polieletrólito em uma solução aquosa.

Outro aspecto da invenção é um método de purificação de anticorpos compreendendo:

(a) o ajuste da acidez ou concentração de sal de uma mistura que contém um anticorpo onde o anticorpo é derivado de um fluido coletado de cultura de células;;

(b) a adição de polieletrólito polycation, carregado positivamente, à mistura na qual é formado o precipitado contendo o polieletrólito polycation, carregado positivamente e impurezas selecionadas a partir de agregados de proteína, fragmentos de proteína, proteínas de célula



hospedeira, insulina, gentamicina e DNA, e

(c) A separação do precipitado a partir da mistura compreendendo o anticorpo.

### **BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS**

5 A Figura 1 exhibe as etapas dos processos para a purificação do *pool* de proteína A purificada a partir de fluido de cultura celular coletado (HCCF), seguido por: coluna da esquerda - cromatografia de troca catiônica (Sepharose® de fluxo rápido, SPSFF), em seguida, cromatografia de troca aniônica (QSFF); coluna central - QSFF; ou coluna da direita - precipitação em  
10 ácido polivinilsulfônico (PVS) em pH 7, seguida de QSFF.

A Figura 2 exhibe as etapas do processo de purificação do *pool* SPSFF purificado coletados a partir de uma cultura celular fluida (HCCF), seguido por: coluna da esquerda - QSFF; ou coluna da direita - precipitação PVS em pH 7, seguido de QSFF.

15 A Figura 3 exhibe as etapas do processo de captura direta e purificação do anticorpo a partir de HCCF: coluna da esquerda - precipitação PVS em pH 5, seguido por QSFF e então SPSFF; ou precipitação PVS em pH 7, seguido por QSFF e então SPSFF.

A Figura 4 exhibe a curva e solubilidade do rhuMab 2H7 em PVS  
20 (1800 Da) em pH 5 a 3,0 e 5,6 mS/cm (*pool* de proteína A). mS = *milisiemens*, uma unidade de condutividade.

A Figura 5 exhibe as curvas de solubilidade do rhuMab 2H7 em PVS (1800 Da), a pH 7 a 0,7, 1,5, 3,0 e 4,7 mS/cm (*pool* de proteína A).

A Figura 6 exhibe curvas de solubilidade do rhuMab 2H7 em PVS  
25 (1800 Da), em pH 7 a 0,8; e 1,5 mS/cm (captura do *pool* em SPSFF )

Figura 7 exhibe curvas de solubilidade do rhuMab 2H7 em PVS (1800 Da), a pH 5 e 3,0 mS/cm; e em pH 7 e 0,7 mS/cm (HCCF).

Figura 8 exhibe curvas de solubilidade comparando precipitação

em PVS (1800 Da) para PAA (1200 e 8000 Da) precipitação em pH 5, 5mS/cm do anticorpo anti-CD20, 2H7.

Figura 9 exibe curvas de solubilidade comparando precipitação PVS (1800 Da) para PAA (1200 e 8000 Da) precipitação em pH 7, 1,5 mS/cm do anticorpo anti-CD20, 2H7.

A Figura 10 exibe curvas de solubilidade de anticorpos anti-CD20 (rituximab) em pH 7, 1.5mS/cm comparando PAA com pesos moleculares variando de 1200 a 1.100.000 Da.

A Figura 11 exibe uma tabela de resumo dos resultados do processamento subsequente para o anti-CD20 rhuMab 2H7: (a) HCCF processada através da proteína A, (b) HCCF processada através da SPSFF; (c) precipitação em PVS do HCCF.

A Figura 12 exibe curvas de solubilidade do Apomab em PVS (1800 Da) em pH 5,5 e 5,1 mS/cm, pH 6,0 e 3,0 mS/cm, pH 6,0 e 5,5 mS/cm.

A Figura 13 exibe curvas de solubilidade do Apomab em PVS (1800 Da) em pH 6,5 e 1,5 mS/cm, pH 6,5 e 3,2 mS/cm e pH 7,0 e 0,7 mS/cm.

A Figura 14 exibe uma fotografia de frascos contendo um *pool* de proteínas A do Apomab em pH 5,5 contendo: (à esquerda) sem PVS (0%), (ao centro) 0,1% de PVS (p/v), e (à direita) 1% de PVS (w v).

A Figura 15 exibe curvas de solubilidade do anti-cMet em PVS (1800 Da) em pH 4 e 2 mS/cm; pH 5 e de 1 mS/cm; pH 5 e 2,4 mS/cm; pH 6 e 0,5 mS/cm, pH 7 e 0,5 mS/cm.

A Figura 16 exibe as etapas do processo de captura direta e purificação do anticorpo rhuMab 2H7 a partir do CCF: coluna da esquerda – centrifugação do HCCF, seguida pela precipitação do anticorpo com PVS, e então QSFF; coluna da direita – precipitação/floculação de impurezas, centrifugação do HCCF, precipitação do anticorpo com PVS, e então QSFF.

A Figura 17 exibe as etapas do processo de purificação do

anticorpo rhuMab 2H7 colhidas a partir do fluído de cultura celular (HCCF), seguido por: coluna da esquerda – cromatografia de troca catiônica, Prosep VA (SEPHAROSE® fluxo rápido, SPSFF), em seguida, cromatografia de troca aniônica (QSFF); coluna de direita – precipitação em poliarginina, Prosep VA, SPSFF, e então QSFF.

A Figura 18 exhibe o mesmo processo de purificação do anticorpo rhuMab 2H7 colhidas a partir do fluído de cultura celular (HCCF) como na Figura 17 com a eliminação da etapa com Prosep Va: coluna da esquerda SPSFF e em seguida QSFF; coluna de direita – precipitação em poliarginina, SPSFF e então QSFF.

A Figura 19 exhibe as etapas do processo de purificação do anticorpo rhuMab 2H7 colhidas a partir do fluído de cultura celular (HCCF), seguido por: coluna da esquerda - precipitação do anticorpo com PVS e então QSFF; coluna da direita - precipitação em poliarginina, precipitação do anticorpo com PVS e então QSFF.

A Figura 20 exhibe uma curva de solubilidade do rhuMab 2H7 CCF com poliarginina 110 kDa

A Figura 21 exhibe uma curva de solubilidade do rhuMab 2H7 CCF - poliarginina 42 kDa

A Figura 22 exhibe uma curva de solubilidade do rhuMab 2H7 CCF - poliarginina 110 kDa

A Figura 23 exhibe uma curva de solubilidade do rhuMab 2H7, anti-CD22, rhuMab C2B8 HCCF - poliarginina 42 kDa

A Figura 24 exhibe uma curva de solubilidade do rhuMab 2H7, anti-CD22, rhuMab C2B8 HCCF - poliarginina 110 kDa

A Figura 25 exhibe curvas de solubilidade da precipitação em PVS do rhuMab 2H7 CCF floculado com 0,075% p/v de poliarginina 110 kDa.

A Figura 26 exhibe curvas de rendimento do SPSFF com um *pool*

de Proteína A gerado a partir de poliarginina precipitada em HCCF como carga.

A Figura 27 exibe curvas de rendimento de SPSFF com HCCF gerado a partir de precipitado de poliarginina como carga.

A Figura 28 exibe um gel de eletroforese da inibição da redução  
 5 de anticorpos em 2H7 MAb. HCCF 4-12% BT, tampão MOPS, coloração de  
*Sypro ruby*, 2 µg HCCF de carga, 5 min. a 70 °C, exposição de 9 seg., 2 *F/T*  
*Run 7*, incubação RT em mini latas SS, 500 µl (microlitros) amostras  
 imediatamente congeladas a -70 °C.

A Figura 29 exibe uma curva de solubilidade do rhuMab C2B8  
 10 *pool* de proteína A – polilisina 2,5 kDa

A Figura 30 exibe uma curva de solubilidade do rhuMab C2B8  
*pool* de proteína A – polilisina 50 kDa

A Figura 31 exibe uma curva de solubilidade do rhuMab C2B8  
 HCCF – polilisina 50 kDa

15 A Figura 32 exibe uma curva de solubilidade do rhuMab C2B8  
 HCCF – polilisina 225 kDa

A Figura 33 exibe a curva de solubilidade do anticorpo  
 humanizado anti-CD20 com amostras de 1800 Da a 1132 kDa de 0,00% a  
 0,20% de poliestireno sulfonado (PSS) em pH 7 e 12 mS/cm de condutividade.

20 A Figura 34 exibe um gráfico da capacidade  $V_{max}$  (medida em  
 gramas de anticorpos por área de filtro) *versus* a pressão de queda para cada  
 mídia de filtro: A1HC, B1HC, C0HC, 45CE, 20CE, 30CE.

A Figura 35 exibe o efeito da variação da velocidade de fluxo  
 através de rendimento em termos de volume de tampão necessário para atingir  
 25 a resolubilização completa do precipitado proteína-polieletrólito 2H7-PVS a  
 partir do filtro C0HC MILLISTAK<sup>+</sup>®. LMH = litros por metro quadrado por hora,  
 um medição da velocidade de fluxo.

A Figura 36 exibe os efeitos de dois intervalos de fluxo (fluxo de

resolubilização do tampão em LMH) sobre a resolubilização de proteínas a partir do filtro C0HC MILLISTAK<sup>+</sup>® (precipitado proteína-polieletrólito 2H7-PVS).

A Figura 37 exibe um processo esquemático de condicionamento HCCF em linha/configuração da precipitação PVS.

5 A Figura 38 exibe que o rendimento da recuperação do anticorpo no contínuo condicionamento/precipitação da matéria-prima.

### **DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO**

Referências serão agora feitas em detalhes a certos exemplos de realização da presente invenção, cujos exemplos são ilustrados acompanhados  
10 das estruturas e fórmulas. Embora a invenção seja descrita em conjunto com os exemplos de realização enumerados, entender-se-á que estes não se destinam a limitar o invento aos exemplos de realizações.. Pelo contrário, a invenção tem a intenção de cobrir todas as alternativas, modificações e equivalências que possam ser incluídas no âmbito da presente invenção, tal  
15 como definido pelas reivindicações. Um técnico no assunto irá reconhecer que muitos materiais e métodos similares ou equivalentes aos descritos neste documento, poderiam ser utilizados na prática da presente invenção. A presente invenção não é limitada com relação aos métodos e materiais descritos. No caso em que uma ou mais literaturas, patentes e outros materiais  
20 incorporados semelhantes, diferirem ou contradizerem o presente pedido, incluindo, mas não se limitado a, definição de termos, uso de termos, técnicas descritas e similares, as definições do presente pedido prevalecerá.

### **DEFINIÇÕES**

Salvo quando expresso de forma diferente os seguintes termos e  
25 frases utilizadas no presente destinam-se a ter os seguintes significados:

O termo "fluido de cultura de células coletadas", também denominado HCCF, significa fluido de cultura de células procarióticas ou eucarióticas a partir do qual as células foram removidas por métodos, incluindo

a centrifugação ou filtração. Cultura celular é o processo pelo qual tanto células procarióticas quanto células eucarióticas são cultivadas sob condições controladas. O termo "cultura celular" refere-se à cultura de células derivadas de eucariotos multicelulares, incluindo as células animais ou procariotos monocelulares, incluindo bactérias e leveduras. Culturas de células eucarióticas incluem células de mamíferos como as células de Ovário de Hamster Chinês, hibridomas e células de insetos. Com um recipiente de cultura de células adequada, proteínas secretadas podem ser obtidas a partir de células dependentes de ancoragem ou linhagens de células em suspensão. Culturas celulares de mamíferos incluem células de Ovário de Hamster Chinês (CHO).

O termo "fermentação microbiana" refere-se à cultura celular de bactérias ou leveduras, que são modificadas por engenharia genética para produzir substâncias químicas, tais como proteínas. A fermentação é utilizada para propagar as bactérias e leveduras clonadas, bem como de outros microorganismos e produzir proteínas de valor. A produtividade celular e o crescimento destes organismos são maximizados pela suplementação com meios de crescimento específicos e controle e de diversos fatores ambientais (tais como pH, temperatura e aeração). A fermentação bacteriana fluida pode ser derivada da *E. Coli*.

O termo "anticorpo" é utilizado no presente no sentido mais amplo e inclui especificamente anticorpos monoclonais, anticorpos policlonais, anticorpos multiespecíficos (por exemplo, anticorpos biespecíficos) e fragmento de anticorpos, desde que exibam a atividade biológica desejada. Os anticorpos podem ser murinos, humanos, humanizados, quiméricos, ou derivados de outras espécies.

Um anticorpo é uma proteína produzida pelo sistema imunológico que é capaz de reconhecer e se ligar a um antígeno específico. (Janeway, *et al*

(2001) "*Immunobiology*", 5ª Ed., Garland Publishing, Nova Iorque). Um antígeno alvo geralmente tem inúmeros sítios de ligação, também denominados de epítopos, reconhecidos pelos CDRs em vários anticorpos. Cada anticorpo que se liga especificamente a um epítipo diferente tem uma  
5 estrutura diferente. Assim, um antígeno pode ter mais que um anticorpo correspondente.

O termo "anticorpos", como utilizado no presente, também se refere a uma imunoglobulina de comprimento total ou uma porção imunologicamente ativa de uma molécula de imunoglobulina de comprimento  
10 total, ou seja, uma molécula que contém um sítio de ligação ao antígeno e que se liga imuno-especificamente a um antígeno de um alvo de interesse ou parte deste, tais alvos inclui, mas não são limitados a, células de câncer ou células que produzem anticorpos auto-imunes associadas a uma doença auto-imune. A imunoglobulina divulgada na presente invenção pode ser de qualquer tipo  
15 (por exemplo, IgG, IgE, IgM, IgD, e IgA), e classe (por exemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2) ou subclasse de molécula de imunoglobulina. As imunoglobulinas podem ser provenientes de qualquer espécie. Em um aspecto, porém, a imunoglobulina é de origem humana, murina ou de coelho.

"Fragmentos de Anticorpos" compreendem uma porção de um  
20 anticorpo de comprimento total, geralmente a porção de ligação com o antígeno ou região variável deste. Exemplos de fragmentos de anticorpos incluem F(ab), F(ab'), F(ab')<sub>2</sub> e fragmentos Fv; diacorpos, anticorpos lineares, fragmentos produzidos por uma expressão de biblioteca de Fab, anticorpos anti-idiotípicos (anti-Id), CDR (região de determinação de complementaridade),  
25 EDC (domínio extracelular), e fragmentos de ligação ao epítipo de qualquer um dos acima mencionados que se liga imuno-especificamente a antígenos de células de câncer, antígenos virais ou antígenos microbianos, moléculas de anticorpos de cadeia única e anticorpos multiespecíficos formados a partir de

fragmentos de anticorpos.

A expressão “anticorpo monoclonal”, da forma utilizada no presente, refere-se a um anticorpo obtido a partir de uma população de anticorpos substancialmente homogêneos, ou seja, os anticorpos individuais  
5 que compreendem a população são idênticos, exceto por possíveis mutações de ocorrência natural que podem estar presentes em quantidades menores. Os anticorpos monoclonais são altamente específicos, sendo direcionados contra um único sítio antigênico. Além disso, ao contrário das preparações dos anticorpos policlonais que incluem diferentes anticorpos dirigidos a diferentes  
10 determinantes (epítomos), cada anticorpo monoclonal é dirigido a um único determinante sobre o antígeno. Além de sua especificidade, a preparação de anticorpo monoclonal é vantajosa pelo fato destas preparações serem tipicamente livre de contaminação por outras imunoglobulinas. O adjetivo “monoclonal” indica o caráter do anticorpo como sendo obtido a partir de uma  
15 população de anticorpos substancialmente homogênea e não deve ser considerado como requerendo a produção do anticorpo por qualquer método específico. Por exemplo, Os anticorpos monoclonais a serem utilizados de acordo com a presente invenção podem ser feitos pelo método de hibridoma primeiramente descrito por Kohler *et al.*, (1975) *Nature* 256:495, ou podem ser  
20 feitos por métodos recombinantes (Patente US 4816567). Os “anticorpos monoclonais” podem também ser isolados a partir de bibliotecas de anticorpos de fagos, utilizando as técnicas descritas, por exemplo, em Clackson *et al.*, (1991) *Nature*, 352:624-628; Marks *et al.*, (1991) *J. Mol. Biol.*, 222:581-597.

Anticorpos monoclonais úteis são populações homogêneas de  
25 anticorpos para um determinante antigênico específico (por exemplo, um antígeno de células de câncer, um antígeno viral, um antígeno microbiano, uma proteína, um peptídeo, um carboidrato, um químico, ácidos nucleicos ou fragmentos destes). Um anticorpo monoclonal (MAb) para um antígeno de



interesse pode ser preparado utilizando qualquer técnica conhecida no estado da técnica que fornece a produção de moléculas de anticorpos por linhagens de células contínuas em cultura. Estes incluem, mas não estão limitados a, técnica de hibridomas originalmente descrita por Köhler e Milstein (1975) *Nature* 256:495-497, técnica do hibridomas humano de as células B (Kozbor *et al* (1983) *Immunology Today* 4:72), e técnica de hibridomas de EBV (Cole *et al* (1985) em *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc., págs. 77-96). Esses anticorpos podem ser de qualquer classe, incluindo imunoglobulinas IgG, IgM, IgE, IgA e IgD e qualquer subclasse destes. O hibridoma produzindo MAb de uso na presente invenção podem ser cultivados *in vitro* ou *in vivo*.

Anticorpos monoclonais terapêuticos úteis para os métodos da presente invenção incluem trastuzumab (HERCEPTIN<sup>®</sup>, Genentech, Inc., Carter *et al* (1992) *Proc. Natl. Acad. USA.*, 89:4285-4289; Patente US 5.725.856), anticorpos anti-CD20, tais como anticorpos anti-CD20 quiméricos "C2B8" (Patente US 5.736.137); rituximab (RITUXAN<sup>®</sup>), ocrelizumab, um variante quimérico ou humanizado do anticorpo 2H7 (Patente US 5.721.108; documento WO 04/056312) ou tositumomab (BEXXAR<sup>®</sup>), anti-IL-8 (St John *et al* (1993) *Chest*, 103:932, e documento WO 95/23865), incluindo os anticorpos anti-VEGF humanizado e/ou anticorpos anti-VEGF humanizados maturados por afinidade, como o anticorpo anti-VEGF huA4.6.1 bevacizumab (Avastin<sup>®</sup>, Genentech, Inc., Kim *et al* (1992) *Growth Factors* 7:53-64, documento WO 96/30046, documento WO 98/45331); anticorpos anti-PSCA (documento WO 01/40309); anticorpos anti-CD40, incluindo S2C6 humanizado e variantes, (documento WO 00/75348); anti-CD11a (Patente US 5.622.700; documento WO 98/23761; Steppe *et al* (1991) *Transplant Intl.* 4:3-7; Hourmant *et al* (1994) *Transplantation* 58:377-380); anti-IgE (Presta *et al* (1993) *J. Immunol.* 151:2623-2632; documento WO 95/19181), anti-CD18 (Patente US 5.622.700;

documento WO 97/26912); anti-IgE, incluindo E25, E26 e E27 (Patentes US 5.714.338; US 5.091.313; documento WO 93/04173; Patente US 5.714.338); anticorpo anti-receptor de Apo-2 (documento WO 98/51793) ; anticorpos anti-TNF-alfa incluindo cA2 (REMICADE®), e CDP571 MAK-195 (Patente US 5.672.347; Lorenz *et al* (1996) *J. Immunol.* 156 (4):1646-1653; Dhainaut *et al* (1995) *Crit. Care Med.* 23(9):1461-1469); Fator anti-tecido (TF) (EP 0.420.937 B1); anti-integrina humana alfa 4 beta 7 (documento WO 98/06248), anticorpo anti-EGFR, quimerizado ou humanizado 225 (documento WO 96/40210); anticorpos anti-CD3, como OKT3 (Patente US 4515893); anti-CD25 ou anti-tac, tais como anticorpos CHI-621 SIMULECT® e ZENAPAX® (Patente US 5693762); anticorpos anti-CD4, como o anticorpo CM-7412 (Choy *et al* (1996) *Arthritis Rheum* 39(1):52-56); anticorpos anti-CD52, como CAMPATH-1H (Riechmann *et al* (1988) *Nature* 332:323-337); anticorpos anti-receptores Fc tais como anticorpos M22 dirigidos contra Fc gamma RI como em Graziano *et al* (1995) *J. Immunol.* 155(10):4996-5002; anti-antígeno carcinoembrionário (CEA), tais como anticorpos hMN-14 (Sharkey *et al* (1995) *Cancer Res.* 55 (23 Supl):5935s-5945s; anticorpos dirigidos contra células epiteliais de mama, incluindo huBrE-3, hu-Mc 3 e CHL6 (Ceriani *et al* (1995) *Cancer Res.* 55(23):5852s-5856s; e Richman *et al* (1995) *Cancer Res.* 55 (Supl 23): 5916s-5920s); anticorpos que se ligam a células de carcinoma de cólon tais como C242 (Litton *et al* (1996) *Eur. J. Immunol.* 26 (1) :1-9); anticorpos anti-CD38, por exemplo, AT 13/5 (Ellis *et al* (1995) *J. Immunol.* 155 (2) :925-937); anticorpos anti-CD33, como Hu M195 (Jurcic *et al* (1995) *Cancer Res* 55 (23 Suppl): 5908s - 5910s e CMA-676 ou CDP771; anticorpos anti-CD22, como LL2 ou LymphoCide (Juweid *et al* (1995) *Cancer Res* 55 (23 Supl): 5899s-5907s); anticorpos anti-EpCAM, como a 17-1A (PANOREX®); anticorpos anti-GpIIb/IIIa, como abciximab ou c7E3 Fab (REOPRO®); anticorpos anti-VSR, como MEDI-493 (SYNAGIS®); anticorpos anti-CMV, como PROTOVIR®;

anticorpos anti-HIV, como PRO542; anticorpos anti-hepatite, como o anticorpo anti-Hep B OSTAVIR®; anticorpo anti-CA 125 OvaRex; anticorpo anti-epítipo GD3 idiótipo BEC2; anticorpo anti-alfa v Beta3 VITAXIN®; anticorpo anti-carcinoma de células renais humanas, tais como anticorpos ch-G250; ING-1, anticorpo anti-17-1A humano (3622W94), anticorpo anti-tumor coloretal humano (A33), anticorpo anti-melanoma humano R24 dirigidos contra gangliosida GD3; anticorpo anti-carcinoma de células escamosas humanas (SF-25); e anti-antígeno leucocitário humano (HLA), tais como anticorpos Smart ID10 e os anticorpos anti-HLA DR Oncolym (Lym-1).

Anticorpos monoclonais úteis incluem, mas não estão limitados a, anticorpos monoclonais humanos, anticorpos monoclonais humanizados, fragmentos de anticorpos, ou anticorpos monoclonais quiméricos humano-camundongo (ou outras espécies). Anticorpos monoclonais humanos podem ser produzidos por qualquer uma das inúmeras técnicas conhecidas no estado da arte (Teng *et al* (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci USA.* 80:7308-7312; Kozbor *et al* (1983) *Immunology Today* 4:72-79; e Olsson *et al.* (1982) *Methods in Enzymology* 92:3-16).

O anticorpo também pode ser um anticorpo biespecífico. Anticorpos biespecíficos podem ter uma cadeia pesada de imunoglobulina híbrida com uma primeira especificidade de ligação em um braço, e um par de cadeia leve e pesada de imunoglobulina híbrida (fornecendo uma segunda especificidade de ligação), no outro braço. Esta estrutura assimétrica facilita a separação dos compostos biespecíficos desejados a partir de combinações de cadeias de imunoglobulina indesejadas, como a presença de uma cadeia leve de imunoglobulina em apenas uma metade da molécula biespecífica fornecida para uma maneira fácil de separação (documento WO 94/04690; Suresh *et al* (1986) *Methods in Enzymology*, 121:210; Rodrigues *et al* (1993) *J. of Immunology* 151:6954-6961, Carter *et al* (1992) *Bio/Technology* 10:163-167,

Carter *et al* (1995) de *J. Hematotherapy* 4:463-470; Merchant *et al* (1998) *Nature Biotechnology* 16:677-681. Métodos para a produção de anticorpos biespecíficos são conhecidas no estado da técnica (Milstein *et al* (1983) *Nature* 305:537-539; documento WO 93/08829; Traunecker *et al* (1991) *J. EMBO* 10:3655-3659. Usando essas técnicas, anticorpos biespecíficos podem ser preparados para a conjugação como ADC no tratamento ou prevenção de doenças, tal como definido no presente.

De acordo com uma abordagem diferente, domínios variáveis de anticorpos com as especificidades de ligação desejadas (sítios de combinação de antígeno-anticorpo) são fundidos à seqüências de domínios constantes de imunoglobulina. A proteína de fusão pode ser com um domínio constante de cadeia pesada de imunoglobulina, que compreende pelo menos parte das regiões de articulação, C<sub>H</sub>2, e C<sub>H</sub>3. A primeira região constante de cadeia pesada (C<sub>H</sub>1) pode conter o sítio necessário para a ligação da cadeia leve, presente em pelo menos uma das proteínas de fusão. Ácidos nucleicos com seqüências que codifica as fusões da cadeia pesada de imunoglobulina, se desejado, a cadeia leve de imunoglobulina, são inseridos em vetores de expressão separados, e são co-transfectados em um organismo hospedeiro apropriado. Isto fornece grande flexibilidade no ajuste das proporções dos três fragmentos polipeptídicos em exemplos de realizações quando razões desiguais das três cadeias de anticorpo utilizadas na construção fornecem rendimentos ótimos. Entretanto, é possível inserir as seqüências de codificação para duas ou todas as três cadeias de anticorpo em um vetor de expressão quando a expressão de pelo menos duas cadeias de anticorpo em razões iguais resulta em alto rendimento ou quando as razões não são de significância específica.

Anticorpos híbridos ou bifuncionais podem ser obtidos tanto biologicamente, ou seja, por técnicas de fusão celular, quanto quimicamente,

especialmente com agentes reticulantes ou reagentes que formam pontes de dissulfeto, e pode incluir todos os anticorpos ou fragmentos destes (EP 105.360; documento WO 83/03679; EP 217.577).

O anticorpo pode ser um fragmento funcionalmente ativo,  
5 derivado ou análogo de um anticorpo que se liga imuno-especificamente a antígenos de células de câncer, antígenos virais ou antígenos microbianos ou outros anticorpos ligados a células tumorais ou matriz. Neste contexto, "funcionalmente ativo" significa que o fragmento, derivado ou análogo é capaz de suscitar anticorpos anti-anti-idiotipo que reconhecem o mesmo antígeno que  
10 os anticorpos a partir do qual o fragmento, derivado ou análogo é reconhecido. Especificamente, em uma realização a antigenicidade do idiotipo da molécula de imunoglobulina pode ser reforçada pela deleção do quadro e seqüências CDR que são C-terminal para a seqüência CDR que reconhece especificamente o antígeno. Para determinar quais seqüências de CDR se  
15 ligam ao antígeno, peptídeos sintéticos contendo as seqüências de CDR podem ser utilizados em ensaios de ligação com o antígeno por qualquer método de ensaio de ligação conhecido no estado da técnica, por exemplo, o ensaio de BIA core (Kabat *et al*, (1991) em *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Quinta Edição, National Institute of Health, Bethesda,  
20 MD; Kabat *et al* (1980) *J. of Immunology* 125 (3):961-969 ).

Outros anticorpos úteis incluem fragmentos de anticorpos, tais como, mas não se limitando a, fragmentos F(ab')<sub>2</sub>, que contêm a variável região, a região constante da cadeia leve e o domínio C<sub>H</sub>1 da cadeia pesada podem ser produzidos pela digestão da molécula de anticorpo com a pepsina e  
25 fragmentos Fab, que pode ser gerado através da redução das pontes de dissulfeto dos fragmentos F(ab')<sub>2</sub>. Outros anticorpos úteis são dímeros de cadeia pesada e cadeia leve de anticorpos, ou qualquer fragmento mínimo destes, como Fvs ou anticorpos de cadeia única (SCAs) (por exemplo,

conforme descrito na Patente US 4.946.778; Bird (1988) *Science* 242:423-42; Huston *et al.*, (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 85:5879-5883.; e Ward *et al* (1989) *Nature* 334:544-54), ou qualquer outra molécula com a mesma especificidade como do anticorpo.

5 Os anticorpos monoclonais da presente invenção incluem especificamente anticorpos “quiméricos” (imunoglobulinas), em que uma porção da cadeia leve e/ou pesada é idêntica ou homóloga a seqüências correspondentes em anticorpos derivados de uma espécie específica, ou pertencente a uma classe ou subclasse específica de anticorpos, enquanto o  
10 restante da(s) cadeia(s) é idêntico ou homólogo a seqüências correspondentes em anticorpos derivados de outras espécies ou pertencentes à outra classe ou subclasse de anticorpos, bem como fragmentos de tais anticorpos, desde que exibam a atividade biológica desejada (Patente US 4816567, e Morrison *et al.* (1984), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6851-6855 ). Um anticorpo quimérico é  
15 uma molécula em que diferentes porções são derivadas de uma espécie animal diferente, tais como aqueles que têm uma região variável derivada de um murino monoclonal e regiões constantes de imunoglobulina humana (Patente US 4.816.567; Patente US 4.816.397). Os anticorpos quiméricos incluem anticorpos “primatizados”, que compreendem seqüências de ligação de  
20 antígenos de domínio variável derivadas de primatas não-humanos (por exemplo, Macacos do Velho Mundo, tal como macaco etc.) e seqüências da região constante humana.

Anticorpos monoclonais quiméricos e humanizado, compreendendo tanto porções humanas como porções não-humanas, podem  
25 ser feitos usando técnicas padrão de DNA recombinante (documento WO 87/02671; EP 184,187; EP 171496; EP 173494; documento WO 86/01533; US 4816567; EP 12023; Berter *et al.* (1988) *Science* 240:1041-1043; Liu *et al.* (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:3439-3443; Liu *et al.* (1987) *J. Immunol.*

139:3521-3526; Sun *et al.* (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:214-218; Nishimura *et al.* (1987) *Cancer. Res.* 47:999-1005; Wood *et al.* (1985) *Nature* 314:446-449; e Shaw *et al.* (1988) *J. Natl. Cancer Inst.* 80 :1553-1559 ; Morrison (1985) *Science* 229 :1202-1207 ; Oi *et al.* (1986) *BioTechniques* 4 :214 ; US 5225539 ; Jones *et al.* (1986) *Nature* 321 :552-525 ; Verhoeyan *et al.* (1988) *Science* 239:1534; e Beidler *et al.* (1988) *J. Immunol.* 141:4053-4060; cada um dos quais é incorporado ao presente pela referência, em sua totalidade.

Anticorpos completamente humanos podem ser produzidos utilizando camundongos transgênicos que são incapazes de expressar endogenamente os genes da cadeia pesada e leve da imunoglobulina, mas que pode expressar os genes da cadeia pesada e leve humana. Os camundongos transgênicos são imunizados de modo normal com um antígeno selecionado, por exemplo, todo ou uma parte de um polipeptídeo da presente invenção. Os anticorpos monoclonais direcionados contra o antígeno podem ser obtidos utilizando tecnologia de hibridoma convencional. Os transgenes da imunoglobulina humana portados pelos camundongos transgênicos rearranjados durante diferenciação das células B e posteriormente, submetidos a troca de classe e mutação somática. Assim, usando essa técnica, é possível produzir anticorpos IgG, IgA, IgM e IgE terapeuticamente úteis. Para uma visão geral desta tecnologia para a produção de anticorpos humanos, vide Lonberg e Huszar (1995) *Int. Rev. Immunol.* 13:65-93; Patentes US 5625126; US 5633425; US 5569825; US 5661016 e US 5545806). Outros anticorpos humanos podem ser obtidos de fontes comerciais, por exemplo, Abgenix, Inc. (Freemont, CA) e Genpharm (San Jose, CA).

Anticorpos completamente humanos que reconhecem um epítopo selecionado podem ser gerados utilizando uma técnica denominada de "seleção guiada". Nesta abordagem um anticorpo monoclonal não-humano

selecionado, por exemplo, um anticorpo de camundongo, é utilizado para guiar a seleção de um anticorpo totalmente humano que reconhece o mesmo epitopo. (Jespers *et al* (1994) *Biotechnology* 12:899-903). Anticorpos humanos também podem ser produzidos utilizando diversas técnicas conhecidas no estado da arte, incluindo bibliotecas de exibição por Fagos (Hoogenboom e Winter, *J. Mol. Biol.* 227:381 (1991), Marks *et al* (1991) *J. Mol. Biol.* 222: 581).

O anticorpo pode ser uma proteína de fusão de um anticorpo, ou um fragmento funcionalmente ativo deste, por exemplo, aqueles onde o anticorpo é fundido através de uma ligação covalente (por exemplo, uma ligação peptídica), tanto na sequência de aminoácido N-terminal quanto C-terminal de outra proteína (ou parte dela, como, pelo menos, uma porção da proteína de 10, 20 ou 50 aminoácidos) que não é o anticorpo. O anticorpo ou fragmento deste pode ser ligado covalentemente à outra proteína no N-terminal do domínio constante.

Anticorpos incluem análogos e derivados que são também modificados, ou seja, pela ligação covalente de qualquer tipo de molécula, desde que tais ligações covalentes permitam que o anticorpo mantenha a sua imunoespecificidade de ligação com o antígeno. Por exemplo, mas não com o objetivo de limitar o escopo da invenção, derivados e análogos dos anticorpos incluem aqueles que foram adicionalmente alterados, por exemplo, por glicosilação, acetilação, pegilação, fosforilação, amidação, derivatização pelos grupos de proteção/bloqueio conhecidos, clivagem proteolítica, ligação a uma unidade de anticorpo celular ou outra proteína, etc. Qualquer uma das inúmeras modificações químicas pode ser realizada por técnicas conhecidas, incluindo, mas não se limitando a, clivagem química específica, acetilação, formilação, síntese metabólica na presença de tunicamicina e etc. Além disso, o análogos ou derivados podem conter um ou mais aminoácidos não naturais.

Exemplos de anticorpos CD20 incluem: "C2B8," agora rituximab



(RITUXAN<sup>®</sup>/MABTHERA<sup>®</sup>) (Patente US 5.736.137); anticorpos Y2B8 para 2B8 murino marcado com ítrio-[90] ou ibritumomab tiuxetan (ZEVALIN<sup>®</sup>, Biogen Idec, Inc. Patente US 5.736.137); 2B8 depositados junto ao ATCC sob o número de acesso HB11388 em 22 de junho de 1993); IgG2a murino "B1",  
5 também denominado de tositumomab, opcionalmente marcado com I<sup>131</sup> para gerar o "B1-I<sup>131</sup>" ou anticorpo "tositumomab iodina I<sup>131</sup>" (BEXXAR<sup>®</sup>) comercialmente disponível pela Corixa (Patente US 5.595.721); anticorpos monoclonais murinos "1F5" (por exemplo, Press *et al* (1987) *Blood* 69(2):584-591 e variantes, incluindo o 1F5 humanizado ou de "estrutura remendada"  
10 (*framework patched*) (documento WO 2003/002607 , Leung, S.; depósito ATCC: MP-96450); anticorpos 2H7 murino e 2H7 quiméricos (Patente US 5.677.180); ocrelizumab, uma variante humanizada do 2H7 e outros variantes de 2H7 (documento WO 2004/056312; Patente US 5.721.108); Humax-CD20<sup>®</sup> completamente humano, anticorpos de alta afinidade direcionados para a  
15 molécula CD20 na membrana celular das células-B (Genmab, Dinamarca). Vide, por exemplo, Glennie e van de Winkle, (2003) *Drug Discovery Today* 8:503-510 e Cragg *et al* (2003) *Blood* 101: 1045-1052); os anticorpos monoclonais humanos estabelecidos nos documentos WO 2004/035607 e WO 2005/103081 (Teeling *et al.* GenMab/Medarex); os anticorpos que possuem o  
20 complexo de cadeias de açúcar N-glicosídeo ligadas acopladas à região Fc, como descrito na US 2004/0093621 (Shitara *et al.*); anticorpos monoclonais e fragmentos de ligação ao antígeno para CD20 (documento WO 2005/000901, Tedder *et al.*) tal como, 3-HB20, HB20-4, HB20-25 e MB20-11; proteínas de cadeia única que se ligam a CD20 (US 2005/0186216; US 2005/0202534; US  
25 2005/0202028; US 2005/0202023); moléculas que se ligam a CD20 como, por exemplo, a séria AME de anticorpos, tal como anticorpos AME-133<sup>®</sup> (documento WO 2004/103404; US 2005/0025764) e anticorpos CD20 com mutações na Fc (documento WO 2005/070963); moléculas que se ligam a

CD20 (documento WO 2005/016969; US 2005/0069545); anticorpos  
 biespecíficos (documento WO 2005/014618); anticorpos monoclonais LL2  
 humanizados (US 2005/0106108); anticorpos B-Ly1 para CD20 quimérico ou  
 humanizado (documento WO2005/044859; US 2005/0123546); = ao anticorpo  
 5 A20 ou variantes deste, tal como anticorpos A20 quiméricos ou humanizados  
 (CA20, hA20, respectivamente) e IMMUN-106 (US 2003/0219433); e os  
 anticorpos monoclonais L27, G28-2, 93-1B3, B-C1 ou NU-B2 disponíveis a  
 partir do *Workshop Internacional Leukocyte Typing* (Valentim *et al* (1987) em:  
*Leukocyte Typing III*, Ed. McMichael., pág. 440, Oxford University Press).

10 Anticorpos CD20 exemplares incluem, anticorpos CD20 quimérico, humanizado  
 ou humano, tais como o rituximab, um 2H7 humanizado, anticorpo A20  
 quimérico ou humanizado, tal como Humax-CD20®, anticorpo CD20 humano  
 (Genmab) e proteínas/imunoglobulinas que se ligam a CD20 (Trubion Pharm  
 Inc.).

15 Um anticorpo "intacto" é aquele que compreende uma região  
 variável de ligação ao antígeno, bem como um domínio constante da cadeia  
 leve (CL) e domínios constantes de cadeia pesada, CH1, CH2 e CH3. Os  
 domínios constantes podem ser domínios constantes da sequência nativa (por  
 exemplo, domínios constantes da sequência nativa humana) ou variantes da  
 20 sequência de aminoácido deste.

O anticorpo intacto pode ter uma ou mais "funções efetoras" que  
 refere-se aquelas atividades biológicas atribuídas a região constante Fc (uma  
 sequência nativa da região Fc da ou sequência de aminoácido variante da  
 região variante de Fc) de um anticorpo. Exemplos de funções efetoras do  
 25 anticorpo incluem a ligação do componente C1q; citotoxicidade dependente de  
 complemento; ligação ao receptor de Fc; citotoxicidade mediada por células  
 dependentes de anticorpos (ADCC); fagocitose; regulação negativa "*down  
 regulation*" dos receptores da superfície celular (por exemplo, receptor de

célula B; BCR) e etc.

Dependendo da seqüência de aminoácidos do domínio constante de suas cadeias pesadas, os anticorpos podem ser classificados em diferentes “classes”. Existem cinco classes principais de imunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, e muitas destas podem ainda ser divididas em sub-classes (isotipos), por exemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, e IgA2. Os domínios constantes de cadeia pesada que corresponde as diferentes classes de anticorpos são denominados,  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$ , e  $\mu$ , respectivamente. As estruturas da subunidade e configurações tridimensionais das diferentes classes de imunoglobulinas são bem conhecidas.

O termo “seqüência variante do aminoácido” se refere aos polipeptídeos que têm as seqüências de aminoácido que diferem em alguma extensão de um polipeptídeo de seqüência nativa. Normalmente, a seqüência variante de aminoácido possuirá pelo menos a seqüência aproximadamente 70% idêntica com pelo menos um domínio de ligação do receptor ou pelo menos um domínio de ligação ao ligante de um receptor nativo, e preferivelmente, serão pelo menos aproximadamente 80%, mais preferivelmente, pelo menos aproximadamente 90% de homologia na seqüência com tais domínios de ligação do receptor ou do ligante. As seqüências variantes de aminoácido possuem substituições, deleções e/ou inserções em determinadas posições dentro das seqüências de aminoácidos da seqüência nativa do aminoácido. Os aminoácidos são designados pelos nomes convencionais, e pelos códigos de uma letra e de três letras.

“Identidade da seqüência” é definida como o percentual de resíduos na variante da seqüência de aminoácidos que são idênticos após o alinhamento das seqüências e introdução dos *gaps*, se necessário, para alcançar o percentual de identidade da seqüência máxima. Métodos e programas de computadores para o alinhamento de seqüências são

conhecidos no estado da técnica. Um dos programas de computador é o “Align 2”, da Genentech, Inc., o qual foi depositado com documentação de usuário no *United States Copyright Office*, Washington, DC 20559, em 10 de Dezembro de 1991.

5

### EXPRESSÃO E PRODUÇÃO DE PROTEÍNA

Proteínas recombinantes são expressas pela clonagem do DNA a partir de vetores e métodos conhecidos no estado da técnica. Proteínas para os métodos de purificação com polieletrólito da presente invenção podem ser produzidas a partir de células hospedeiras adequadas como, por exemplo, 10 células procariotas, leveduras, e células eucariotas superiores. Células procarióticas adequadas para esta realização incluem eubactéria, tal como organismos Gram-negativos ou Gram-positivos, por exemplo, Enterobacteriaceae, tal como a *Escherichia*, por exemplo: *E. coli*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella* como, por exemplo, *Salmonella typhimurium*; *Serratia*, por exemplo, *Serratia marcescans*; e *Shigella*, bem como bacilos, como *B. subtilis* e *B. licheniformis* (por exemplo, *B. licheniformis* 41p divulgado no DD 266.710 publicado em 12 de Abril de 1989), *Pseudomonas* como a *Pseudomonas aeruginosa*; e *Streptomyces*. Um clone hospedeiro preferido de *E. coli* é a *E. coli* 294 (ATCC 31.446), embora outras 20 cepas, como a *E. coli* B, *E. coli* X1776 (ATCC 31537) e *E. coli* W3110 (ATCC 27325) sejam adequadas. Estes exemplos são ilustrativos e não limitantes.

Além de procariotos, micróbios eucariotos tais como, fungos filamentosos e leveduras são hospedeiros adequados para a clonagem ou expressão dos vetores que codificam o anticorpo que se liga a CD20. 25 *Saccharomyces cerevisiae* ou fermento comum, é o microorganismo eucarioto mais comumente utilizado entre os microorganismos hospedeiros eucariotos inferiores. Entretanto, uma variedade de outros gêneros, espécies e cepas são comumente disponíveis e úteis para a presente invenção, tal como,

*Schizosaccharomyces pombe*; *Kluyveromyces*; hospedeiros como, por exemplo, *K. lactis*, *K. fragilis* (ATCC 12,424), *K. bulgaricus* (ATCC 16,045), *K. wickerhamii* (ATCC 24,178), *K. waltii* (ATCC 56,500), *K. drosophilarum* (ATCC 36,906), *K. thermotolerans*, e *K. marxianus*; *yarrowia* (EP 402,226); *Pichia pastoris* (EP 183,070); *Candida*; *Trichoderma reesia* (EP 244,234); *Neurospora crassa*; *Schwanniomyces* como, por exemplo, *Schwanniomyces occidentalis*; e fungos filamentosos como, por exemplo, *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolypocladium* e *Aspergillus*, tal como *A. nidulans* e *A. niger*.

Células hospedeiras adequadas para a expressão de anticorpos glicosilados podem ser derivadas de organismos eucariotos multicelulares. Exemplos de células de invertebrados incluem células de vegetais e insetos. Foram identificadas numerosas cepas de baculovírus e células hospedeiras de insetos variantes e correspondentes permissivos a partir de hospedeiros como, *Spodoptera frugiperda* (lagarta), *Aedes aegypti* (mosquitos), *Aedes albopictus* (mosquito), *Drosophila melanogaster* (mosca de fruta) e *Bombyx mori*. Uma variedade de cepas virais para a transfecção está disponível publicamente, por exemplo, a variante L-1 da *Autographa californica* NPV e a cepa Bm-5 da *Bombyx mori* NPV, e esses vírus podem ser usados como o vírus de acordo com a presente invenção, particularmente na transfecção de células da *Spodoptera frugiperda*.

A propagação de células de vertebrados em cultura (cultura de tecidos) tornaram-se um procedimento de rotina. Exemplos de linhagens de células hospedeiras de mamíferos úteis é a linhagem CV1 de rim de macaco transformada por SV40 (COS-7); linhagem de células de rim embrionário humano (293 ou células 293 sub-clonadas para crescimento em cultura de suspensão, Graham *et al.*, (1977) *J. Gen. Virol.* 36:59), células de rim de filhote de hamster (BHK); células de ovário de hamster chinês/-DHFR (CHO, Urlaub *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 77: 4216 (1980)); Mather, (1980) *Biol. Reprod.*

23: 243-251); células de rim de macaco (CV1); células de rim de macaco verde africano (VERO-76); células de carcinoma cervical humano (HELA); células de rim canino (MDCK); células de fígado de rato *buffalo* (BRL 3A); células de pulmão humano (W138); células de fígado humano (Hep G2, HB 8065); tumor mamário de camundongo (MMT 060562); células TRI (Mather *et al.* (1982), *Annals N. Y. Acad. Sci.* 383:44-68); células MRC 5; células FS4; linhagem de hepatoma humano (Hep G2).

As células hospedeiras são transformadas com os vetores de expressão ou clonagem acima descritos para produção de anticorpos e cultivadas em meio nutriente convencional modificado de forma a ser apropriado para a indução dos promotores, seleção de transformantes ou amplificação dos genes que codificam as seqüências desejadas.

As células hospedeiras utilizadas para a produção de anticorpos para os métodos desta invenção podem ser cultivadas em uma variedade de meios de cultura. Meios de crescimento comercialmente disponíveis, tais como o meio Ham's F10 (Sigma), Meio Essencial Mínimo (MEM, Sigma), RPMI-1640 (Sigma), e Meio de Eagle modificado da Dulbecco (DMEM, Sigma) são adequados para o cultivo de células hospedeiras. Além disso, qualquer um dos meios descritos em Ham *et al.*, *Meth. Enzymol.* 58: 44 (1979), Barnes *et al.*, *Anal. Biochem.* 102: 255 (1980), Patente US 4.767.704, US 4.657.866, US 4.927.762, US 4.560.655, US 5.122.469 documentos WO 90/03430; WO 87/00195; ou o pedido de Patente US 30.985, podem ser utilizados como meios de cultura para as células hospedeiras. Qualquer um destes meios pode ser suplementado, se necessário, com hormônios e/ou outros fatores de crescimento (como a insulina, transferrina, ou fator de crescimento epidérmico), sais (como cloreto de sódio, cálcio, magnésio e fosfato), tampões (tal como MES e HEPES), nucleotídeos (tais como a adenosina e timidina), antibióticos (como GENTAMYCINA®), oligoelementos (definidas como compostos

inorgânicos normalmente presentes em concentrações finais na ordem micromolar), e glicose ou uma fonte equivalente de energia. Quaisquer outros suplementos necessários podem também ser incluídos em concentrações adequadas que seria conhecida pelos técnicos no assunto. As condições de cultura tais como, temperatura, pH, e similares são aquelas anteriormente utilizadas com a célula hospedeira selecionada para expressão, e será evidente para o técnico hábil no assunto.

Quando um fluido de cultura de células coletadas contendo a proteína de interesse foi obtido, a sua separação das outras proteínas produzidas pelas células é geralmente tentada usando uma combinação de diferentes técnicas cromatográficas. Estas técnicas separam misturas de proteínas com base na sua carga, grau de hidrofobicidade, ou tamanho. Várias resinas de cromatografia estão disponíveis para cada uma destas técnicas, permitindo uma personalização precisa do esquema de purificação para as proteínas envolvidas. A essência de cada um desses métodos é que a separação das proteínas pode ser causada tanto pelo avanço em diferentes velocidades por uma longa coluna, alcançando uma separação física crescente à medida que elas passam a extremidade inferior na coluna, quanto pela adesão seletiva ao meio de separação, sendo então eluída diferencialmente por diferentes solventes. Em alguns casos, a proteína desejada é separada de impurezas quando as impurezas aderem especificamente na coluna, e as proteínas de interesse não, isto é, a proteína de interesse está presente na fração de escoamento (*flow-through*).

Quando técnicas recombinantes são utilizadas, os anticorpos podem ser produzidos intracelularmente, no espaço periplasmático ou secretados diretamente no meio. Se o anticorpo é produzido de forma intracelular, como uma primeira etapa, os resíduos particulados, tanto de células hospedeiras quanto fragmentos lisados, são removidos, por exemplo,

através de centrifugação ou ultra filtração, tal como anticorpos que são secretados no espaço periplasmático da *E. coli* (Carter *et al* (1992) *Bio/Technology* 10:163-167). A massa celular pode ser descongelada na presença de acetato de sódio (pH 3,5), EDTA, e fenilmetilsulfonil fluorido (PMSF) durante cerca de 30 min. Os detritos celulares podem ser removidos por centrifugação. Quando o anticorpo é secretado no meio, sobrenadantes a partir destes sistemas de expressão são, em geral, primeiramente concentrados através do uso de um filtro de concentração protéico comercialmente disponível, por exemplo, uma unidade de ultrafiltração *Amicon* ou *Millipore Pellicon*. Um inibidor de protease tal como o PMSF pode ser incluído em qualquer uma das etapas acima para inibir a proteólise e antibióticos podem ser incluídos para prevenir o crescimento de contaminantes indesejados.

Métodos tradicionais de purificação de proteínas expressas em células incluem a cromatografia em hidroxil apatita, cromatografia de troca iônica, cromatografia por afinidade, cromatografia por interação hidrofóbica, eletroforese em gel, diálise e combinações destas (Fahrner, RL *et al* (2001) *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* 18: 301-327). A proteína A é comumente usada como um ligante de afinidade, que pode ser imobilizada em diferentes suportes e permite a primeira fase do enriquecimento dos fluido de cultura de células coletadas (HCCF) contendo proteínas expressas. A proteína A é um adsorvente para a cromatografia por afinidade de proteínas, tais como anticorpos, que contêm uma região Fc. A proteína A é uma proteína da parede celular de 41 kD do *Staphylococcus aureas* que se liga com uma afinidade elevada (cerca de  $10^{-8}$  M ao IgG humano) à região Fc de anticorpos (Sulkowski, E. (1987) *Protein Purification: Micro e Macro*, pág. 177-195; Chadha *et al.* (1981) *Preparative Biochemistry* 11(4):467-482; Reifsnnyder *et al* (1996) *J. Chromatography* 753:73-80; Patentes US 6127526; US 6333398). A proteína A



pode ser imobilizada em uma fase sólida, tal como o vidro, sílica, agarose ou poliestireno. A fase sólida pode ser uma coluna de purificação ou uma fase descontínua de partículas discretas, como uma coluna de vidro de poros controlados ou uma coluna de ácido silícico, ou revestida com um reagente (como glicerol), que tem a função de impedir a aderência inespecífica de contaminantes na fase sólida (Patente US 6.870.034). A coluna PROSEP A<sup>®</sup>, comercialmente disponível pela Bioprocessing Limited, é um exemplo de uma coluna de vidro de poro controlado de proteína A que é revestida com glicerol. Outros exemplos de colunas contempladas no presente incluem a coluna POROS 50 A<sup>®</sup> (poliestireno) ou coluna rProtein A SEPHAROSE FAST FLOW<sup>®</sup> (agarose). A cromatografia de fase sólida para a proteína A pode ser equilibrada com um tampão adequado. Por exemplo, o tampão de equilíbrio pode ser 25 mM Tris, 25 mM NaCl, 5 mM EDTA, pH 7,1.

Quando imobilizadas no meio de cromatografia, a proteína A fornece uma técnica para purificar anticorpos recombinantes, porque estas podem se ligar seletivamente anticorpos nas soluções complexas, permitindo que impurezas, como proteínas da célula hospedeira e pequenas moléculas na fração de escoamento (*flow through*). A disponibilidade da proteína A como um ligante por afinidade depende das espécies e isotipos de qualquer domínio Fc de imunoglobulina que está presente no anticorpo. A proteína A pode ser utilizada para purificar anticorpos que são baseados nas cadeias pesadas humanas  $\gamma 1$ ,  $\gamma 2$  ou  $\gamma 4$  (Lindmark *et al.*, *J. Immunol. Meth.* 62:1-13 (1983)). A proteína G é recomendada para todos os isotipos de camundongos e para a  $\gamma 3$  humana (Guss *et al.*, *EMBO J.* 5:1567-1575 (1986)). A matriz ao qual o ligante de afinidade é acoplado é mais freqüentemente, agarose, mas também são disponíveis outras matrizes. Matrizes mecanicamente estáveis tais como vidro com poros controlados ou poli(estireno-divinil)benzeno permitem velocidade de fluxo mais rápidas e tempo de processamento mais curto do que os que podem

ser alcançados com agarose. Quando o anticorpo compreende um domínio  $C_H3$ , a resina Bakerbond ABX<sup>®</sup> (J. T. Baker, Phillipsburg, NJ) é útil para purificação. Outras técnicas para a purificação de proteína tais como fracionamento em uma coluna de troca iônica, precipitação em etanol, HPLC de fase reversa, cromatografia em sílica, cromatografia em heparina SEPHAROSE<sup>®</sup>, cromatografia em uma resina de troca catiônica ou aniônica (tal como uma coluna de ácido poliaspártico), cromatofocusação, SDS-PAGE, e precipitação em sulfato de amônio também estão disponíveis dependendo do anticorpo a ser recuperado.

#### POLIELETRÓLITOS

Polieletrólitos são polímeros solúveis em água compostos de unidades monoméricas carregadas. As unidades monoméricas de um polieletrólito da presente invenção carregam um grupo eletrólito (funcionalidade carregada) que sofre dissociação de prótons (ionização) em soluções aquosas de acordo com a acidez (pH). Exemplos de funcionalidade de carga de polieletrólitos incluem, mas não estão limitados a, ácido sulfônico, fosfônico e carboxílico, e aminas, e seus respectivos íons: sulfonado, fosfonato, carboxilato e amônio. A dissociação atinge a força iônica e a condutividade elétrica da solução.

Polieletrólitos úteis para os métodos da presente invenção podem ter um peso molecular variando entre cerca de mil (1000) daltons (Da) a cerca de um milhão (1.000.000) de daltons. Os polieletrólitos da invenção podem ser utilizados como uma mistura de certo tipo de repetição de unidade monomérica, mas com uma ampla gama de comprimentos de cadeia, ou seja, um intervalo de peso molecular de cerca de 1200 daltons (Da) a cerca de um milhão (1.000.000) daltons. A mistura pode estar em um intervalo reduzido, por exemplo, cerca de 1200 Da a cerca de 2400 Da, ou cerca de 4000 Da a cerca de 8.000 Da. O peso molecular médio e o perfil da distribuição do peso

molecular podem ser controlados sob certas condições de polimerização das unidades monoméricas, tal como a concentração, iniciador de polimerização ou catalisador, temperatura ou tempo. O peso molecular médio e o perfil da distribuição do peso molecular de um polieletrólito pode também ser selecionados sob determinados métodos de purificação preparativos.

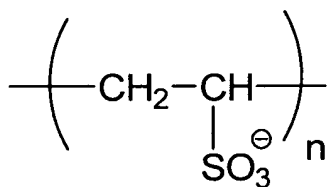
Polieletrólitos aniônicos, carregados negativamente, e polieletrólitos catiônicos, carregados positivamente, podem ser utilizados na reação de precipitação. Quando o pH da solução é inferior ao pI de um anticorpo específico, o anticorpo é carregado positivamente. Sob estas condições, um polieletrólito catiônico pode precipitar impurezas e deixar o anticorpo de interesse na solução. Inversamente, um polieletrólito aniônico pode precipitar o anticorpo formando um precipitado proteína-polieletrólito, deixando as impurezas na solução. Outros fatores na seleção de polieletrólitos para os métodos da presente invenção incluem a estabilidade e reatividade dos grupos funcionais, o peso molecular, densidade de carga e rigidez da cadeia.

Os polieletrólitos da presente invenção incluem poliamfólitos que comportam ambas funcionalidades carregada catiônica e aniônica.

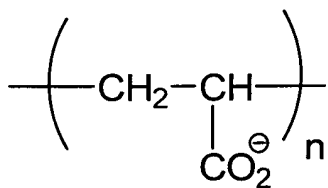
Exemplos de polieletrólitos poliânion da presente invenção incluem: ácido poliacrílico (PAA), polivinilsulfonato (PVS), ácido poliestireno sulfônico (PSS, poli (4-vinilbenzeno sulfonato sal metálico)), polimetacrilato (PMA), poliacrilamidametilpropanosulfonato (PAMPS), carboximetilcelulose (CMC), copolímero de estireno-anidrido maleico (MAS, copolímero anidrido maleico vinil metil éter (MAVE), poliaspartato, poliglutamato, dextran sulfato, pectina, alginato e glicosaminoglicanos, como o sulfato de condroitina, heparina/ heparan sulfato e ácido hialurônico e todos os sais e copolímeros destes.

Ácido poliacrílico (PAA) e ácido polivinilsulfônico (PVS), e os seus ânions, poliacrilato e polivinilsulfonato, respectivamente, são polieletrólitos úteis

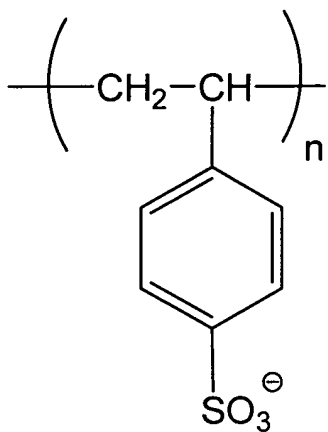
para os métodos da presente invenção. PAA tem propriedades estruturais semelhantes a do PVS. Ambos são polímeros e possuem a estrutura principal de carbono linear. Os dois polieletrólitos diferem em seus grupos funcionais. PVS tem um grupo funcional ácido sulfônico, dando a ele um pKa de aproximadamente um. Em contrapartida o PAA tem um grupo funcional ácido carboxílico e uma pKa de aproximadamente cinco. PVS está disponível em um único peso molecular determinado por ser uma média de 1800 Da por exclusão de tamanho, onde a média  $n$  é de cerca de 10/20, com a detecção por dispersão de luz dinâmica. PAA é comercialmente disponível em diversos pesos moleculares, incluindo 1200 e 8000 onde a média  $n$  é de cerca de 15-20 e 100-120, respectivamente. PAA e PVS foram adquiridos pela Sigma-Aldrich Co, St. Louis MO, Polysciences Inc., Warrington, PA, e Carbomer, Inc., San Diego, CA.



Ácido Polivinilsulfonato (PVS)



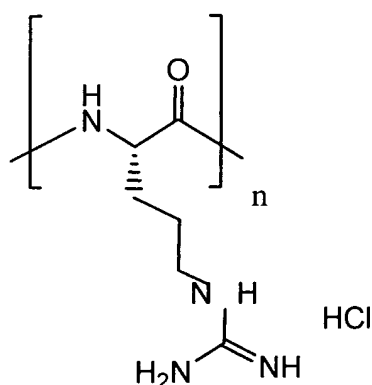
Ácido Poliacrílico (PAA, poliacrilato)



Polistireno sulfonato (PSS)

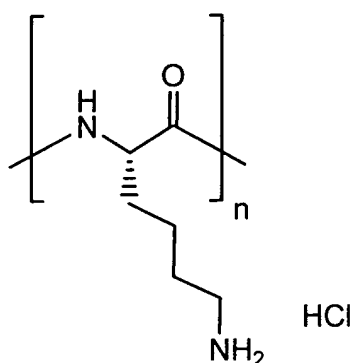
Exemplos de polieletrólitos policatiônicos, carregados

positivamente, da presente invenção incluem: poliarginina (PLA, incluindo cloridrato de poli-L-arginina: Sigma-Aldrich P-4463, 5-15 kDa PM, P-7762 PM 15-70 kDa, P-3892, PM >70 kDa, CAS N° 26982-20-7, e poli-L-arginina sulfato, Sigma-Aldrich P-7637 PM 15-50 kDa, CAS N° 26700-68-5); polilisina (por exemplo, cloridrato de poli-L lisina CAS N°: 26124-78-7, Sigma-Aldrich: P-2658 PM 15-30 kDa, CAS N° 26124-78-7, PL, Jacobson, BS e Branton, D. (1977) *Science* 195, 302), poliornitina (por exemplo, poli-L-ornitina, Sigma-Aldrich P-2533 PM 15-30 kDa, CAS N° 26982-21-8), polivinilguanidina (poli(vinilguanidina), Patente US 6.087.448), cloreto de poli-dialil-dimetil-amônio, poli(N-etil-4-vinilpiridiniobrometo), cloreto de polimetil-acrilamido-propil-trimetil-amônio, cloreto de polivinil benzil-trimetil-amônio e polihistidina.



Poliarginina (cloridrato de poli-L-

arginina)



Polilisina (cloridrato de poli-L-lisina)

15

## **PRECIPITAÇÃO EM POLIELETRÓLITO NA PURIFICAÇÃO DE ANTICORPOS**

### **MONOCLONAIS**

A precipitação com polieletrólito pode ser usada para separar

anticorpos de impurezas durante a purificação. Estas impurezas incluem impurezas de células hospedeiras tais como proteínas de CHO (CHOP) e proteínas de *E. coli* (ECP), componentes da cultura celular como a insulina, a gentamicina, DNA, impurezas de processos tais como proteína A lixiviada, e

5 impurezas relacionadas a estes produtos como anticorpos agregados e fragmentos. A etapa de precipitação pode servir como um substituto para separações por cromatografia existentes. Alternativamente, a precipitação de proteínas em polieletrólito pode ser utilizada como uma etapa de captura direta a partir do fluido de cultura celular coletado (HCCF) de cultura de células

10 eucarióticas ou procarióticas, ou como uma etapa de purificação intermédia. Além disso, a precipitação em polieletrólito pode ser usada como uma etapa de clarificação na purificação de proteínas, clarificando o fluido da cultura celular, incluindo o HCCF. Polieletrólitos podem formar um material floculento em uma cultura celular fluida que resolve e permite uma clarificação, enriquecimento,

15 precipitação ou purificação rápida e eficaz das misturas contendo uma proteína, tal como um anticorpo expresso em cultura de células eucarióticas ou procarióticas. Métodos de purificação de polieletrólitos da presente invenção podem substituir operações de coleta, como as operações de centrifugação, filtração e cromatografia. Os métodos de purificação com polieletrólito da

20 presente invenção fornece de maneira surpreendente e inesperada benefícios na purificação de proteínas, tais como anticorpos.

As condições a serem otimizadas para a precipitação em polieletrólito inclui pH, condutividade, tampões, concentração protéica, concentração de polieletrólito, bem como a velocidade e tipo de agitação, e a

25 taxa de adição do polieletrólito.

A precipitação pode ser realizada em um reator com agitação. O pH e a condutividade do *pool* de anticorpo pode ser ajustado para atingir condições baseadas nas condições ótimas identificadas a partir de curvas de

solubilidade. O polieletrólito é adicionado e misturado. A taxa e o tipo de agitação podem influenciar na eficiência da precipitação e tempo do precipitado. A precipitação resulta da adição do polieletrólito. O precipitado é separado do sobrenadante utilizando filtração ou centrifugação. Para a precipitação do polieletrólito aniônico quando é utilizada a filtração, o precipitado é lavado com tampão de lavagem. O precipitante compreendendo um anticorpo seria posteriormente re-suspenso e processado subsequente. Também pode ser possível realizar a precipitação em linha, ou seja, sem um recipiente de mistura, onde o *pool* de anticorpo seria ajustado para o pH alvo e a polieletrólito seria então acrescentado. A precipitação completa não ocorreria até que o *pool* fosse diluído, o que poderia ser realizados em linha, tanto em um aparelho de filtração quanto na centrífuga. Alternativamente, após ajuste do *pool* de anticorpo para o pH alvo, a diluição seria realizada em linha, seguido pela adição em linha do polieletrólito antes do aparelho de filtração ou centrifugação.

Em uma ilustração, o hormônio de crescimento humano (pl 5,2), quando cristalizado ou precipitado em um tampão de pH 7, seria carregado negativamente e, portanto, iria interagir ou complexar com polieletrólitos catiônicos. Do mesmo modo, os anticorpos monoclonais, tais como o trastuzumab e o rituximab, com pls superior a 9, seriam capazes de se complexarem com polieletrólitos aniônicos em tampões neutros. A estimativa de uma carga líquida de proteína pode ser calculada uma vez que a sequência de aminoácidos é determinada por programas disponíveis publicamente. Proteínas ácidas, são aquelas proteínas que possuem um elevado teor de ácido aspártico (pKa 4,5) e ácido glutâmico (pKa 4,5), normalmente têm pls menores que 6 a 6,4. Por outro lado, proteínas básicas, são aquelas proteínas com um elevado teor de histidina (pKa 6,2), lisina (pKa 10,4) e arginina (pKa 12), normalmente têm pls maiores que cerca de 7,5 a 8. Em contraste com

ambas, proteínas neutras normalmente são aquelas com quantidades similares de resíduos de aminoácidos ácidos e básicos, que possuem pls neutros (pls estão tipicamente entre cerca de 6,5 a 7,4).

Embora não seja uma lista abrangente, alguns exemplos de pl para diferentes proteínas terapêuticas são as seguintes: eritropoetina humana recombinate (pl 4); dornase alfa, rhDNase (PULMOZYME®) (pl 5); etanercept (Enbrel®) (pl 5,1); insulina (pl 5,4); fator estimulador de colônia granulocítica (pl 5,5-5,9), TNF-alfa (pl 5,6); fibrolase (pl 6,7), IL-1 beta (pl 6,9); ativador do plasminogênio tecidual recombinate (pl 6,5-8,5); Orthoclone OKT3 (pl 6,7-7,2), fator VIII (pl 7-7,6); somatotropina bovina (pl 7,4); Interleucina 2 (pl 7,44); fator de crescimento semelhante a insulina 1 (pl 8,4) e aprotinina (pl 10,5).

O método de precipitação em polieletrólito aniônico foi avaliado como o método de substituição para a etapa de troca catiônica (SPSFF) para vários anticorpos exemplares (anti-CD20 rhuMab 2H7, rhuMab DR5 Apomab e anti-cMet), e também como um substituto para a etapa de proteína A (Prosep VA) para o rhuMab 2H7 (ocrelizumab). Outros anticorpos, e outras proteínas, podem ser purificados pelos métodos de precipitação em polieletrólito descritos no presente. As curvas de solubilidade foram utilizadas para identificar as condições de precipitação eficaz ou ótima (pH, condutividade e concentração de polímero) para os três anticorpos. Uma etapa de precipitação em polieletrólito demonstrou a capacidade de reduzir as proteínas da célula hospedeira, tal como proteínas das células de Ovário de Hamster Chinês (CHOP) e proteínas de *E. coli* (ECP), proteína A lixiviada, pequenas moléculas, como a insulina e gentamicina, bem como fragmentos e agregados de anticorpos. A etapa de precipitação em polieletrólito não teve um impacto negativo sobre a atividade biológica do 2H7 quando mensurada pela atividade CDC. Polieletrólito PVS foi removido do precipitado de proteína para um nível menor que 1µg/mL utilizando a cromatografia de troca aniônica (QSFF).



As diversas séries de etapas do processo são ilustradas nos diagramas de fluxo das Figuras 1-3. As etapas foram combinadas e omitidas para a avaliação de seus resultados na purificação da proteína e eficiência do processo. Um processo padrão atualmente praticado no estado da técnica para a purificação de proteínas expressas a partir de fluido de cultura de células coletadas (HCCF) utiliza três etapas de cromatografia: (1) uma captura em proteína A (Prosep VA), (2) de troca catiônica (SPSFF) e (3) de troca aniônica (QSFF), exibido como a coluna da esquerda na Figura 1. A purificação foi tentada por captura em proteína A seguida diretamente pela troca aniônica (coluna central, Figura 1). A etapa de troca catiônica pode ser substituída pela etapa de precipitação PVS em pH 7 (coluna da direita, Figura 1). O fluido da cultura de célula coletadas pode ser processado sem a captura em proteína A por uma primeira troca catiônica seguido diretamente pela troca aniônica (coluna da esquerda, Figura 2), ou por precipitação PVS em pH 7 seguida pela etapa de troca aniônica (coluna da direita, Figura 2). A precipitação em polieletrólito pode ser realizada como uma captura direta do HCCF, seguido pela cromatografia de troca aniônica e então pela cromatografia de troca catiônica (Figura 3). A precipitação em polieletrólito foi realizada em pH 5 (coluna da esquerda, Figura 3) e em pH 7 (coluna da direita, Figura 3).

#### **SELEÇÃO DAS CONDIÇÕES DE PRECIPITAÇÃO PARA UM ANTICORPO ANTI-CD20, RHUMAB 2H7**

Curvas de solubilidade foram geradas para o anticorpo monoclonal anti-CD20 humanizado recombinante, rhuMab 2H7, sobre uma variedade de forças iônicas. As curvas de solubilidade é um gráfico de proteína residual deixada no sobrenadante após precipitação (expresso como uma porcentagem) *versus* a concentração de PVS, expresso em moles de PVS/moles de anticorpo. As curvas de solubilidade foram geradas para o *pool* de proteína A em pH 5 e pH 7 (Figuras 4 e 5), *pool* de SPSFF (Figura 6),

quando usado como uma etapa de captura direta em pH 7 e para HCCF em pH 5 e pH 7 (Figura 7 ). Estas curvas foram utilizadas para selecionar o pH, força iônica e concentração de PVS em nas quais as precipitações em escala preparativas seriam realizadas.

#### 5                    PRECIPITAÇÃO DO *POOL* DE PROTEÍNA A (FIGURA 4 E FIGURA 5)

Com a concentração de PVS crescente, houve precipitação imediata em pH 5, como indicado por uma diminuição na percentagem de anticorpo restantes na solução - $C/C_0$ , ou seja, a concentração de anticorpos na solução dividido pelo total de anticorpos (Figura 4).  $C/C_0$  (%) é a percentagem  
10 (%) de proteínas não precipitadas divididas pela proteína inicial. Quando  $C/C_0$  (%) é 0% , então há uma precipitação completa.

Ao diminuir a força iônica, foi possível alcançar um maior nível de precipitação (4,7 mS/cm *versus* 3,0 mS/cm onde é mS é *milisiemens*, uma unidade de condutividade). Em pH 7, uma diluição foi necessária para se  
15 alcançar uma precipitação significativa (Figura 5). Com a diminuição na condutividade, houve um aumento na precipitação. A completa precipitação foi observada em uma condutividade de 0,7 mS/cm. Em uma condutividade específica, uma vez que o nível máximo de precipitação foi observado, a adição de mais PVS causou a redissolução do precipitante.

20                    A precipitação do *pool* SPSFF (Figura 6) e HCCF (Figura 7): Tendências semelhantes foram observadas com o *pool* SPSFF e HCCF. Com a diminuição na condutividade, houve um aumento na precipitação. Em uma condutividade específica, uma vez que o nível máximo de precipitação foi observado, a adição de mais PVS causou a redissolução do precipitante.

#### 25                    AVALIANDO O IMPACTO DO PESO MOLECULAR DO POLIELETROLITO

Curvas de solubilidade foram geradas também comparando PVS e PAA. As curvas de solubilidade são gráficos de proteína residual deixada no sobrenadante após precipitação (expresso como uma percentagem) *versus* a

concentração de polieletrólito expresso em moles de polieletrólito/moles de anticorpo. Curvas de solubilidade para o PAA (1200 e 8000 Da) e PVS (1800 Da), sobre uma gama de equivalente de polieletrólito por anticorpo anti-CD20 (rhuMab-2H7, pI 9,0, 150 kDa), medido em pH 5 (Figura 8) e pH 7 (Figura 9).

5 As formas de PAA de peso molecular maiores (8000 Da), levou a uma maior precipitação em pH 5 e um valor de condutividade de 5mS/cm (Figura 8), em comparação com os polieletrólitos PAA e PVS de menor peso molecular, (1200 Da) e (1800 Da), respectivamente (Figura 8). Uma tendência similar foi observada em pH 7,1; 1,5 mS/cm (Figura 9). As formas de PAA de peso  
10 molecular maiores 8000 Da, levou a uma maior precipitação em pH 7 e um valor de condutividade de 1,5 mS/cm quando comparado com os polieletrólitos de menor peso molecular, PAA 1200 Da e PVS 1800 Da. A unidade básica de condutância é o siemen (S), anteriormente denominada mho. As medições de condutividade são dependentes da temperatura. Os valores de condutividade  
15 são expressos em mS/cm. Em ambos os casos, os polieletrólitos PAA maiores tinham uma gama de funcionamento mais estreita em termos de concentração de polieletrólito necessário para alcançar a precipitação máxima antes que uma nova adição de polieletrólito causasse a redissolução do precipitante. O aumento do peso molecular do polieletrólito pode permitir que a precipitação  
20 seja realizada em condutividades maiores.

O efeito do peso molecular do polieletrólito na precipitação de um anticorpo anti-CD20 (rituximab) em pH 7 e 1,5mS/cm foi investigada com PAA dentro de um intervalo de peso molecular de 1200 Da a 1.100.000 Da (Figura 10). O aumento do peso molecular resultou em um aumento da precipitação  
25 sob estas condições. Em pH 7 e 1.5mS/cm a completa precipitação não foi alcançada até que um PAA com um peso molecular superior a 35.000 Da (35 kDa) foi utilizado.

O efeito do peso molecular do polieletrólito na precipitação de um

anticorpo humanizado anti-CD20 em pH 7 e 12 mS/cm foi investigado com Poliestireno Sulfonado dentro de um intervalo de peso molecular de 1800 Da a 1.132.000 Da (Figura 33). Curvas de solubilidade foram geradas para a precipitação PSS do anticorpo humanizado anti-CD20 sobre uma este intervalo de peso molecular. O aumento do peso molecular resultou em um aumento da precipitação sob estas condições. Em pH 7 e 12 mS/cm a completa precipitação não foi alcançada até que um PSS com um peso molecular superior a 220.000 Da (220 kDa) foi utilizado. O uso do PSS permite que a precipitação a seja realizada em uma maior condutividade e minimiza a necessidade de baixar a condutividade/força iônica do *pool* para atingir a precipitação completa.

O efeito do peso molecular do polieletrólito na depuração de impurezas foi mensurado sob as condições da Tabela 1 e o resultado do processamento subsequente estão apresentados na Tabela 2. Após a etapa de precipitação, o PAA 8000 Da tinham níveis mais elevados de proteína das células de ovário de hamster chinês (CHOP) do que o PAA 1200 Da ou PVS (Tabela 2). No *pool* QSFF níveis similares de CHOP foram observados em todos os grupos independentemente do peso molecular do polieletrólito utilizado na purificação. Ambos os pesos moleculares do PAA reduziu a proteína A lixiviada e fragmentos de anticorpos a níveis semelhantes e não tiveram um impacto negativo sobre os níveis de agregados.

**TABELA 1**

**CONDIÇÕES DE PRECIPITAÇÃO DO PAA**

P.M. PAA	pH do <i>Pool</i>	Condutivida de do <i>Pool</i>	PAA (%)	PAA (mol)	Anticorpo 2H7 (mg/ml)	Anticorpo 2H7 (mol)	mol PVS/mol 2H7
1200	5	3,05	0,1	8,88E- 05	3,46	2,53E-06	35
1200	7	0,78	0,01 25	5,82E- 05	0,66	2,52E-06	23

P.M. PAA	pH do Pool	Condutivida de do Pool	PAA (%)	PAA (mol)	Anticorpo 2H7 (mg/ml)	Anticorpo 2H7 (mol)	mol PVS/mol 2H7
8000	5	4,99	0,1	7,38E- 06	5,94	2/40E-06	3
8000	7	1,53	0,01 25	3,83E- 06	1,31	2,20E-06	2

**TABELA 2****RESUMO DOS RESULTADOS DO PROCESSAMENTO SUBSEQÜENTE**

Polieletrólito	pH (-)	Etapa (-)	Produto (%)	CHOP (ng/mg)	Proteína A (ng/mg)	Agregado (%)	Monômero (%)	Fragmento (%)
PAA	5	ProA	N/A	1098	5	0,63	99,14	0,24
		Q	100	25 (16)	3	0,64	99,13	0,23
P.M 1200 (Da)	5	ProA	N/A	1098	5	0,63	99,14	0,24
		PAA	82	117	<2	0,69	99,22	0,09
		Q	100	2.0	<2	0,55	99,38	0,07
	7	ProA	N/A	1098	5.0	0,63	99,14	0,24
		PAA	80	163	< 2	0,73	99,18	0,09
		Q	99	1.7	< 2	0,64	99,25	0,10
P.M. 8000 Da	5	ProA	N/A	1098	5	0,63	99,14	0,24
		PAA	90	302	<2	0,80	99,05	0,15
		Q	103	2.6	<2	0,58	99,33	0,09
	7	ProA	N/A	1098	5	0,63	99,14	0,24
		PAA	90	390	< 2	0,81	99,08	0,11
		Q	100	2.3	< 2	0,65	99,25	0,10

Polieletrólito	pH (-)	Etapa (-)	Produto (%)	CHOP (ng/mg)	Proteína A (ng/mg)	Agregado (%)	Monômero (%)	Fragmento (%)
PVS	pH 7	ProA	N/A	1105	23	0,80	98,92	0,27
P.M. 1800 Da		PVS	100	244	4.0	0,74	99,21	0,04
		Q	92	1.1	2	0,68	99,29	0,03

### PURIFICAÇÃO DO ANTICORPO ANTI-CD20

A precipitação de polieletrólito foi inicialmente avaliada como um substituto para a etapa de cromatografia de troca catiônica. A função principal da etapa de troca catiônica é reduzir as impurezas de célula hospedeira, remover proteína lixiviadas, gentamicina, DNA e reduzir agregados de anticorpos, se presentes (Figura 11). A insulina é removida pela etapa anterior de proteína A. A etapa de precipitação PVS reduz CHOP para níveis semelhantes ao da etapa SPSFF. Ele também reduziu proteína A lixiviada e fragmentos de anticorpo. Houve uma redução na precipitação gentamicina através da etapa de precipitação embora não na mesma extensão que a etapa SPSFF. O teste de DNA, não funciona na presença de depuração com PVS e PVS utilizado durante a etapa de precipitação e não pôde ser avaliado. A adição da etapa de precipitação não aumentou agregados de anticorpo ou teve impacto na atividade biológica como mensurado pela atividade CDC (Figura 11 e Tabela 3).

A fim de fornecer matéria-prima mais interessante, o HCCF foi processado sobre uma coluna SPSFF. O *pool* SPSFF tinha a 4 vezes mais CHOP do que o *pool* de proteína A quando usado como a etapa de captura inicial (Figura 11). A % de fragmento também foi maior que o processo de captura com proteína A (9,24% *versus* 0,24%). É provável que uma protease co-purificada com o anticorpo através de uma etapa de troca catiônica resulte no recorte (*clipping*) do anticorpo. A etapa de precipitação PVS reduziu os

fragmentos em 5,63%. A CHOP foi reduzida para 4,1 ng/mg através do processo, em comparação com 71 ng/mg, sem uma etapa de precipitação. A gentamicina também foi significativamente reduzida pela etapa de precipitação (de 146 para 8 ng/mg). A insulina e o DNA foram reduzidos para níveis mais baixos pela etapa de captura SPSFF inicial, assim seus *clearances* não puderam ser avaliados. Os níveis elevados de fragmento na operação controle (SPSFF-QSFF) resultaram em uma redução na atividade CDC de 87% (Tabela 3). Em contrapartida, a operação com o precipitado PVS manteve a atividade CDC em 100%.

A etapa PVS também foi avaliada como uma etapa de captura direta do HCCF. A etapa de precipitação PVS em pH 7 removeu a insulina (Figura 11). Em contrapartida, a etapa de precipitação PVS em pH 5 reduziu apenas parcialmente os níveis de insulina. A precipitação PVS em pH 7 removeu 3 vezes mais proteínas da célula hospedeira do que a precipitação em pH 5. A substituição da etapa final SPSFF com um método de cromatografia ortogonal tal como uma etapa de interação hidrofóbica pode adicionalmente reduzir as impurezas das células hospedeiras. Com a captura em pH 5, houve um aumento de 4,66% em fragmentos de anticorpo através da etapa de troca catiônica. Isto não ocorreu com a etapa de captura em pH 7. Isto pode sugerir que em pH 5 (muito parecido com a etapa de captura SPSFF), uma protease ácida foi co-purificada causando um aumento de fragmentos de anticorpos. A adição da etapa de precipitação não teve impacto na atividade biológica como mensurado pela atividade CDC (Tabela 3). Os *pools* Q foram analisados por suas atividades biológicas/potência utilizando um ensaio de citotoxicidade dependente de complemento (CDC). Este ensaio é baseado na medição da capacidade do rhuMAb 2H7 de lisar células WIL2-S na presença de complemento humano.

**TABELA 3****O EFEITO DA PRECIPITAÇÃO PVS SOBRE A ATIVIDADE CDC**

<b>Amostra</b>	<b>Atividade Específica (%)</b>	<b>Desvio Padrão (%)</b>
Controles:		
HCCF- Proteína A-SPSFF- QSFF	99	2
HCCF- Proteína A-QSFF	102	2
HCCF-SPSFF-QSFF	87	10
Precipitação PVS:		
HCCF- Proteína A-PVS7-QSFF	101	5
HCCF-SPSFF-PVS7-QSFF	100	5
HCCF-PVS5-QSFF-SPSFF	96	5
HCCF-PVS7-QSFF-SPSFF	95	0

O *clearance* de polieletrólito (remoção de polieletrólito a partir do anticorpo ressuspenso) foi determinado usando um ensaio FRET (Transferência de Energia por Ressonância de fluorescência) baseado na inibição da RNase A. PVS é um potente inibidor da RNase A. O teste utiliza um RNA análogo com um marcador fluorescente em uma extremidade e um apagador na outra. Uma vez que o RNA análogo é clivado pela RNase A, o marcador fluorescente é liberado a partir do apagador produzindo emissão. A presença do PVS irá inibir a atividade da RNase A , limitando a emissão de fluorescência. A quantidade de PVS pode então ser determinada por comparação da fluorescência observada a partir de uma amostra por uma curva padrão. Em todos os casos, o PVS foi depurado a menos de 1 mg/μl na



cromatografia QSFF (Tabela 4).

**TABELA 4**

**QUANTIFICAÇÃO DA DEPURAÇÃO DE PVS APÓS A PRECIPITAÇÃO DO ANTICORPO**

**ANTI-CD20 (2H7)**

Sample	Fluorescência (URF)	PVS (mg/ml)
<i>Pool Q</i> Controle	279	< 1
(ProA-SP-Q)		
Q carregado com PVS (média)	40	606
<i>Pools Q</i>		
ProA-PVS-Q	281	< 1
HCCF-PVS 5-Q	290	< 1
HCCF-PVS 7-Q	283	< 1

5

**PURIFICAÇÃO DE RHUMAB DR5 APOMAB**

Um processo de precipitação em polieletrólito foi desenvolvido e aplicado para a purificação do anticorpo rhuMab DR5 Apomab (pI 8,0, 150 kDa). As proteínas do Receptor-5 Contendo o Domínio de Morte (DR5) são membros da família de receptores do fator de necrose tumoral (TNF) (US 6.872.568; US 6.743.625). O processo de cromatografia padrão utiliza resinas Prosep vA, SPSFF e QSFF. O processo de precipitação em polieletrólito foi modificado para remover uma problemática proteína impura da célula hospedeira, a glutathione-S-transferase (GST). A etapa Prosep vA tinha uma lavagem em 0,5M TMAC, pH 5, em contraposição a lavagem em 0,4M de fosfato pH 7. A etapa SPSFF é eluída em um gradiente superficial dando um volume de *pool* de aproximadamente 12 volumes de coluna. A precipitação PVS foi avaliada como um substituto para a etapa SPSFF. As curvas de solubilidade foram geradas sobre uma variação de pH de 5,5 a 7,0. Com um

10

15

pH crescente, uma diluição para reduzir a força iônica foi necessária para se alcançar uma precipitação completa (Figura 12 e 13). Na Figura 12, uma diluição para reduzir a força iônica com um aumento de pH foi necessária para se alcançar a precipitação completa. Em pH 5,5 e uma condutividade de 5,1 mS/cm foi observada uma precipitação completa. Entretanto, em pH 6 foi necessário diluir o *pool* a 3 mS/cm para se atingir a precipitação completa. Na Figura 13, uma diluição para reduzir a força iônica com um aumento de pH foi necessária para se alcançar a precipitação completa. Em pH 6,5, a precipitação completa foi observada a 1,5 mS/cm. Em pH 7, foi necessário diluir o *pool* para 0,7 mS/cm para se atingir a precipitação completa.

Uma vez que a precipitação completa foi alcançada, a adição de mais PVS causou a redissolução do precipitante. Este efeito é ilustrado pelas fotografias na Figura 14. A Figura 14 ilustra o efeito da precipitação de PVS 0,1% (p/v) em um balão de Apomab em solução, e a redissolução em PVS 1% (p/v). As curvas de solubilidade foram utilizadas para selecionar as condições de precipitação descritas na Tabela 5. A precipitação PVS foi realizada entre pH 5.5 e pH 7.0. Com o aumento de pH, houve uma ligeira diminuição no rendimento, mas uma melhora na depuração do CHOP e proteína A lixiviada (Tabela 6). Estes *pools* foram subsequentemente processados em uma coluna QSFF e comparados com o controle realizado (Tabela 6). Uma etapa SPSFF ou etapa de precipitação PVS foi necessária para depurar a CHOP a  $< 0,79$  ng/mg e para depurar a proteína A lixiviada a  $< 2$  ng/mg *versus* 17 ng/mg de CHOP e 4 ng/mg de proteína A lixiviada no controle executado sem uma etapa SPSFF ou etapa de precipitação. A precipitação PVS também demonstrou a capacidade de reduzir GST, mas não ao mesmo nível que a etapa SPSFF.

**TABELA 5****CONDIÇÕES DE PRECIPITAÇÃO DO APOMAB**

pH do <i>Pool</i> (-)	Codutividade do <i>Pool</i> (mS/cm)	PVS (%)	mol PVS/mol Ab
5,5	5,1	0,100	18
6,0	3,0	0,100	35
6,5	1,5	0,100	70
7,0	0,8	0,100	177

**TABELA 6****PURIFICAÇÃO DO APOMAB – RESULTADOS DO PROCESSAMENTO SUBSEQÜENTE DOS**

5

**POOLS INTERMEDIÁRIOS DE APOMAB (A) E POOLS QSFF (B)**

(a) <i>Pools</i> Intermediários	<i>Pool</i> Pro A	<i>Pool</i> SP	<i>Pool</i> de PVS precipitado*			
			pH 5,5	pH 6,0	pH 6,5	pH 7,0
Produto (%)	N/A	89	95	94	92	91
CHOP (ng/mg)	507	24	223	212	173	121
GST (ng/mg)	121	< 180	< 78	< 79	< 80	< 81
Proteína Lixiviada (ng/mg)	8	< 2	3	2	2	< 2

(b) Q <i>Pools</i>	<i>Pool</i> Pro A	Controles		Pro A-PVS-Q			
		(PA-Q)	PA-SP-Q	pH 5,5	pH 6,0	pH 6,5	pH 7,0
Produto (%)	N/A	100	94	99	101	101	99
CHOP (ng/mg)	507	17 (3)	< 0,30	< 0,74	< 0,75	< 0,77	< 0,79
GST (ng/mg)	121	126	4	69	68	82	80
Proteína Lixiviada (ng/mg)	8	4	< 2	< 2	< 2	< 2	< 2

**PURIFICAÇÃO DO ANTI-cMET**

Curvas de solubilidade foram geradas para anti-cMet sobre uma

faixa de pH e forças iônicas determinadas devido à disponibilidade de material limitada. As curvas de solubilidade foram geradas a partir do *pool* de proteína A ajustado a um pH 4 - pH 7 (Figura 15). Estas curvas foram utilizadas para selecionar o pH, força iônica e concentração de PVS nas  
5 quais as precipitações em escala preparativas seriam realizadas. Em pH 4 e condutividade de 2 mS/cm o anti-cMet totalmente precipitado a partir da solução em uma relação molar PVS:Ab maior que 40 (Figura 15). Em pH 5, as curvas de solubilidade foram obtidas em condutividades de 1 mS/cm e 2,4 mS/cm. Na condutividade maior o anti-cMet não foi totalmente  
10 precipitado da solução. Ao baixar a condutividade da solução para 1 mS/cm, o anti-cMet precipitou-se mais facilmente a partir da solução. Nesta condutividade a precipitação máxima ocorreu em uma relação molar de PVS:Ab de 100. Em relações molares superiores a 100 o complexo polieletrólito teve a solubilidade aumentada, provavelmente devido aos  
15 efeitos de repulsão carga-carga do polieletrólito. Uma comparação das curvas de solubilidade em pH 4 e pH 5, condutividade de ~ 2 mS/cm sugere que os efeitos da proteção eletrostática pela solução contra íons influencia o pH no qual ocorre a separação da fase principal e uma diminuição na força iônica da solução é necessária em um pH aumentado.  
20 Em pH 6 e pH 7 e condutividades da solução a 0,5 mS/cm, o anti-cMet não precipita totalmente da solução nas concentrações de PVS testadas. A precipitação máxima de 21% ( $C/Co = .79$ ) e 12% ( $C/Co = .88$ ) ocorreu em pH 6 e pH 7, respectivamente. A curva de solubilidade do anti-cMet em pH 6 e pH 7 é significativamente diferente comparada a de anticorpos  
25 humanizados de comprimento total com uma *pI* de proteína similar, *pI* 8,3. Por exemplo, utilizando condições semelhantes, pH 7,0 e uma condutividade de solução de 0,7 mS/cm, o Apomab precipita totalmente ( $C/Co = 0$ ) com o mesmo valor *R* utilizados nesses experimentos.

Um processo de purificação para o anti-cMet (pI 8,3, 100 kDa), com precipitação PVS foi comparado com um processo padrão, utilizando quatro etapas de cromatografia, uma etapa de captura de proteína A seguido por duas etapas de captura de troca catiônica executadas no modo de ligação e eluição e finalmente uma etapa de cromatografia de interação hidrofóbica operada no modo de fluxo (Tabela 7). Ambas as etapas de troca catiônica e da interação hidrofóbica foram substituídas por uma precipitação PVS seguida por cromatografia de troca aniônica executada em modo de fluxo. Em pH 4, a reação de precipitação poderia ser realizada com forças iônicas maiores. No entanto, a precipitação em pH 5 pode gerar depuração de impurezas maiores quanto mais impurezas de célula hospedeira estiverem carregadas negativamente neste pH e, portanto, permanecem na solução. Condições de pH 5,0, condutividade de 0,6 mS/cm e relação molar de PVS de 100 (0,1% p/v) foram selecionados para maximizar a precipitação do anticorpo como determinado a partir das curvas de solubilidade. O rendimento de recuperação por precipitação PVS do anti-cMet foi afetado pela solubilização do sedimento (*pellet*) PVS:anticorpo. O sedimento de PVS:anticorpo foi similar a um gel e difícil de solubilizar. Após a solubilização do sedimento em tampão de equilíbrio QSFF, a solução foi opacificada com partículas. A solução foi facilmente filtrada utilizando um filtro a vácuo de 0,4  $\mu$ M, proporcionando uma solução clara, que foi processada sobre a cromatografia de troca aniônica em Q-Sepharose.

A etapa de precipitação PVS realizada em pH 5, 0,5 mS/cm, e 0,1% PVS (p/v), reduzido o ECP a níveis semelhantes ao da etapa com CM-Sepharose (Tabela 7). Através do processo de precipitação não foi observado uma diminuição significativa na proteína A lixiviada ou um aumento na % de monômero.

**TABELA 7****RESUMO DOS RESULTADOS DO PROCESSAMENTO SUBSEQÜENTE DO ANTI-CMET**

	Carga Densidade (mg/ml)	Rendime nto(%)	ECP (ng/mg)	Proteína A (ng/mg)	Monômero (%)
<b>Processo Padrão</b>					
Proteína A	10	95	2000	40	ND
CM Sepharose	30	85	500	7	ND
Poros 50 HS	40	93	300	< 2	ND
Fenil Sepharose HS	50	75	150	< 2	99

<b>Processo de Precipitação</b>					
Proteína A	10	95	3000	40	ND
Precipitação PVS*	N/A	80	1988	N/D	ND
QSFF	40	95	666	38	93

**SELEÇÃO DAS CONDIÇÕES DE FILTRAÇÃO PARA A CAPTURA DO PRECIPITADO**

- 5 Filtros profundos contendo meios filtrantes adsorventes particularmente adequados para a remoção de contaminantes biológicos no fluido de cultura de células podem ser utilizados nos métodos da invenção. Filtros profundos são normalmente utilizados na produção de biofármacos, como os derivados de cultura de células de mamíferos, com a finalidade de
- 10 clarificar diversos produtos fluidos brutos. Filtros profundos Celulósicos, tais como filtros MILLISTAK+® disponível comercialmente pela Millipore Corporation, possuem um leito fixo poroso de material adsorvente, tal como um adsorvente granular, incorporados em aglutinante um termoplástico insolúvel em água. O filtro composto resultante permite uma maior quantidade de

adsorvente com partículas adsorventes menores do que filtros profundos convencionais. Estes filtros compostos incluem uma camada de meio celulósico profundo fortemente estruturado, e pode ser otimizado para uma aplicação específica, tal como para a retenção de partículas celulares coloidais e detritos celulares ou retenção de toda a célula e detritos maiores. Eles combinam graus seqüenciais de meios, por exemplo, por membranas empilhadas, em um único cartucho de filtro. Tais filtros profundos podem ser utilizados no polimento ou processos de clarificação secundária para remover pequenas quantidades de matéria em suspensão a partir de um fluxo de produto aquoso (proteína). Os filtros podem também proteger ou prolongar a vida útil de um processo de separação subsequente mais caro, tais como filtração estéril e cromatografia por afinidade para a remoção de contaminantes celulares coloidais e outros detritos. Além disso, esses filtros profundos são também úteis para a proteção de filtros de depuração viral, removendo traços de proteínas aglomeradas.

Alguns filtros profundos também podem reter, em diferentes graus, alguns contaminantes solúveis comumente encontrados em culturas de células de mamíferos, tais como ácidos nucleicos, proteínas da célula hospedeira, lipídios, tensoativos, etc. Esta capacidade de retenção de determinados contaminantes solúveis é baseada nas propriedades adsortivas do meio do filtro profundo. Um meio de filtro geralmente empregado em filtros profundos inclui fibras de celulose refinadas (polpa da madeira e/ou derivada de algodão), terra de diatomáceas, ou resinas aglutinantes termoendurecíveis solúveis em água (US 2007/0193938). A terra de diatomácea (uma forma natural de sílica contendo vestígios de diversos silicatos) nestes compostos é tipicamente de 40-60% em peso, absorvendo matéria biológica de tamanho coloidal, tais como fragmentos celulares, organelas e aglomerados de proteínas, bem como vários bioquímicos solúveis, tais como proteínas, lipídios

e ácidos nucleicos (DNA e RNA).

A filtração profunda foi avaliada como um passo de captura para o anticorpo precipitado em PVS. A distribuição de tamanho ampla do precipitado apresenta um desafio para capturar o precipitado utilizando a filtração. Cada meio de filtro foi testado com anticorpos precipitados sob condições normais de fluxo de filtração. O meio de filtração profunda com tamanhos de poros variados foi selecionado pelas suas capacidades de captar totalmente o precipitado. O meio de filtro ótimo foi selecionado com base em sua capacidade de captar totalmente o precipitado e também pela sua capacidade de ser carregado a uma alta capacidade. Vmax foi utilizado para avaliar a pressão de gotejamento através do filtro, bem como para determinar a capacidade máxima. A Tabela 8 exibe os meios de filtração avaliados. A série MILLISTAK+® CE (apenas celulose) de meio avaliados incluem 20CE, 35CE e 45CE. A série MILLISTAK+® HC (auxiliar de filtração celulose e inorgânicos) de meio avaliado incluem C0HC, B1HC e A1HC (Rathore *et al* (1 de agosto de 2004) *Biopharm Intl.*; US 2007/0193938). MILLISTAK® cartuchos de filtro e folhas são disponíveis pela Millipore Corp (Bedford, MA).

Conforme exibido na Tabela 8, o meio 20CE é mais aberto comparado com o 35CE e 45CE. O 20CE contém um tamanho nominal dos poros variando entre 5-10 microns enquanto o 35CE e 45CE contém um tamanho nominal dos poros variando entre 2-4 microns e 0,8-2 microns, respectivamente. Estas séries de meios para filtro foram selecionados para diminuir uma gama de tamanhos de poros, que permitem a captura completa do precipitado PVS-anticorpo (humanizado 2H7 variante). O meio 20CE resultou na captura de 45% do precipitado enquanto que o 35CE resultou na captura de 48% do precipitado. Em comparação, o 45CE resultou na captura de 97% do precipitado. A série de meio Millistak+ HC é mais rigorosa que a série Millistak+ CE. O meio C0HC contém um tamanho



nominal dos poros variando entre 0,2-2 microns enquanto o B1HC contém um tamanho mais apertado variando entre 0,05-0,7 microns e 0,05-0,4 microns, respectivamente. Todos os três resultaram na captura de 99% do precipitado.

5

**TABELA 8**

Meio de Filtração	Varição Do Tamanho Nominal Do Poro ( $\mu\text{m}$ )	% de Anticorpo (2H7)-Precipitado PVS Capturado
CE20	5,0 – 10	45%
CE35	2,0 – 4,0	48%
CE45	0,8 – 2,0	97%
C0HC	0,2 – 2,0	> 99%
B1HC	0,05 – 0,7	> 99%
A1HC	0,05 – 0,4	> 99%

A Figura 34 exibe um gráfico de capacidade  $V_{\text{max}}$  (mensurado em gramas de anticorpo (2H7) por área de filtro) *versus* pressão de gotejamento para cada meio de filtro (Tabela 8). A pressão limite de 17 psi foi definida para indicar o final do experimento, devido a obstrução do filtro.

- 10 Uma meta de capacidade de  $125 \text{ g/m}^2$  foi definida para indicar o final do experimento no caso do filtro não ser obstruído. Tanto o meio do filtro A1HC quanto do filtro B1HC atingiu 17 psi e, portanto, forneceu a capacidade mais baixa. A capacidade no final de filtração usando um meio A1HC foi de  $40 \text{ g/m}^2$  enquanto que a capacidade no final da filtração usando o meio B1HC foi de  $68 \text{ g/m}^2$ . O C0HC chegou a capacidade final de 125  $\text{g/m}^2$  com uma pressão máxima de 3,5 psi. Como mencionado acima, 20CE e 30CE retiveram menos de 50% da precipitação e, portanto, não foram adotadas para a meta da capacidade. O 45CE chegou a meta da capacidade com uma pressão máxima de 7 psi.
- 15

**SELEÇÃO DAS CONDIÇÕES DE RESSOLUBILIZAÇÃO PARA A RESSOLUBILIZAÇÃO DO  
PRECIPITADO EM UM FILTRO PROFUNDO**

Uma série de métodos de ressolubilização foram avaliados para recuperar o anticorpo capturado do filtro profundo. A meta para esta etapa foi desenvolver um método robusto com alta recuperação de anticorpo. O primeiro método avaliado foi a ressolubilização de anticorpos a partir do precipitado usando um tampão de elevada condutividade em um pH elevado. Sob condições alto de pH e condutividade, o anticorpo é menos positiva e mais íons na solução de protegem o PVS e o anticorpo impedindo assim a precipitação.

Um tampão de acetato de sódio base Tris/50mM em pH's na faixa de 8-8,5 e condutividade de ~ 6 mS/cm foi utilizado para ressolubilizar o anticorpo. O tampão foi lavado através do filtro profundo e o *pool* resultante continha anticorpos e PVS. Variáveis, tais como velocidade de fluxo e volume de tampão necessário para ressolubilizar completamente o anticorpo, foram avaliadas. A recirculação do tampão através do filtro profundo também foi avaliada como um método para gerar um *pool* mais concentrado.

A Figura 35 exhibe o efeito da variação da velocidade de fluxo sobre o rendimento em termos de volume de tampão necessário para atingir a ressolubilização completa do precipitado 2H7-PVS proteína-polieletrólito a partir do meio do filtro C0HC MILLISTAK<sup>®</sup>. Fluxos no intervalo de 52-130 LMH (litros por metro quadrado por hora, uma medida de velocidade de fluxo ) e 130-261 LMH mostram uma tendência semelhante com ambas as curvas, resultando em rendimentos finais semelhantes com 600 ml de tampão. A curva a um fluxo de 130 LMH abrange a mesma tendência e também resulta em um rendimento semelhante com 600 ml de tampão. A variação na velocidade de fluxo não melhora o rendimento para a relação de volume de tampão. A concentração anticorpos mais alta obtida com este método foi de 1 g/L.

A recirculação do tampão através do filtro profundo também foi

avaliada como um método que pode potencialmente resultar em um *pool* mais concentrado. Um reservatório contendo tampão serviu tanto como a entrada de tampão e saída de *pool* do recipiente. Conforme exibido na Figura 36, dois intervalos de fluxo (fluxo do tampão de ressolubilização em LMH) foram testados para determinar o tempo ótimo de processamento no qual nós recuperamos a maioria de nossas proteínas do filtro como o precipitado 2H7-PVS proteína-polieletrólito. Um fluxo na faixa de 130-261 LMH atingiu o mesmo rendimento de 84%, como o fluxo na faixa de 261-522 LMH após 60 minutos. Em termos de concentração de *pool*, o método de recirculação resultou em *pool* mais concentrado quando comparado com uma única passagem de tampão através do filtro profundo. A concentração anticorpos mais alta obtida utilizando o método de recirculação foi de 2 g/L.

#### **OPERAÇÃO DA REAÇÃO DE PRECIPITAÇÃO E CAPTURA EM FILTRAÇÃO EM MODO**

##### **CONTÍNUO**

A precipitação PVS depende da interação iônica entre a molécula PVS fortemente aniônica e a molécula de anticorpo apenas ligeiramente catiônica na solução. Diluindo matéria-prima de proteína a uma baixa condutividade da solução para um intervalo aceitável para a precipitação PVS pode causar grandes aumentos no volume de matéria-prima. Para evitar possíveis restrições no volume na fabricação em escala, é necessário desenvolver um esquema para o condicionamento da matéria-prima em linha. Diluições em linha podem ser usadas para baixar a condutividade de um fluxo de matéria-prima sem exigir um tanque de mistura. Pela fusão de um fluxo de PVS com o fluxo de matéria-prima condicionado, a precipitação PVS-anticorpo pode ocorrer em linha e eliminar a necessidade de um grande reservatório de precipitação em escala. A Figura 37 exibe um esboço de um de uma configuração de condicionamento HFFC/ precipitação PVS em linha com os objetivos de: (i) aumentar o tempo de permanência e diminuir a velocidade do

fluido para promover a agregação de partículas PVS-MAb, (ii) aumentar a área de secção transversal de um reator em linha para manter um processo de produção elevado, e (iii) execução à escala laboratorial.

Embora a precipitação PVS-anticorpo possa ocorrer facilmente sob a mistura em linha de PVS e fluxo de matéria-prima condicionada, o processo de agregação das partículas do precipitado PVS-anticorpo é muito sensível a turbulência de fluxo, tempo de contato e velocidade média linear do fluido. Um período de tempo de contato de baixa agitação é necessário para a agregação de partículas na amostra necessária para formar partículas precipitadas grandes o suficiente para serem capturadas pelo meio de filtração. O fluxo em velocidade mais alta pode impedir o precipitado PVS-Ab pela formação de grandes agregados, criando um fluxo de partículas precipitadas muito pequenas que podem ser difíceis de se captar pelo meio de filtração.

Um duto, em linha, para matéria-prima condicionante /precipitação PVS é fornecido em escala laboratorial em conjunção com um método de captura em filtração profunda que processa o fluxo de matéria-prima precipitada continuamente. Foram observados rendimentos da recuperação de anticorpo variando entre 71% -60% (Figura 38, para gráficos de rendimento de anticorpos), com o processo esquemático apresentado na Figura 37 com um *clearence* de CHOP de 9 vezes sobre a etapa de precipitação PVS em linha.

#### **SELEÇÃO DAS CONDIÇÕES DE PRECIPITAÇÃO DE POLIELETRÓLITO CATIÔNICO**

Curvas de solubilidade foram geradas usando dois pesos moleculares de poliarginina (Poli-L-Arginina) em CCF e HCCF. As curvas de solubilidade são gráficos de proteína residual deixadas no sobrenadante após precipitação (expresso como uma percentagem) *versus* a concentração de polieletrólito expresso com peso de polieletrólito (g)/volume da solução (mL).

As curvas de solubilidade foram geradas para rhuMab 2H7 CCF (Figura 20) e HCCF (normalmente em pH 7) para uma variedade de forças

iônicas (Figura 21 e 22). Essas curvas foram utilizadas para selecionar as condições ótimas de precipitação de CHOP nas quais a precipitação em escala preparativa seria realizada com força iônica, concentração de poliarginina e peso molecular conhecidos. As curvas de solubilidade também foram gerados com anti-CD22 e rhuMab C2B8 HCCF (Figura 23 e 24) para garantir a solidez e consistência da técnica de precipitação. Para avaliar a viabilidade da purificação de anticorpos através de duas etapas de precipitação, a precipitação em polieletrólito catiônico seguida pela precipitação em polieletrólito aniônico, curvas de solubilidade foram geradas para a precipitação PVS do rhuMab HCCF gerada a partir da floculação de CCF com 0,075% p/v poliarginina 110 kDa (Figura 25). Com o aumento na concentração de poliarginina, houve precipitação de CHOP, como indicado por uma diminuição de CHOP residual (ng/mg) no sobrenadante. A precipitação ótima de CHOP ocorreu a uma concentração de 0,2% p/v de poliarginina com uma redução de 22 vezes na CHOP, com rendimento de 95%. Um aumento adicional na concentração de poliarginina não resultou em uma redução significativa de CHOP, mas houve uma diminuição no rendimento.

A precipitação CHOP parece ser uma função de força iônica e massa molecular do polieletrólito, como visto nas curvas de solubilidade do rhuMab 2H7 HCCF (Figura 21 e 22). Com a diminuição na condutividade, houve um aumento na precipitação. Em geral, o aumento do peso molecular do polieletrólito parece ter um impacto sobre a precipitação de CHOP. Em concentrações semelhantes de poliarginina, o polieletrólito de alto peso molecular (110 kDa) precipitou mais CHOP, em comparação com o polieletrólito de menor peso molecular (42 kDa). Em uma condutividade determinada (exceto 3mS/cm), a adição de poliarginina maior que 0,1% p/v, não resultou em redução mais significativa de CHOP. Em concentração de 0,1% p/v de poliarginina, uma redução de CHOP de 10 vezes e 13 vezes foi

obtida para os pesos moleculares de 42 kDa e 110 kDa, respectivamente, e os rendimentos foram > 95% para ambos os pesos moleculares.

Tendências semelhantes foram observadas com o anti-CD22 e rhuMab C2B8 HCCF, como visto nas curvas de solubilidade do HCCF com rhuMab 2H7, anti-CD22, rhuMab C2B8 (Figura 23 e 24). A precipitação do HCCF anti-CD22 com 0,1% p/v de poliarginina 110 kDa resultou em uma redução de 25 vezes de CHOP e rendimento de 95%. A precipitação de CHOP ótima para do rhuMab C2B8 ocorreu a uma concentração de 0,15% p/v de poliarginina 110 kDa resultou em uma redução de 20 vezes de CHOP e rendimento de 95%.

Com o aumento na concentração PVS, houve precipitação completa de anticorpos no material de alimentação floculado com poliarginina em ambos pHs, e a condutividade testada, indicado uma diminuição no rendimento (%) (Figura 25). Isto indica uma interferência mínima da presença de poliarginina na precipitação PVS do anticorpo nas condições testadas. Em pH 7 e condutividade de 7 mS/cm, uma vez que o nível máximo de precipitação foi observado, a adição de mais PVS causou a redissolução do precipitado.

#### **PROCESSAMENTO SUBSEQÜENTE DO RHUMAB 2H7**

O processo padrão utiliza atualmente três etapas de cromatografia, uma etapa de captura em proteína A seguida por uma etapa de troca catiônica e aniônica. Floclando o CCF com 0,075% p/v de poliarginina 110 kDa e processando do HCCF com precipitação do anticorpo com PVS seguido pela etapa em QSFF é mostrado como um processo de fluxo a), Tabela 9). A principal função desta etapa de floclação é clarificar o CCF através da remoção de sólidos (restos celulares), reduzindo, assim, a turbidez e precipitando as impurezas de células hospedeiras, tais como CHOP e DNA. A poliarginina foi capaz de floclular os sólidos e os componentes dos meios de cultivo celular, e reduzir CHOP para 23.480 ng/mg (redução de 4 vezes) e

remover o DNA completamente. Se a concentração de poliarginina 110 kDa foi aumentada para 0,2% p/v, foi obtido uma redução de CHOP de até 22 vezes, como indicado pelas curvas de solubilidade (Figura 20). precipitação PVS de HCCF floculado reduziu ainda CHOP a 212 ng/mg, que foi significativamente menor do que a CHOP no *pool* controle HCCF-PVS. Os *pools* Controle HCCF-PVS-Q tinham quase o dobro da quantidade de CHOP comparado aos *pools* Poli(Arg) HCCF-PVS-Q. O teste de DNA, não funciona na presença de depuração com PVS e PVS utilizado durante a etapa de precipitação e não pôde ser avaliado. Os rendimentos de todas as etapas foram superiores a 95%, exceto as etapas de precipitação PVS (Tabela 9). Estes baixos rendimentos pelas etapas PVS podem ser atribuídos ao procedimento de precipitação e manipulação em escala preparativa em contra posição com os mecanismos e condições de precipitação (Figura 25). O percentual de monômero SEC, Insulina e Gentamicina não foram avaliados para estes *Pools*.

Com o objetivo de estudar o impacto sobre os processos subseqüentes, o HCCF foi precipitado com 0,1% p/v de poliarginina 110 kDa e adotado através de vários sistemas de purificação. O rendimento de anticorpos foi de 97% e CHOP foi reduzido em cerca de 18 vezes e o DNA foi completamente removido pela precipitação com poliarginina. A insulina e Gentamicina não foram purificadas por esta etapa de precipitação. Antes do processamento subseqüente do precipitado HCCF, foram geradas curvas de chegada para avaliar o impacto da poliarginina sobre a capacidade de carga as resina SPSFF. Para ambas as cargas, HCCF precipitado com poliarginina e pós precipitação do *pool* de proteína A, ocorreu um avanço de 5% sobre SPSFF em 60 mg de anticorpo por ml de resina semelhante ao controle (sem precipitação em poliarginina). Isto indica que a poliarginina não tem impacto negativo sobre a capacidade de ligação do SPSFF (Figura 26 e 27).

O processo padrão do anticorpo (Processo de fluxo b), Tabela 9):

O precipitado HCCF em poliarginina foi processado a través da Proteína A seguido por cromatografia de troca iônica. O *pool* de poliarginina-Proteína A tinha níveis CHOP semelhantes a Proteína A controle, apesar dos níveis CHOP na carga de matéria-prima serem muito diferentes. A Gentamicina e insulina foram reduzidas para níveis mais baixos pela etapa de proteína A. CHOP foi reduzida cerca de 490 vezes para 3 ng/mg durante o SPSFF comparados a 307 ng/mg, na ausência da etapa de precipitação. DNA, proteína A lixiviada, Insulina e Gentamicina também foram reduzidas para níveis aceitáveis pelo processo poliarginina-Proteína A-SP comparável ao processo controle (Proteína A-SPSFF-QSFF) (Tabela 9). Uma vez que níveis de impureza são aceitáveis nos *Pools* SPSFF após a precipitação em poliarginina, não é necessário tratá-las em QSFF.

O processo de não afinidade para purificação de anticorpo (Processo de fluxo c), Tabela 9): HCCF precipitado em poliarginina foi processado por SPSFF seguido por QSFF. Após precipitação o *pool* SPSFF teve 63 ng/mg de CHOP (redução de 76 vezes) comparado a 6.731 ng/mg, na ausência da precipitação. O SPSFF removeu completamente a Insulina e reduziu parcialmente a Gentamicina. A depuração de CHOP foi melhor no processo poliarginina-SP, enquanto que a depuração de DNA, Insulina e Gentamicina foram comparáveis ao processo controle (SPSFF-QSFF) (Figura 28). Após a precipitação em poliarginina, os níveis CHOP no *pool* SPSFF são semelhantes aos do *pool* QSFF, sugerindo que a etapa QSFF é redundante neste processo.

#### **PROCESSO DE PURIFICAÇÃO EM DUAS ETAPAS PRECIPITAÇÃO/CROMATOGRAPHIA**

HCCF precipitado em poliarginina foi seguido pela precipitação de anticorpos por PVS e, em seguida, processada através QSFF (Processo fluxo d, Tabela 9). O *pool* PVS teve 49 ng/mg de CHOP (uma redução de 99 vezes) comparado a 1.517 ng/mg, na ausência da precipitação de poliarginina. A



etapa de precipitação PVS removeu completamente a Insulina e reduziu parcialmente a Gentamicina. A depuração de CHOP foi melhor no processo poliarginina-PVS, enquanto que a depuração de DNA e Insulina foram comparáveis ao processo controle (SPSFF-QSFF). A depuração com Gentamicina foi 2 vezes menor no processo controle, na presença da etapa QSFF. Após a precipitação em poliarginina, os níveis CHOP no *pool* SPSFF são semelhantes aos do *pool* QSFF, sugerindo que a etapa QSFF é redundante neste processo.

**TABELA 9****10 RESUMO DE RESULTADOS DO PROCESSAMENTO SUBSEQÜENTE DO RHUMAB 2H7**

	Rendimento	CHOP	SEC	Proteína A	DNA	Insulina	Gentamicina
	(%)	(ng/mg)	(%monômero)	(ng/mg)	(pg/mg)	(ng/mg)	(ng/mg)
a) Controle HCCF	NA	93191	ND	NA	914893	ND	ND
Poli(Arg) floculada e CCF coletada	97	23480	ND	NA	<0,4	ND	ND
Controle HCCF-PVS	80	900	ND	NA	ND	ND	ND
Poly(Arg) floculada e CCF-PVS coletada	75	212	ND	NA	ND	ND	ND
Controle HCCF - PVS - Q*	100	90	ND	NA	ND	ND	ND

	Rendimento	CHOP	SEC	Proteína A	DNA	Insulina	Gentamicina
	(%)	(ng/mg)	(%monômero)	(ng/mg)	(pg/mg)	(ng/mg)	(ng/mg)
Poli(Arg) floculada e CCF - PVS - Q* coletada	100	54	ND	NA	ND	ND	ND

b) HCCF	NA	86331	NA	NA	373247	1,70	20500
Poli(Arg) HCCF	90	4836	NA	NA	<0,3	< 1,93	22100
HCCF - Pro A	99	1689	98,1	9,3	52	< 0,01	33,9
Poli(Arg) HCCF - Pro A	103	1447	97,5	16,7	<0,3	0,16	24,4
HCCF - Pro A - SP	100	307	98,4	< 2	<0,2	< 0,02	1,2
Poli(Arg) HCCF - Pro A - SP	92	3	98,5	< 2	<0,1	< 0,02	0,6
HCCF - Pro A - SP - Q	87	< 2,8	97,9	< 2	<0,2	< 0,05	1,2
Poli(Arg) HCCF - Pro A - SP - Q	93	< 2,6	98,8	< 2	<0,2	< 0,05	0,7

	Rendimento	CHOP	SEC	Proteína A	DNA	Insulina	Gentamicina
	(%)	(ng/mg)	(%monômero)	(ng/mg)	(pg/mg)	(ng/mg)	(ng/mg)
c) HCCF - SP	99	6731	97,6	< 2	0,7	< 0,02	99,9
Poli(Arg) HCCF - SP	88	63	98,8	< 2	<0,2	< 0,02	84,3
HCCF - SP - Q	93	81	97,6	< 2	<0,2	< 0,06	92,9
Poli(Arg) HCCF - SP - Q	99	46	98,3	< 2	<0,2	< 0,05	81,1
d) HCCF - PVS	70	1517	97,0	< 2	ND	< 0,03	1030
Poli(Arg) HCCF - PVS	73	49	98,5	< 2	ND	< 0,03	1000
HCCF - PVS - Q*	97	79	97,2	< 2	ND	< 0,02	504
Poli(Arg) HCCF - PVS - Q*	98	34	98,6	< 2	ND	< 0,02	691

\*Q carregado a 30g/L; ND- Não Determinado; NA- Não Aplicável

#### INIBIÇÃO DA REDUÇÃO DE ANTICORPO

HCCF contendo rhuMAb 2H7 foi tratado com poliarginina e

mantido em mini latas de aço inoxidável por 48 horas, e as amostras foram tomadas em ponto de tempo regulares e analisadas. O anticorpo estava intacto e não reduziu ao longo de todo o período de tempo no precipitado HCCF em poliarginina em contra posição ao controle onde os anticorpos começaram a diminuir em 10 horas (Figura 28). A poliarginina inibe os agentes redutores de anticorpo por precipitar-las juntamente com outras impurezas carregadas negativamente.

#### **AVALIAÇÃO DE OUTROS POLIELETRÓLITOS CATIÔNICO**

A otimização das condições de precipitação a fim melhorar a remoção de impurezas pode incluir a utilização de outros polieletrólitos bem como a otimização de outras condições, tais como a velocidade e tipo de agitação, bem como a velocidade de adição do polieletrólito. Uma outra base de poli(aminoácido), polilisina, foi selecionada para uma comparação inicial com a poliarginina. A poliarginina tem um cátion guanideum como grupo funcional, dando a ele um pKa de aproximadamente 12,5. A polilisina tem um grupo cátion amina como grupo funcional, dando a ela uma pKa de aproximadamente 10,5. Tanto a poliarginina quanto a polilisina são disponíveis comercialmente em diversos pesos moleculares.

#### **CURVA DE SOLUBILIDADE DE UM POOL RHUMAB C2B8 EM PROTEÍNA A**

Na precipitação CHOP pela carga positiva, o polieletrólito policátion está correlacionado com a força iônica e massa molecular do polieletrólito (Figuras 29 e 30). Polilisina de baixo peso molecular (2,5 kDa) não precipita CHOP na condutividade variando entre 3-12 mS/cm. No entanto a polilisina de 50k Da resultou em uma redução de CHOP de 4 vezes e 2 vezes em 3 mS/cm e 6mS/cm, respectivamente. Uma precipitação CHOP não significativa foi observada em 12mS/cm. Em geral, com a diminuição na condutividade, houve um aumento na precipitação de CHOP e o aumento do peso molecular do polieletrólito pareceu ter um impacto sobre a precipitação

CHOP. Em baixas condutividades, uma vez que a precipitação máxima de CHOP foi obtida, a adição de mais polilisina resultou na ressolubilização do precipitado. Os rendimentos foram superiores a 95% para todas as condições testadas.

#### 5 CURVA DE SOLUBILIDADE DE UM *POOL* RHUMAB C2B8

Tendências semelhantes foram observadas com rhuMab C2B8 HCCF (Figura 31 e 32). Em condutividades de 3 mS/cm e 6 mS/cm, ambas as polilisinases de 50 kDa e 225 kDa resultaram em uma redução de CHOP de 9 vezes. No entanto, uma redução de CHOP não significativa foi obtida a 12  
10 mS/cm, mesmo com polilisina 225 kDa. Isto indica que a precipitação CHOP em condutividades altas exige um polieletrólito altamente carregado como a poliarginina para superar a interferência iônica. Os rendimentos foram superiores a 90% para todas as condições testadas.

As curvas de solubilidade foram geradas para três anticorpos  
15 (rhuMab 2H7, anti-CD22 e rhuMab C2B8) utilizando a poliarginina (Figuras 20-25, 29-32). A precipitação CHOP foi uma função de pKa, peso molecular e concentração de polieletrólito, bem como a força iônica da solução. As propriedades de anticorpo tais como densidade de carga e ponto isoelétrico também podem desempenhar um papel na separação de impurezas dos  
20 anticorpos. Impurezas tais como CHOP e DNA são removidas através da manipulação da concentração de polieletrólito e força iônica. As propriedades de polieletrólitos tais como grupo funcional, peso molecular, densidade de carga e hidrofobicidade podem variar. A poliarginina pode ser utilizada como um floculante no CCF ou como precipitante de impurezas no HCCF. A  
25 precipitação é dependente da condutividade. Uma remoção de 10-25 vezes de CHOP foi obtida e o DNA foi indetectável (Tabela 9). A poliarginina não teve impacto negativo na capacidade de ligação do SPSFF e é compatível com a precipitação de anticorpo com polieletrólitos aniônicos e resinas de troca

catiônica. A adição de poliarginina ao HCCF também forneceu benefícios adicionais de maneira surpreendente e inesperada, incluindo a inibição da redução de anticorpos, possivelmente pela precipitação do agente redutor juntamente com outras impurezas.

5

### **EXEMPLOS**

Com o objetivo de ilustrar as realizações da presente invenção, os seguintes exemplos são incluídos. No entanto, deve-se compreender que estes exemplos não limitam a presente invenção e são apenas sugestões de métodos para a prática da invenção. Os técnicos hábeis no assunto irão reconhecer que os métodos exemplares, protocolos, processos, reagentes e aparelhos descritos podem ser facilmente adaptados para práticas alternativas de métodos desta invenção e são consideradas dentro do escopo da presente invenção.

10

### **EXEMPLO 1**

15

#### **CROMATOGRAFIA EM PROTEÍNA A**

A coluna de proteína utilizada resina Prosep vA e foi usada para purificar o rhuMab 2H7 presentes no HCCF. O diâmetro da coluna foi de 2,5 centímetros e a altura do leito foi de 14 cm. A coluna foi operado a uma velocidade de fluxo de 40 CV/h (volume de coluna por hora). A coluna vA Prosep foi executada em ciclos múltiplos (2 ciclos). Após o equilíbrio, o HCCF foi aplicado à coluna, e o rhuMab 2H7 foi retido na coluna. A coluna foi então lavada com tampão de equilíbrio seguido pelo tampão de lavagem e, em seguida, novamente pelo tampão de equilíbrio. Após estas lavagens serem completas, o tampão de eluição foi aplicado à coluna. O agrupamento em *pool/s* foi iniciado com base na absorbância a 280 nm (0,5 O.D.) e terminou após 2 volumes de coluna. O tampão de regeneração foi posteriormente aplicado na coluna. A composição do tampão e as durações das fases estão indicadas na Tabela 10.

20

25

**TABELA 10 COMPOSIÇÃO DO TAMPÃO E A DURAÇÃO DAS FASES DO PROSEP VA**

<b>Tampão</b>	<b>Componente do Tampão</b>	<b>Duração da Fase (CV)</b>
Tampão de Equilíbrio	25mM Tris, 25mM NaCl, 5mM EDTA, pH 7,1	5
Carga	rhuMab 2H7 HCCF	Até a capacidade de 14g/L
Tampão de lavagem 1	25mM Tris, 25mM NaCl, 5mM EDTA, pH 7,1	3
Tampão de lavagem 2	Fosfato de Potássio 0,4M pH 7,0	4
Tampão de lavagem 3	25mM Tris, 25mM NaCl, 5mM EDTA, pH 7,1	3
Tampão de eluição	Ácido acético 0,1M pH 2,9	4
Tampão de regeneração	Ácido fosfórico 0,1M	3
Solução de estoque	Acetato 0,1M , Álcool benzil 2%, pH 5,0	5 (apenas o último ciclo)

O fluido de cultura de células coletadas (HCCF) derivado de células hospedeiras recombinantes pode ser carregado em uma fase sólida equilibrada utilizando um tampão de carga que pode ser o mesmo que o

5 tampão de equilíbrio. A medida que a preparação contaminado flui através da fase sólida, a proteína é adsorvida ao a Proteína A imobilizada e outros contaminantes (tal como proteínas do Ovário de Hamster Chinês, CHOP, no qual a proteína é produzida em uma célula CHO) podem se ligar de maneira não específica à fase sólida. A próxima etapa realizada seqüencialmente

acarreta na remoção dos contaminantes ligados à fase sólida, anticorpos e/ou proteína A, pela lavagem da fase sólida em uma etapa de lavagem intermediária. Após o carregamento, a fase sólida pode ser equilibrada com tampão de equilíbrio antes de dar início à etapa de lavagem intermediária. O

5 tampão de lavagem intermediário pode conter sal e um composto adicional, onde os compostos ainda é (a) detergente, por exemplo, polissorbato 20 ou polisorbato 80), (b) solvente (por exemplo, hexileno glicol), e (c) polímero (por exemplo, PEG). O sal empregado pode ser selecionado com base na proteína de interesse, mas é preferencialmente acetato (por exemplo, acetato de sódio).

10 As quantidades de sais e compostos adicionais na composição são de tal ordem que o a quantidade combinada elui o(s) contaminante(s), sem eliminar substancialmente a proteína de interesse. Concentrações de sais em tais tampões de lavagem podem variar entre cerca de 0,1 a cerca de 2 M, ou a cerca de 0,2 M a cerca de 0,6 M. Concentrações de detergente úteis são de

15 cerca de 0,01 a 5%, ou cerca de 0,1 a 1%, ou cerca de 0,5%, por exemplo, onde o detergente é polissorbato. Exemplos de concentrações de solvente são de cerca de 1% a 40%, ou cerca de 5 a 25%. Onde o componente adicional é um polímero (por exemplo, PEG 400 ou PEG 8000), a concentração deste, por exemplo, pode ser cerca de 1% a 20%, e preferencialmente cerca de 5% a

20 15%.

Em outra realização, a etapa de lavagem intermediária envolve o uso de uma solução tampão altamente concentrada, por exemplo, um tampão a uma concentração maior que cerca de 0,8 M, por exemplo, até cerca de 2 M, e de preferência no intervalo entre 0,8 M e 1,5 M, e mais preferencialmente,

25 cerca de 1 M. Nesta realização, o tampão é preferencialmente um tampão Tris, tal como o Tris acetato. O pH do tampão de lavagem intermédio pode ser de cerca de 4 a 8, ou cerca de 4,5 a 5,5, ou cerca de 5,0. Em outra realização, o pH é aproximadamente 7,0. Após a etapa de lavagem intermediária do



parágrafo anterior, a proteína de interesse é recuperada a partir da coluna. Isto é normalmente alcançado pelo uso de um tampão de eluição adequado. A proteína, por exemplo, pode ser eluída da coluna com um tampão de eluição com um pH baixo, por exemplo, na faixa de 2 até cerca de 5, e preferencialmente no intervalo de aproximadamente 2,5 a 3,5. Exemplos de tampões de eluição para este propósito incluem tampões citrato ou acetato. Durante a operação da fase de eluição das proteínas A, qualquer CHOP ligado de maneira não-específica pode ser co-eluído com a proteína de interesse, comprometendo a pureza do *Pool* de produto. Para remover a CHOP antes da fase de eluição, uma etapa intermediária de lavagem usando cloreto de tetrametilamônio (TMAC) pode ser realizada para remover a CHOP (Patentes US 6.870.034; US 6.127.526; US 6.333.398).

## **EXEMPLO 2**

### **CROMATOGRAFIA SPSFF**

A coluna de troca catiônica usou a resina de *SP Sepharose Fast Flow* (SPSFF) no modo de ligação e eluição, com um gradiente de eluição. A coluna SPSFF foi operada a uma velocidade de fluxo de 150 centímetros/h. Em todos os casos, a altura do leito foi de 30 cm. Durante o procedimento dos *pools* na cromatografia intermédia (*pools* Prosep VA QSFF), uma coluna de 0,66 cm i.d foi utilizada e a coluna foi carregada a 40 g/L. Durante o processamento HCCF, uma coluna de 0,6-2,2 cm de diâmetro foi utilizada e a coluna foi carregada a 10-40 g/L. Em todos os casos, a carga foi condicionada em pH 5,0 e em uma condutividade de cerca de 5,5 mS/cm. Após a carga, a coluna foi então lavada com tampão de equilíbrio seguido pelo tampão de lavagem e, em seguida, novamente pelo tampão de equilíbrio. Após estas lavagens serem completas, o rhuMab 2H7 foi eluído em um gradiente de acetato 50 mM até de acetato 350 mM sobre 15 volumes de coluna. Agrupamento (formação dos *pools*) foi iniciado e encerrado com base na

absorbância a 280 nm (0,5 O.D.). A coluna foi regenerada e sanitizada com 0,5 N de hidróxido de sódio e armazenados em 0,1 N de hidróxido de sódio. As composições de tampão e a duração das fases estão indicadas na Tabela 11.

**TABELA 11**

5

**COMPOSIÇÃO DO TAMPÃO E DURAÇÃO DA FASE NO SPSFF**

Etapa	Tampão	CVs
Equilíbrio	Acetado de Na 50mM, pH 5,5	5
Lavagem 1	Acetado de Na 50mM, pH 5,5	3
Lavagem 2	MOPS 25mM, pH 7,1	5
Lavagem 3	Acetado de Na 50mM, pH 5,5	3
Eluição	A: Acetado de Na 50mM, pH 5,5 B: Acetato de Na 350mM, pH 5,5	15
Sanitização	NaOH 0,5M	4
Estoque	NaOH 0,1M	3

**EXEMPLO 3**

**CROMATOGRAFIA DE TROCA ANIÔNICA**

A coluna de troca aniônica usou resina *Q Sepharose Fast Flow* (QSFF) e foi operado em modo *flow-through*. A coluna QSFF foi operada a uma velocidade de fluxo de 150 cm/h. A o diâmetro da coluna foi de 0,66 centímetros e a altura do leito foi de 20 cm. A coluna foi equilibrada e carregada em pH 8,0. O anticorpo RhuMab 2H7 fluiu através da coluna, que foi, em seguida, lavada com tampão equilíbrio. Agrupamento (formação dos pools) foi iniciado e encerrado com base na absorbância a 280 nm (0,5 O.D.). A

10

15

coluna foi regenerada e sanitizada com 0,5 N de hidróxido de sódio e armazenados em 0,1 N de hidróxido de sódio. A composição do tampão e as durações das fases estão indicadas na Tabela 12.

**TABELA 12****COMPOSIÇÃO DO TAMPÃO E DURAÇÃO DA FASE NO QSFF**

<b>Etapa</b>	<b>Tampão</b>	<b>CVs</b>
Equilíbrio	Tris 50 mM , Acetato 50 mM, pH 8,0	8
Carregamento	<i>Pool</i> acondicionado no passo anterior	até capacidade te 40g/L
Lavagem 1	Tris 50 mM, Acetate 50 mM, pH 8,0	5
Sanitização	NaOH 0,5M	4
Estoque	NaOH 0,1M	3

**EXEMPLO 4A****PURIFICAÇÃO COM POLIELETRÓLITO ANIÔNICO**

5                    *Pools* de anticorpo foram ajustados para o pH e a condutividade descritas na Tabela 13. HCCF foi ajustado para pH 6 com ácido acético 1M e condutividade de 2,0 mS/cm com WFI (água para injeção). PVS foi adicionado em linha para o HCCF condicionado para atingir uma concentração final de 0,05% p/v, por um período de 20 minutos. Enquanto misturava, o PVS foi

10 adicionado ao *pool* condicionado nas concentrações finais descritas na Tabela 13. O *pool* de PVS precipitado foi centrifugado a 4.000 rpm (4.657 g) a 10 °C durante 30 minutos utilizando uma centrífuga Sorval R3-CB. O sobrenadante foi removido e o sedimento foi lavado com MOPS 25 mM, pH 7,1. O sedimento foi ressuspenso em Tris 50 mM, acetato 50 mM, e pH 8,0 (cerca de 6,5 mS/cm). O

15 sedimento ressuspenso foi posteriormente processado por cromatografia QSFF.

**EXEMPLO 4B****PURIFICAÇÃO COM POLIELETRÓLITO CATIÔNICO**

Precipitação de fluido de cultura celular (CCF): A precipitação da

20 impureza foi realizada com poliarginina, peso molecular 110 kDa. A poliarginina foi adicionada ao CCF em um biorreator a longo de um período de 5 minutos

para chegar a uma concentração final de 0,075% p/v, enquanto misturava a 100 rpm. O CCF floculado foi então centrifugado a 10000g e esterilizado por filtração através de um filtro de 0,2 µm.

Precipitação do fluido de cultura de células coletadas (HCCF):

- 5 Poliarginina (poli-L-arginina) foi adicionada ao HCCF em um biorreator, durante um período de 5 minutos para chegar a uma concentração final de 0,1% p/v, enquanto misturava a 100 rpm. O precipitado HCCF foi, então, centrifugado a 5.000 g e esterilizado por filtração através de um filtro de 0,2 µm. A matéria-prima filtrada foi processada através de diferentes processos de purificação.

10

**TABELA 13**

**CONDIÇÕES DE PRECIPITAÇÃO PVS DO 2H7**

Execução	pH do Pool (-)	Condutividade do Pool (mS/cm)	PVS (%)	PVS (M)	Anticorpo (mg/ml)	Anticorpo (M)	mol PVS/mol Ab
HCCF-Pro A-PVS- QSFF	7	0,74	0,0125	$6,94 \times 10^{-8}$	0,67	$4,46 \times 10^{-9}$	15,57
HCCF- SP-PVS- QSFF	7	0,76	0,0125	$6,94 \times 10^{-8}$	0,13	$8,67 \times 10^{-10}$	80,13
HCCF- PVS- QSFF- SPSFF	5	3,05	0,0125	$6,94 \times 10^{-8}$	0,19	$1,24 \times 10^{-9}$	56,09
HCCF- PVS- QSFF- SPSFF	7	0,68	0,0031	$1,74 \times 10^{-8}$	0,04	$2,74 \times 10^{-10}$	63,44

**EXEMPLO 5**

**DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO PROTÉICA:**

- 15 A concentração de anticorpo nos *Pool* foi determinada pela absorbância a 280 nm (com absorbância a 320 nm subtraído para corrigir a

dispersão de luz), utilizando um espectrofotômetro 8453 com um comprimento do caminho da cela de fluxo de 10 mm (Agilent). Foi empregado um coeficiente de extinção de 1,75 ml/(mg cm). A concentração do anticorpo foi calculada utilizando a seguinte equação:

$$\text{mg/mL} = \frac{A_{280} - A_{320}}{1,75} \times \text{fator de diluição}$$

5

### **EXEMPLO 6**

#### **CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO POR TAMANHO**

A cromatografia de exclusão por tamanho foi utilizado para controlar a heterogeneidade do tamanho da rhuMAb 2H7 sob condições nativas. O ensaio empregou uma coluna TSK-GEL G3000SWXL (7,8 mm x 300  
10 mm, Tosohaas) para separar agregados, monômeros e fragmentos. A coluna foi operado a uma velocidade de fluxo de 0,3 mL/min utilizando um tampão de corrida com fosfato de potássio 0,20 M, cloreto de potássio 0,25 M em pH 6,2. A coluna foi operado em temperatura ambiente. As amostras foram diluídas em tampão de corrida e 20µg foi injetado para cada amostra. A absorbância a  
15 280nm foi utilizada para monitorar os níveis de agregados, monômeras e fragmentos.

### **EXEMPLO 7**

#### **ELISA-Y: 42 PARA CHOP**

Um Ensaio Imunoabsorvente Enzima-Associado (ELISA),  
20 utilizando anticorpos de cabra anti-CHOP foi utilizado para determinar as concentrações de CHOP em todos os *Pools*. Para o teste de ELISA, anticorpos de afinidade purificada de cabra anti-CHOP foram imobilizados em poços de microplacas. Diluições das amostras de *pool* foram incubadas nos poços, seguida pela incubação com o conjugado anticorpos de cabra anti-CHOP -  
25 peroxidase. A atividade enzimática da peroxidase do rábano silvestre foi quantificada com o-fenilenodiamina, que produz um sinal colorimétrico. As

amostras foram diluídas em diluente de ensaio para que a leitura da absorbância caísse dentro do intervalo do ensaio (5-320 ng/ml).

#### **EXEMPLO 8**

##### **ELISA - Y: 80 PARA PROTEÍNA A**

5 O nível de proteína-A foi determinada por um ensaio de ELISA – proteína A do tipo sanduíche. Anticorpos de galinha anti-Proteína A estafilocócica foram imobilizados em poços de microplacas. As amostras foram diluídas a 0,2 mg/ml de anticorpos e aplicado aos poços. A Proteína A, se presente na amostra, se liga ao anticorpo revestido. A Proteína A ligada foi  
10 detectada com peroxidase do rábano silvestre conjugado com anticorpos anti-proteína. A atividade enzimática da peroxidase do rábano silvestre foi quantificada com o-fenilenodiamina, que produz um sinal colorimétrico.

#### **EXEMPLO 9**

##### **ELISA - Y:64 PARA INSULINA**

15 Um teste de ELISA usando anticorpos policlonais de cobaia anti-insulina foi utilizado para determinar as concentrações de insulina em todos os *pools*. Para o teste de ELISA, anticorpos de afinidade purificada anti-insulina foram imobilizados em poços de microplacas Diluições das amostras de *pool* foram incubadas nos poços, seguida pela incubação com o conjugado  
20 anticorpos de cobaias anti-insulina – peroxidase. A atividade enzimática da peroxidase do rábano silvestre foi quantificada com tetrametil benzidina. As amostras foram diluídas em diluente de ensaio para que a leitura da absorbância caísse dentro do intervalo do ensaio (0,094-3,000 ng/ml).

#### **EXEMPLO 10**

##### **ELISA - Y: 81 PARA GENTAMICINA**

25 A ensaio de ELISA competitivo foi utilizado para determinar as concentrações de gentamicina em todos os *pools*. Anticorpos policlonais de cabra para gentamicina-BSA foram imobilizados em poços de microplacas. A

gentamicina competiu com a gentamicina-biotinilada pela ligação aos anticorpos. A quantidade de gentamicina marcada com biotina foi detectada com a adição de peroxidase do rábano silvestre e com o substrato o-fenilenodiamina. As amostras foram diluídas em diluente de ensaio para que a  
5 leitura da absorbância caísse dentro do intervalo do ensaio (0,37-90 ng/ml).

### EXEMPLO 11

#### ENSAIO DE PCR - Y: 77 PARA DNA DE CHO

O DNA foi quantificado pela amplificação por PCR do DNA das CHO. As amostras de DNA e controles foram primeiro extraídas usando o kit  
10 *Qiagen's Viral RNA Mini kit*. Os extratos e curva padrão, juntamente com a mix para PCR "*PCR master mix*" contendo *primers* e sonda, foram, então, carregados em uma placa de 96 poços em sistema de detecção de sequência comercial (Applied Biosystems), onde o DNA das CHO foi quantificado utilizando a PCR em tempo real. TaqMan® PCR emprega *primers* e sonda que  
15 são especificamente projetados para a sequência alvo de DNA das CHO. Produto da amplificação foi mensurado utilizando sondas fluorogênicas, marcadas com um corante repórter na 5' terminal, que é reprimida por uma corante apagador na 3' terminal. A *Taq polimerase* começa amplificação do DNA alvo e após a movimentação da sonda, o sua atividade nuclease 5'  
20 desloca a sonda, liberando o corante repórter. Com o corante repórter não mais em proximidade com o corante apagador, o corante repórter causa fluorescência, e o aumento da intensidade de emissão é mensurada. O número de ciclos no qual o DNA foi amplificado foro do limiar (Ct) é calculado pela curva padrão, contra a qual as concentrações de amostra desconhecida é  
25 quantificada.

### EXEMPLO 12

#### POTÊNCIA DO RHUMAB 2H7

A potência do rhuMAb 2H7 foi determinada através do ensaio de

citotoxicidade dependente de complemento (CDC). Este ensaio é baseado na medição da capacidade do rhuMAb 2H7 para lisar células WIL2-S, na presença de complemento humano.

### **EXEMPLO 13**

#### **5                    ENSAIO DE INIBIÇÃO DA RNASE PELO PVS**

PVS é um potente inibidor de RNase A. O ensaio utiliza um RNA análogo com um marcador fluorescente em uma extremidade e um apagador na outra. Uma vez que o RNA análogo é clivado pela RNase A, o marcador fluorescente é liberado do apagador produzindo a emissão. A presença do PVS  
10 irá inibir a atividade da RNase A, limitando a emissão fluorescente. A quantidade de PVS pode então ser determinada pela comparação da fluorescência observada a partir de uma amostra por uma curva padrão.

A descrição exposta acima é considerada apenas como ilustrativa dos princípios da presente invenção. Além disso, uma vez que muitas  
15 modificações e alterações serão facilmente perceptíveis para os técnicos hábeis no assunto, não se deseja limitar a invenção para a exata construção e processo exibida na descrição acima. Desse modo, todas as modificações e equivalentes adequados podem ser consideradas como estando dentro do escopo da presente invenção, tal como definido pelas reivindicações que  
20 seguem.

As palavras "compreender", "compreendendo", "incluir", "incluindo", e "engloba", quando utilizado no presente relatório descritivo e nas reivindicações seguintes destinam-se a especificar a presença das características declarada, inteira, componentes ou etapas, mas eles não  
25 impedem a presença ou adição de uma ou várias outras funções, inteiros, componentes, etapas ou grupos destes.



## REIVINDICAÇÕES

1       MÉTODO DE PURIFICAÇÃO DE ANTICORPOS,  
compreendendo:

(a) o ajuste da acidez ou concentração de sal de uma mistura que  
5 contém um anticorpo onde o anticorpo é derivado de um fluído de cultura de  
células coletados e o fluído de cultura de células coletados é derivado de uma  
cultura de células de mamíferos;

(b) a adição de um polieletrólito carregado negativamente  
selecionado a partir de ácido polivinilsulfônico, ácido polivinilsulfonato, ácido  
10 polistirenosulfônico e ácido poliacrílico e onde o polieletrólito carregado  
negativamente tem um peso molecular de 1,2 a 1100 kDa, sendo que um  
precipitado proteína-polieletrólito é formado;

(c) a separação do precipitado proteína-polieletrólito das  
impurezas selecionadas a partir dos agregados de proteínas, fragmentos de  
15 proteínas, proteínas da célula hospedeira, insulina, gentamicina, DNA e  
proteína A lixiviada;

(d) o isolamento do precipitado proteína-polieletrólito; e

(e) a ressuspensão do precipitado proteína-polieletrólito em uma  
solução aquosa.

20       2       MÉTODO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado  
pelo fato de que o anticorpo é selecionado a partir de um anticorpo monoclonal,  
um fragmento de anticorpo e uma proteína de fusão.

3       MÉTODO, de acordo com a reivindicação 2, caracterizado  
pelo fato de que o anticorpo é selecionado a partir de um anticorpo anti-CD20,  
25 um anticorpo anti-DR5 e um anticorpo anti-cMET.

4       MÉTODO, de acordo com a reivindicação 3, caracterizado  
pelo fato de que o anticorpo anti-CD20 é 2H7.

5       MÉTODO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado

pelo fato de que a cultura de células mamíferas é a cultura de células de Ovário de Hamster Chinês (CHO).

6 MÉTODO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a proteína é derivada do fluido de cultura de células coletadas  
5 pela imobilização da proteína em uma proteína A adsorvente.

7 MÉTODO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a proteína é derivada do fluido de cultura de células coletadas, por cromatografia de troca catiônica.

8 MÉTODO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado  
10 pelo fato de que a proteína é diretamente capturada a partir do fluido de cultura de células coletado.

9 MÉTODO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que um ou mais polieletrólitos negativamente carregados são adicionados à mistura.

15 10 MÉTODO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a concentração de polieletrólito carregado positivamente está entre 0,01% a 1,0% peso/volume na mistura contendo a proteína.

11 MÉTODO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o precipitado proteína-polieletrólito é formado no modo *batch*  
20 ou modo contínuo.

12 MÉTODO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o precipitado proteína-polieletrólito é isolado por centrifugação.

13 MÉTODO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o precipitado proteína-polieletrólito é isolado por filtração.

25 14 MÉTODO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o precipitado proteína-polieletrólito é isolado por filtração profunda.

15 MÉTODO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado

pelo fato de que a proteína é ressolubilizada com uma única passagem de tampão de ressolubilização através do filtro.

16 MÉTODO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado  
pelo fato de que a proteína é re-suspensa pela recirculação do tampão  
5 ressolubilização através do filtro.

17 MÉTODO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado  
pelo fato de que o polieletrólito é separado a partir do precipitado proteína-  
polieletrólito ressuspenso pela purificação de troca aniônica.

18 MÉTODO DE PURIFICAÇÃO DE ANTICORPOS,  
10 compreendendo:

(a) o ajuste da acidez ou concentração de sal de uma mistura que  
contém um anticorpo onde o anticorpo é derivado de um fluido de cultura de  
células e o fluido de cultura de células é derivado de uma cultura de células de  
mamíferos;

15 (b) a adição de polieletrólito polication, carregado positivamente  
selecionado a partir de poliarginina de massa molecular entre 42 a 110 kDa e  
polilisina de peso molecular entre 2,5 a 225 kDa para a mistura na qual o  
precipitado é formado contendo o polieletrólito polication, carregado  
positivamente e impurezas selecionadas a partir de agregados de proteína,  
20 fragmentos de proteína, proteínas de célula hospedeira, insulina, gentamicina e  
DNA, e

(c) a separação do precipitado a partir da mistura compreendendo  
o anticorpo.

19 MÉTODO, de acordo com a reivindicação 18, caracterizado  
25 pelo fato de que a cultura de células mamíferas é a cultura de células de Ovário  
de Hamster Chinês.

20 MÉTODO, de acordo com a reivindicação 18, caracterizado  
pelo fato de que o anticorpo é selecionado a partir de um anticorpo monoclonal,

um fragmento de anticorpo e uma proteína de fusão.

21 MÉTODO, de acordo com a reivindicação 20, caracterizado pelo fato de que o anticorpo é um anticorpo anti-CD20 ou um anticorpo anti-CD22.

5 22 MÉTODO, de acordo com a reivindicação 21, caracterizado pelo fato de que o anticorpo anti-CD-20 é 2H7.

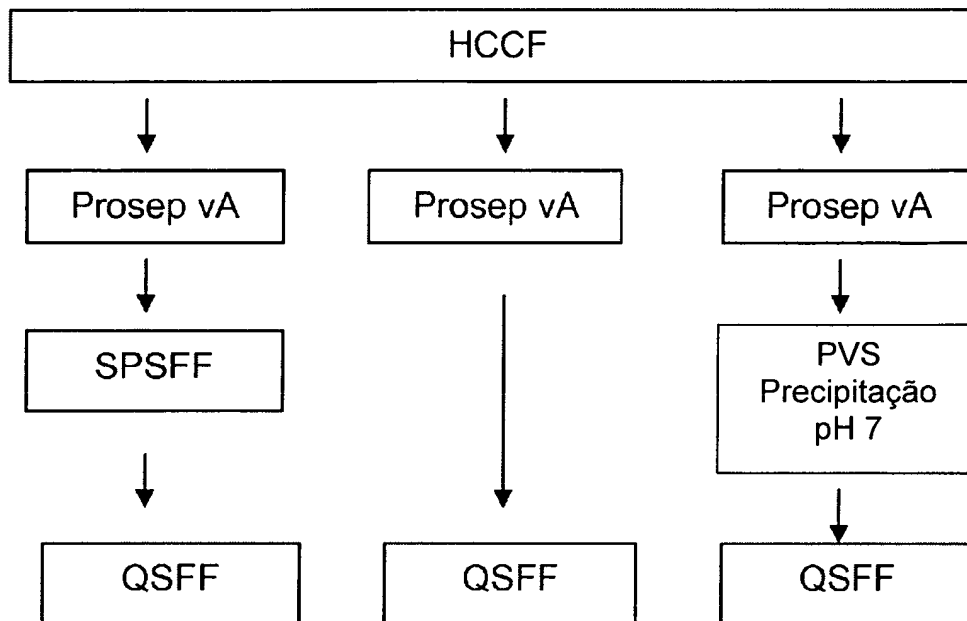
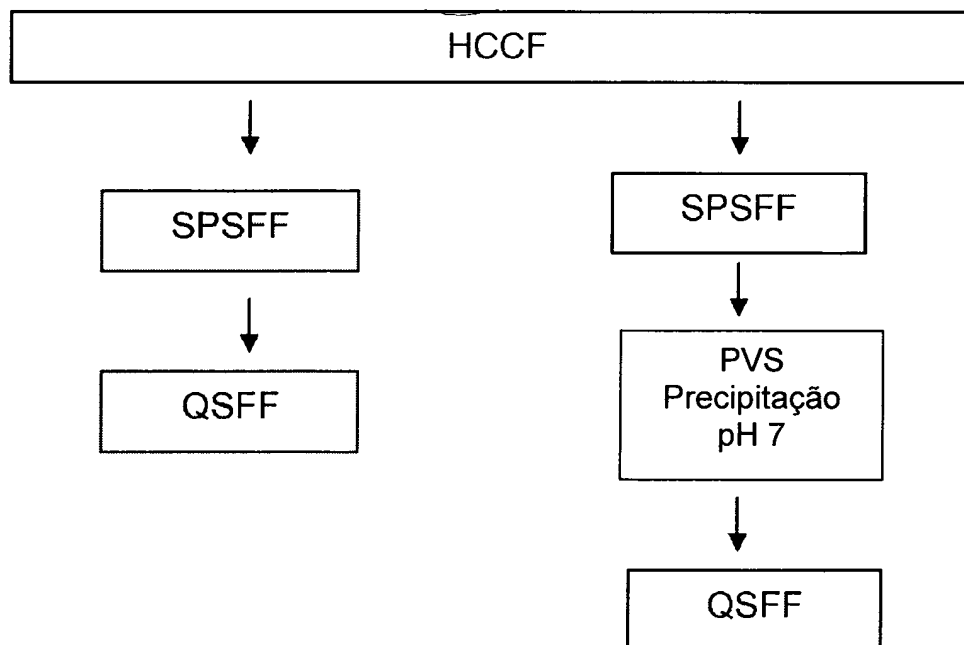
23 MÉTODO, de acordo com a reivindicação 18, caracterizado pelo fato de que mais de um polieletrólito polication, carregado positivamente, é adicionado à mistura.

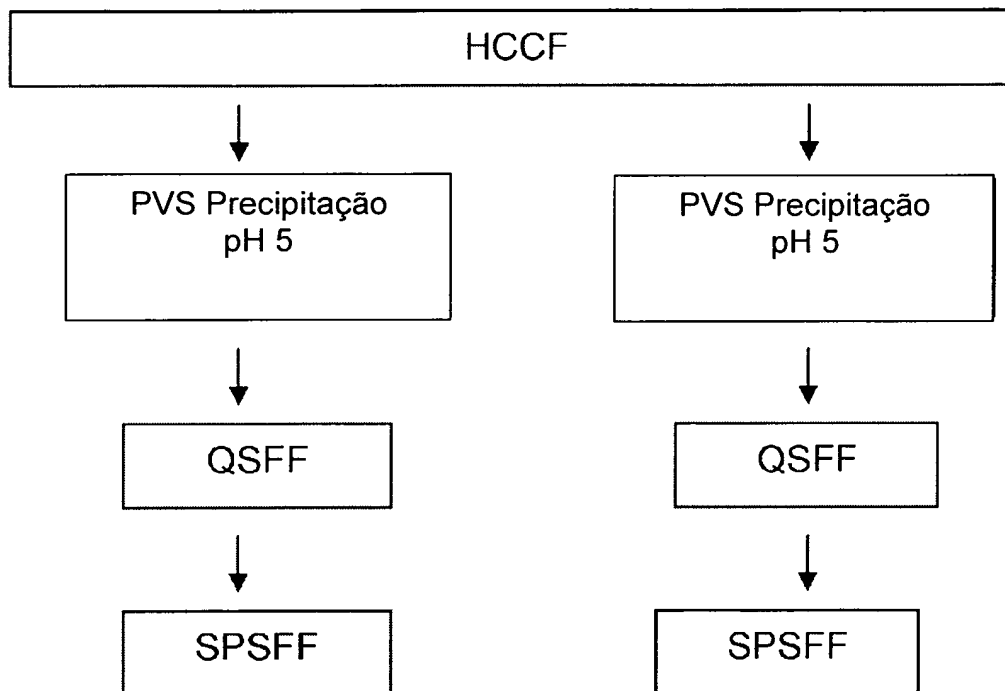
10 24 MÉTODO, de acordo com a reivindicação 18, caracterizado pelo fato de que a concentração de polieletrólito polication, positivamente carregado, está entre 0,01% a 1% peso/volume na mistura contendo a proteína.

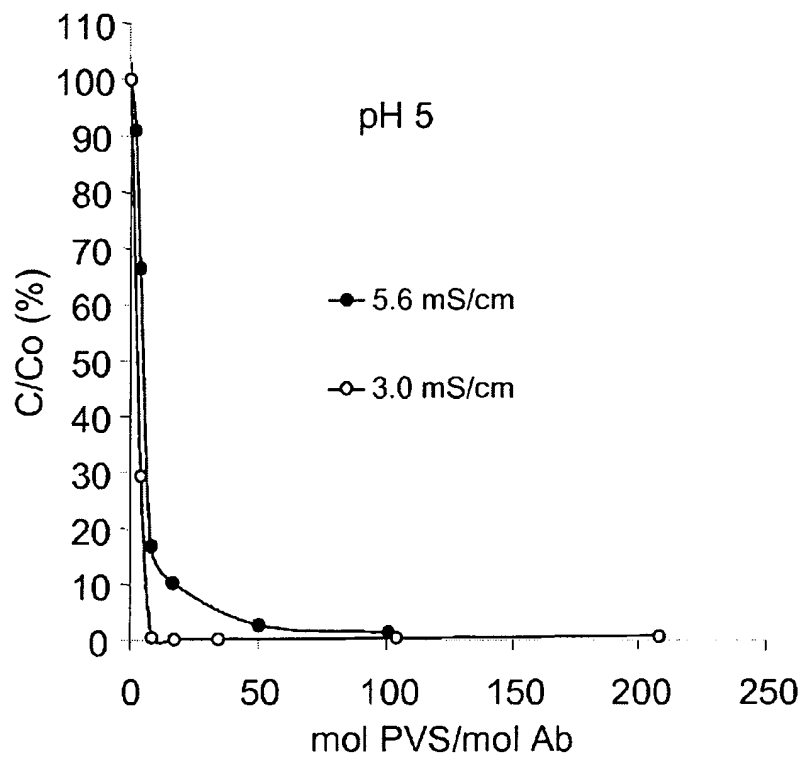
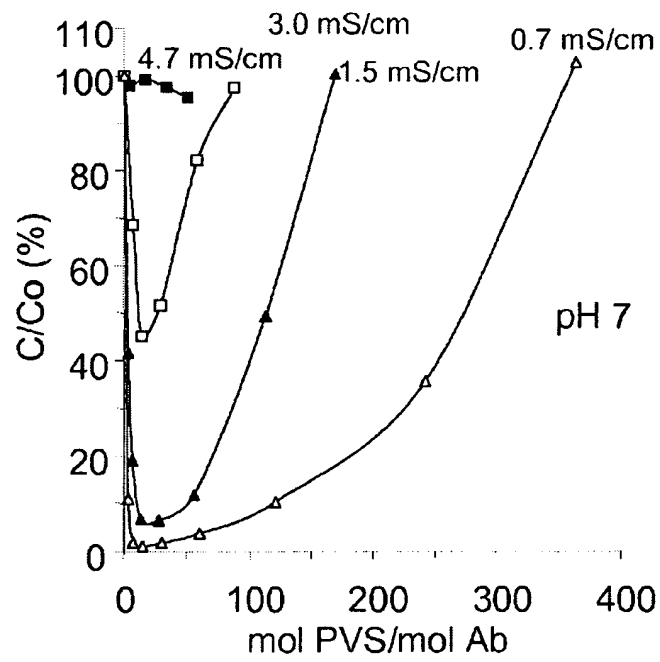
15 25 MÉTODO, de acordo com a reivindicação 18, caracterizado pelo fato de que o precipitado é formado no modo *batch* ou modo contínuo.

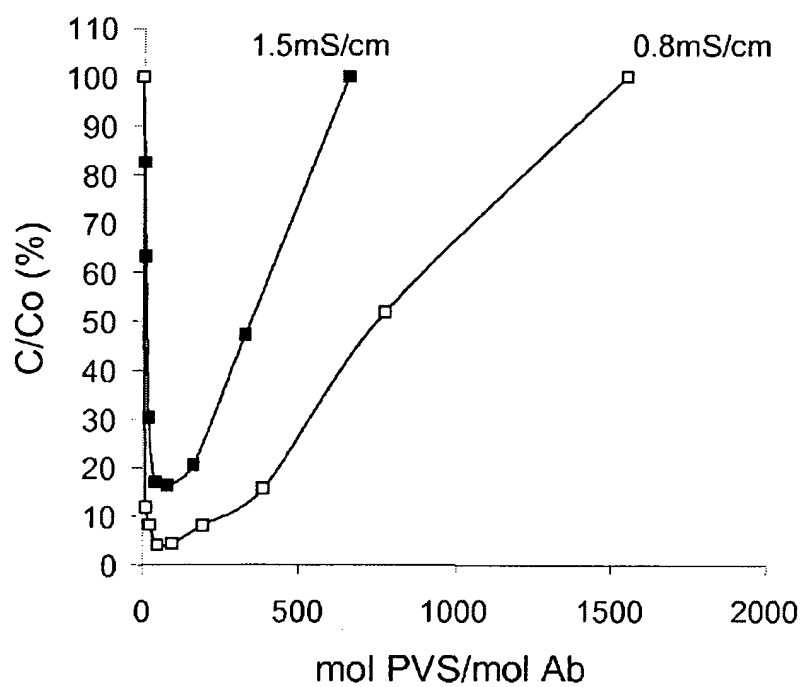
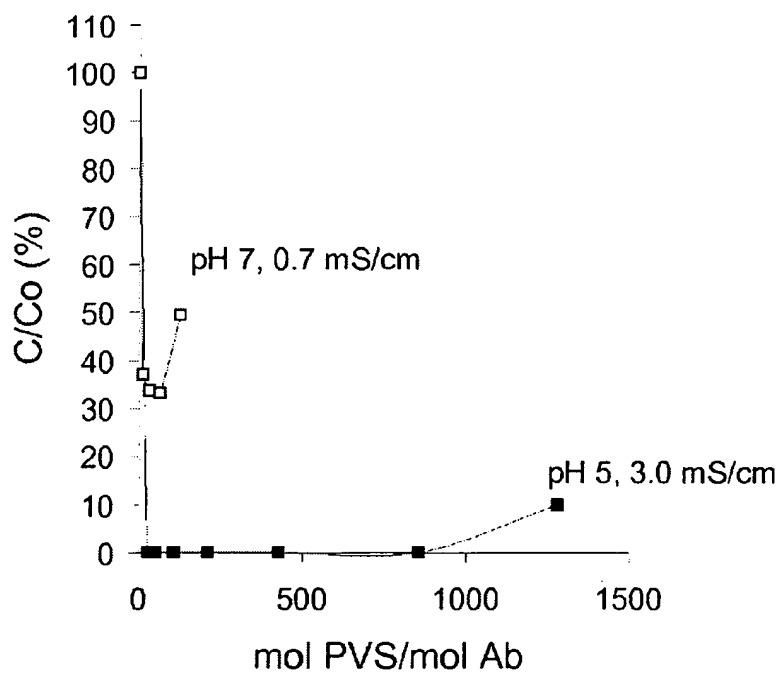
26 MÉTODO, de acordo com a reivindicação 18, caracterizado pelo fato de que o precipitado é separado da mistura por centrifugação.

27 MÉTODO, de acordo com a reivindicação 18, caracterizado pelo fato de que o precipitado é separado da mistura por filtração.

**Fig. 1****Fig. 2**

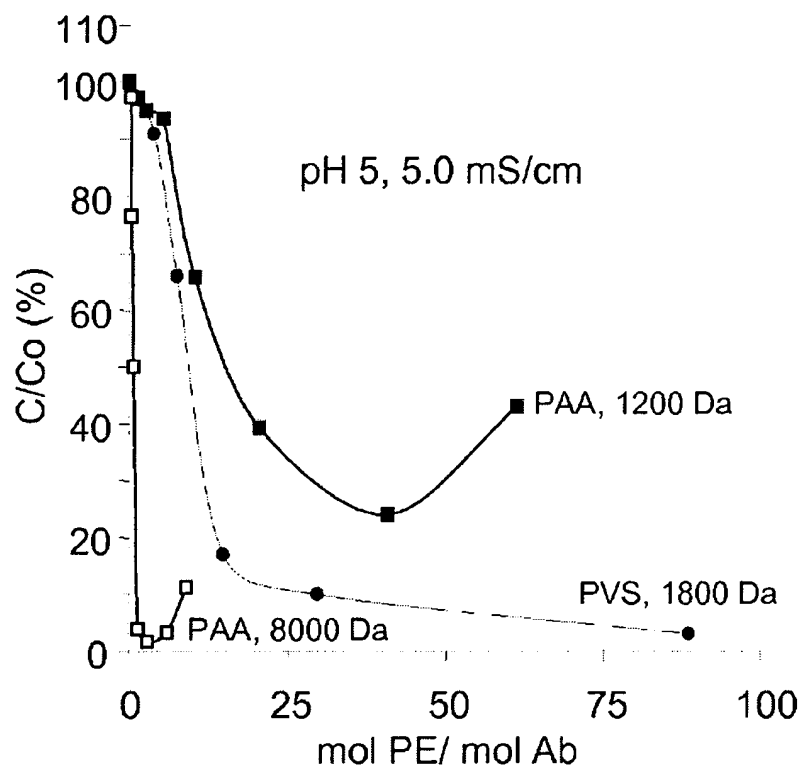
**Fig. 3**

**Fig. 4****Fig. 5**

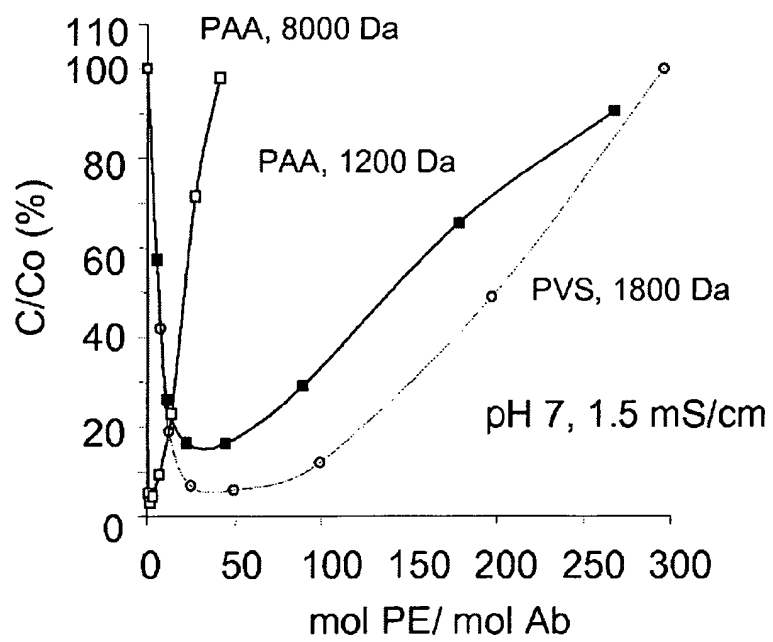
**Fig. 6****Fig. 7**



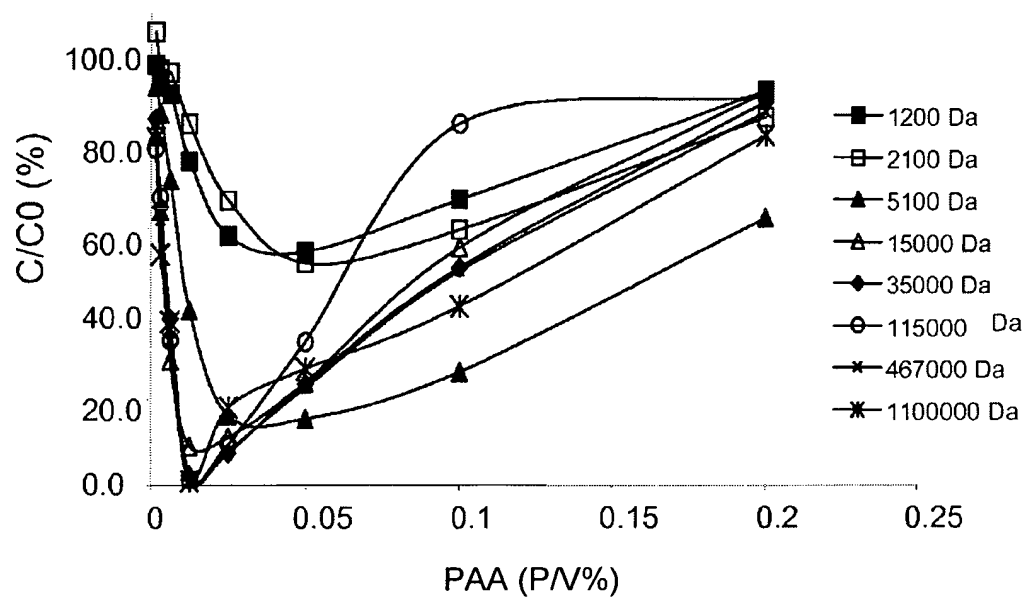
5/24



**Fig. 8**



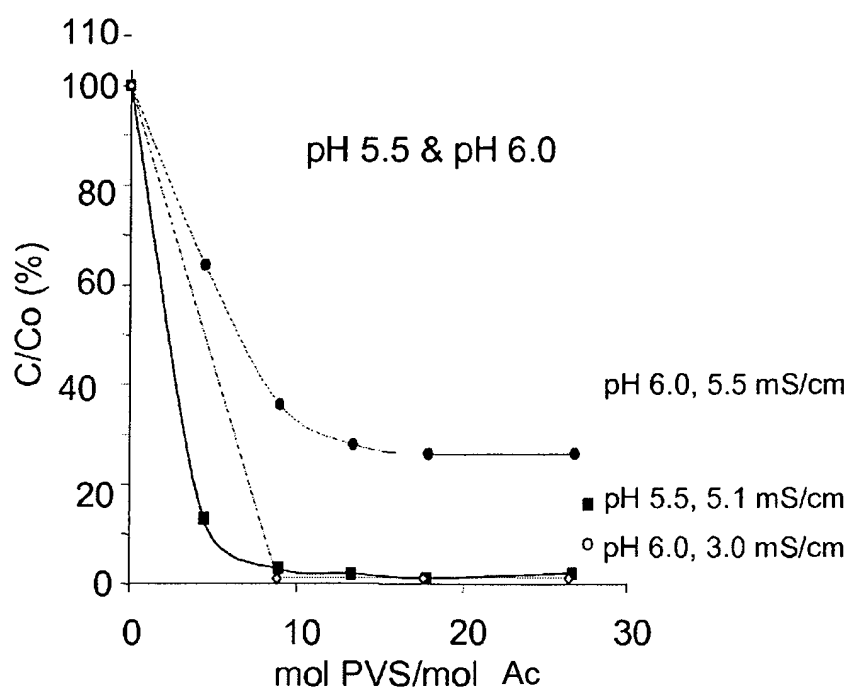
**Fig. 9**

**Fig. 10**

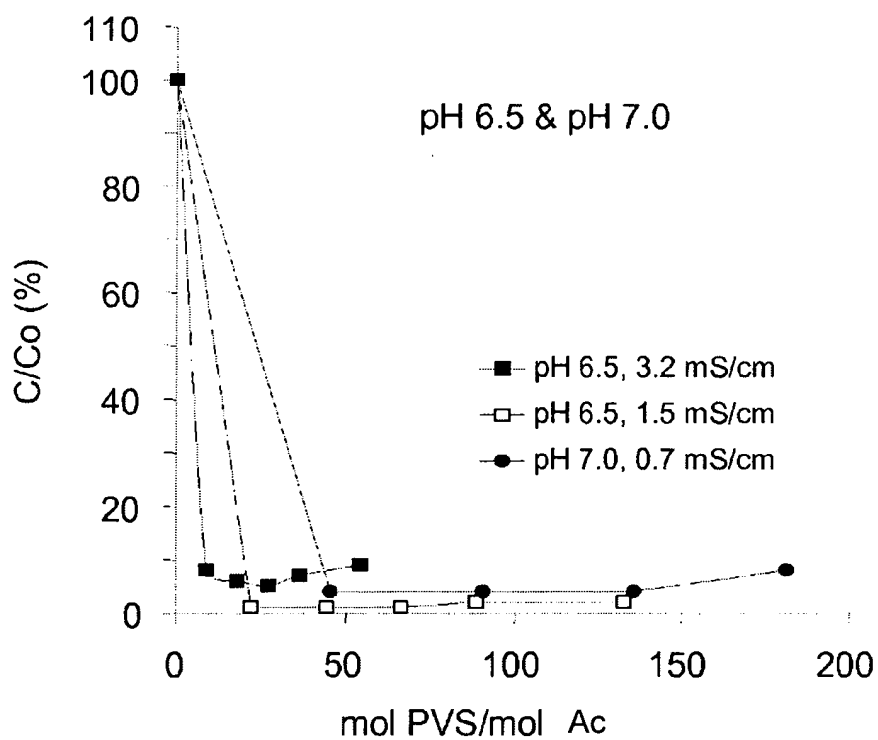
	Densidade de carga		Rendimento %	CHOP (ng/mg)	Proteína A (ng/mg)	Agregado (%)	Monômero (%)	Fragmento (%)	Insulina (ng/mg)	DNA µg/mg	Gentamicina (µg/mg)
	(mg/ml)	(mg/ml)									
HCCF	N/A	N/A	N/A	234276	N/A	N/D	N/D	N/D	2.410	2730769	25460
a) HCCF processed											
Através da Proteína A											
Proteína A	14	95	95	1105	23	0.80	98.92	0.27	0.002	198	9
SP SFF	40	95	95	199	<2	0.82	98.99	0.19	<0.034	<0.18	0.26
Q SFF	40	96	96	<0.7	<2	0.71	99.28	0.01	<0.064	<0.34	0.24
Proteína A	14	95	95	1105	23	0.80	98.92	0.27	0.002	198	9
Q SFF	40	97	97	3.9	23	0.64	99.11	0.25	<0.051	<0.27	5
Proteína A	14			1105	23	0.80	98.92	0.27	0.002	198	9
PVS Precipitação pH 7 *	N/A	100	100	244	4	0.74	99.21	0.04	<0.064	ND	1.26
Q SFF	40	92	92	1.1	2	0.68	99.29	0.03	<0.080	<0.42	1.29
b) HCCF Processado											
Através SP SFF											
SP SFF	10	82	82	4252	N/A	0.34	90.42	9.24	<0.086	0.55	146
Q SFF	40	100	100	71	N/A	0.28	90.99	8.73	<0.154	1.37	170
SP SFF	10	82	82	4252	N/A	0.34	90.42	9.24	<0.086	0.55	146
PVS Precipitação pH 7 *	N/A	86	86	190	N/A	0.61	95.78	3.61	<0.155	ND	8
Q SFF	40	95	95	4.1	N/A	0.51	95.98	3.51	<0.177	0.94	8
c) PVS Precipitation of HCCF											
PVS Precipitação pH 5 *	N/A	88	88	92854	N/A	1.75	95.93	2.32	2.077	ND	4484
Q SFF	37	90	90	1589	N/A	0.21	99.30	0.49	1.934	2.05	2454
SP SFF	35	95	95	33	N/A	0.50	94.35	5.15	<0.042	<0.22	13
PVS Precipitação pH 7 *	N/A	82	82	27422	N/A	3.60	95.93	0.47	0.009	ND	2604
Q SFF	40	95	95	361	N/A	1.39	98.81	0.00	<0.192	4.35	1158
SP SFF	40	102	102	18	N/A	0.99	98.80	0.21	<0.035	<0.18	4

Fig. 11

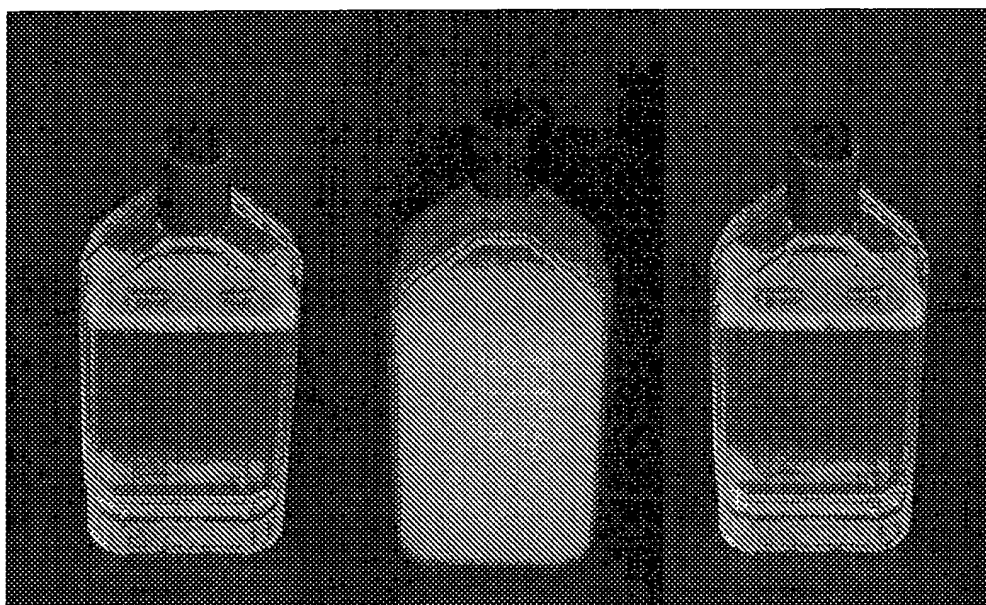
8/24



**Fig. 12**



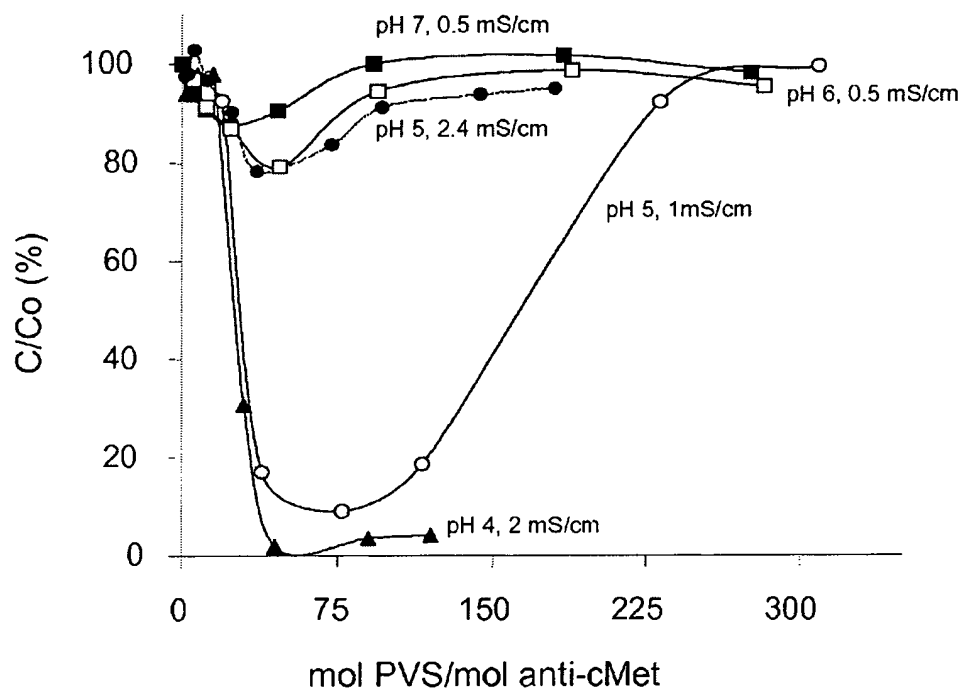
**Fig. 13**



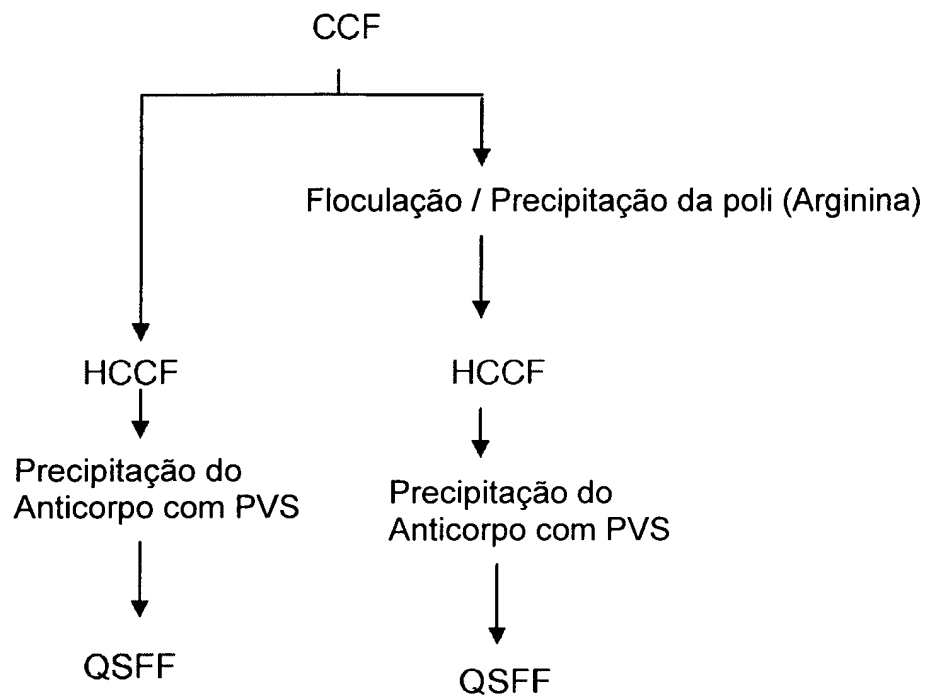
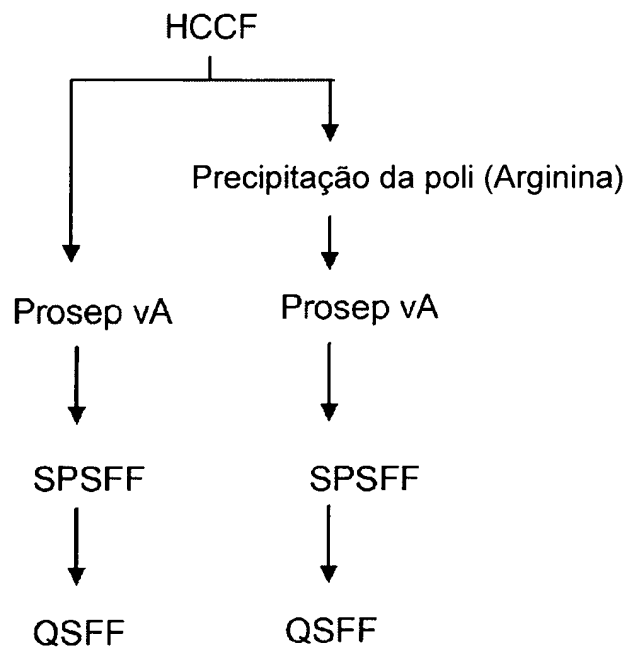
0% PVS (w/v)	0.1% PVS (w/v)	1% PVS (w/v)
Apomab em solução	Apomab Precipitação	Apomab re- solubilizado

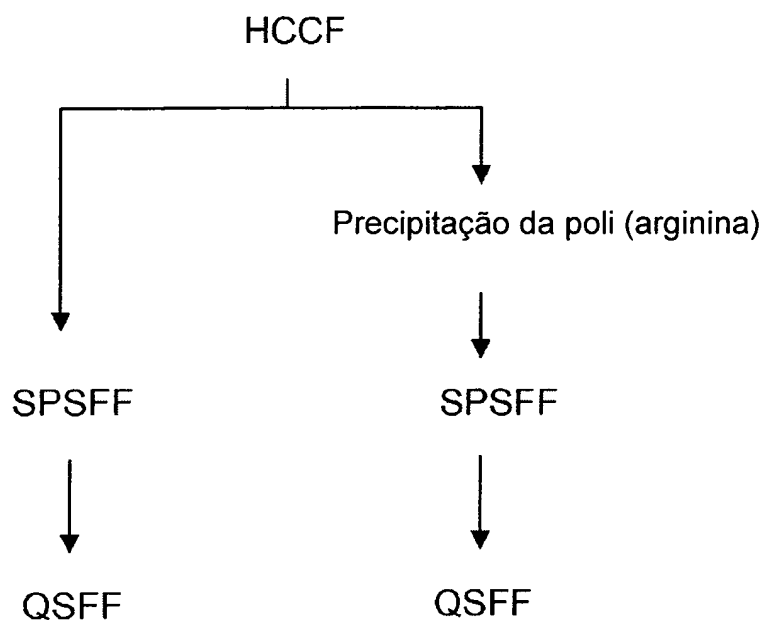
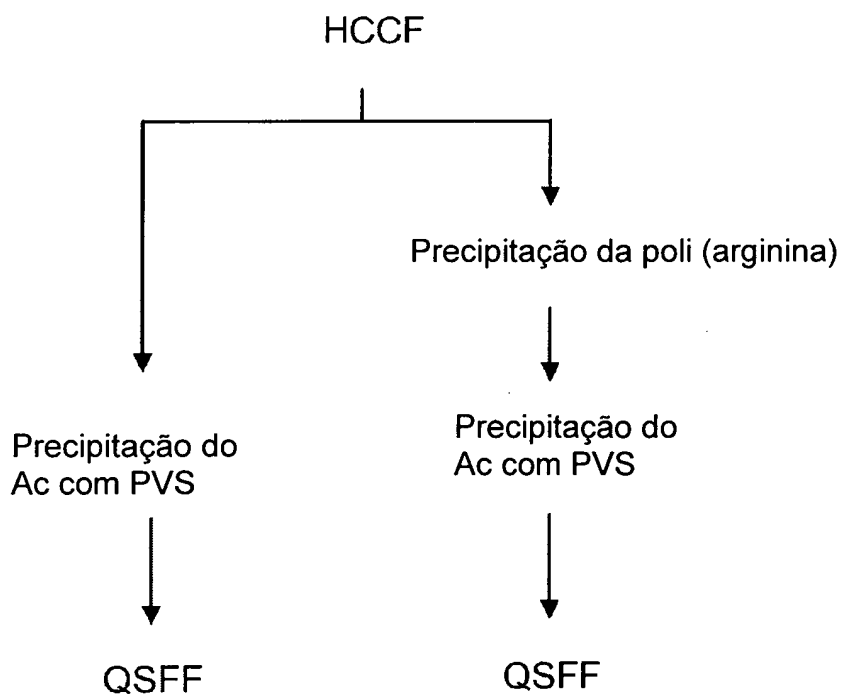
**Fig. 14**

10/24

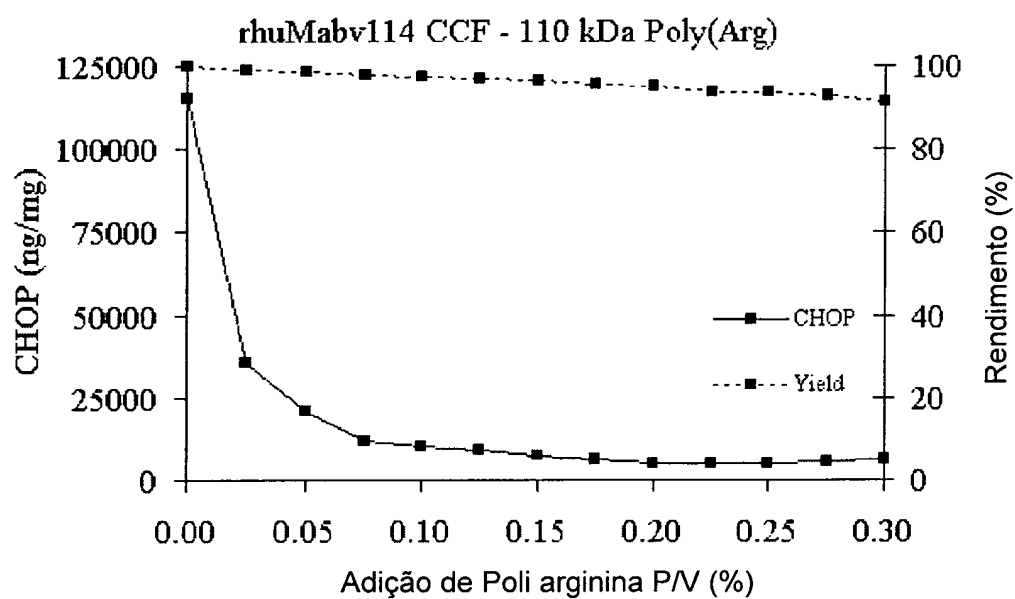
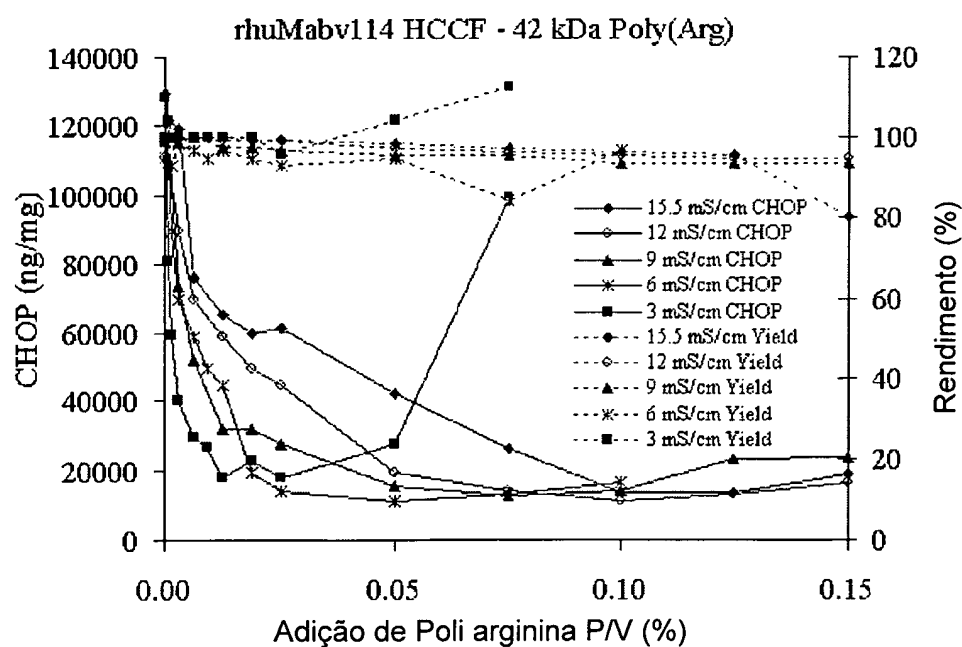


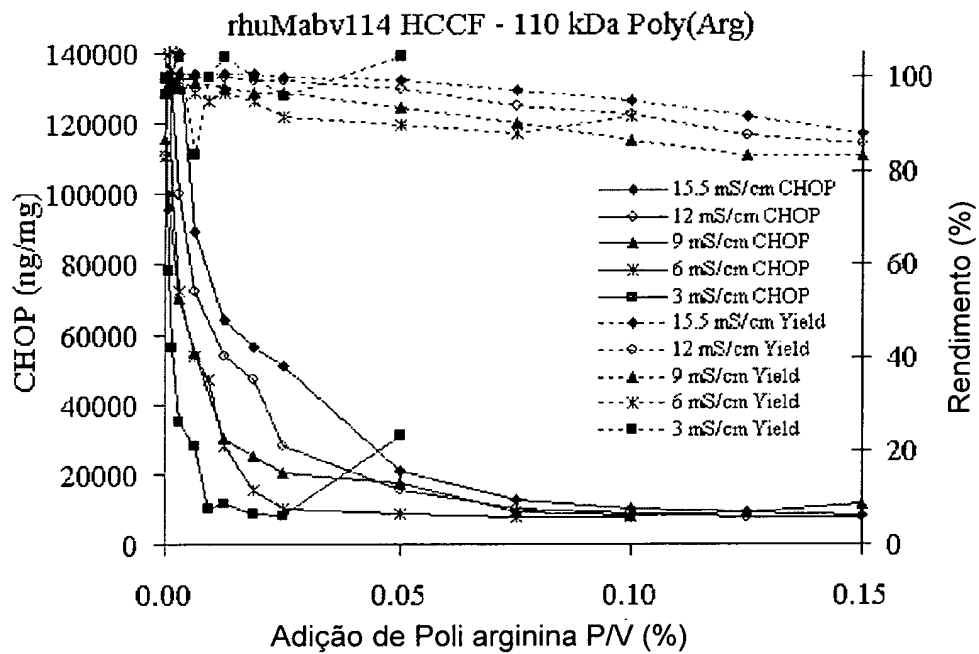
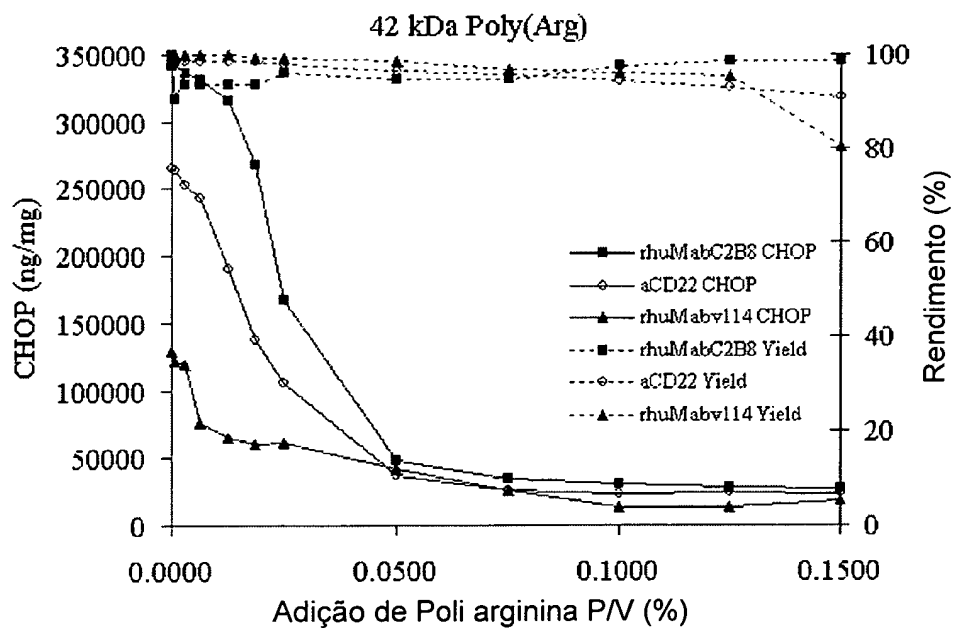
**Fig. 15**

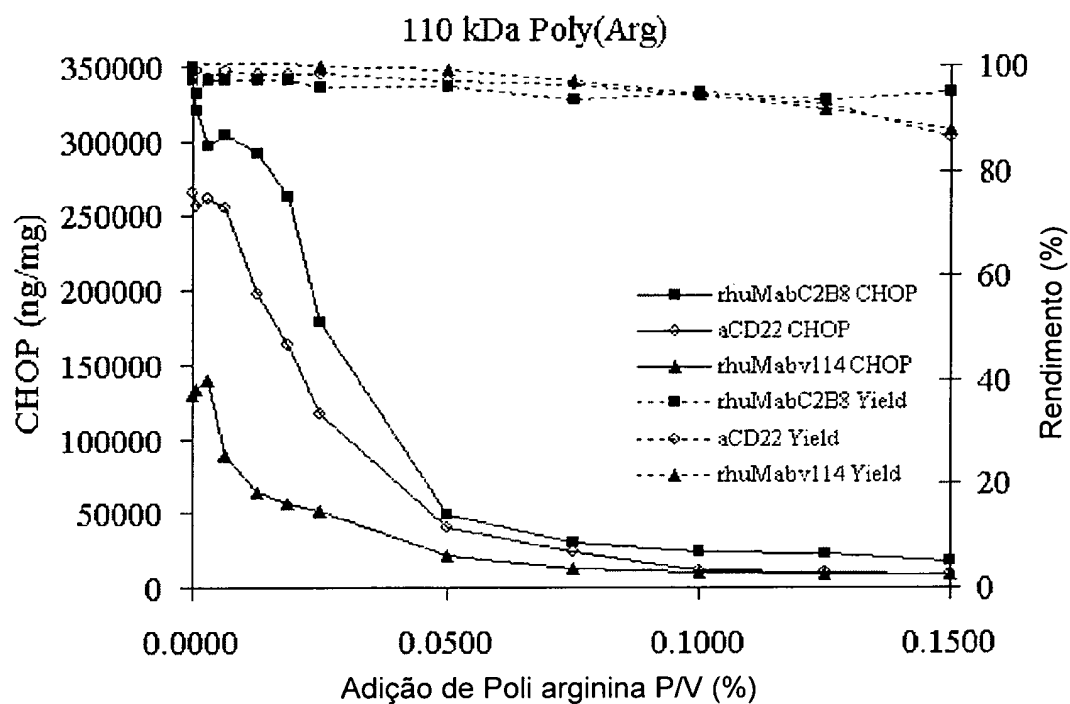
**Fig. 16****Fig. 17**

**Fig. 18****Fig. 19**

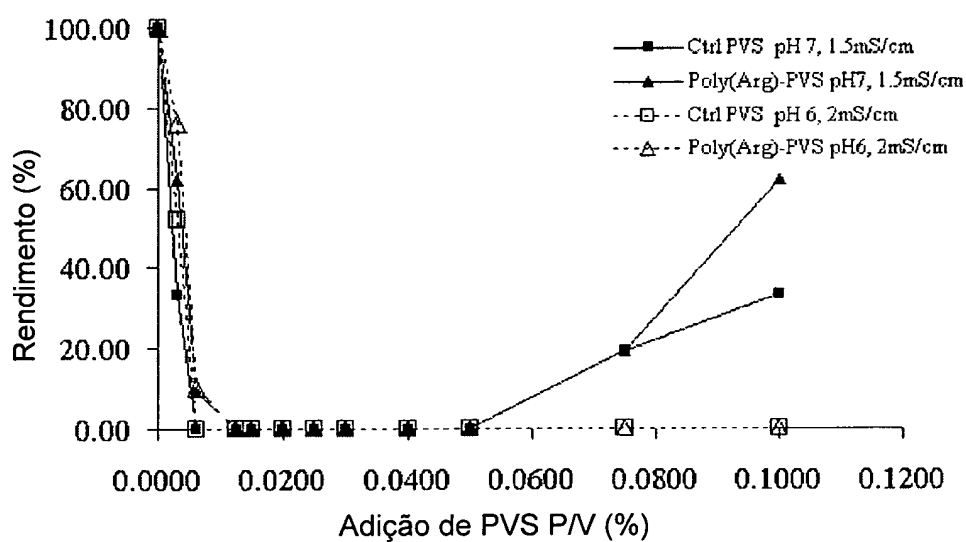


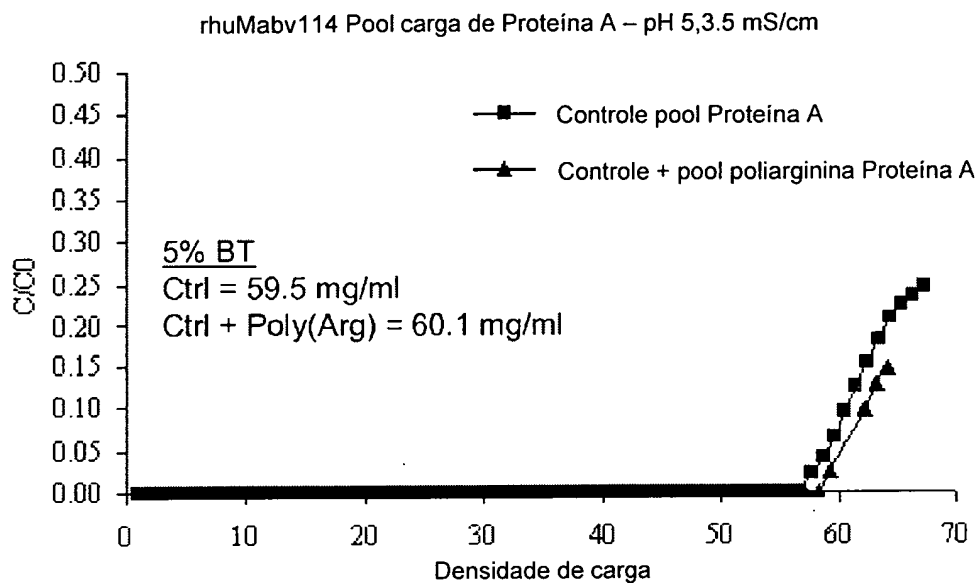
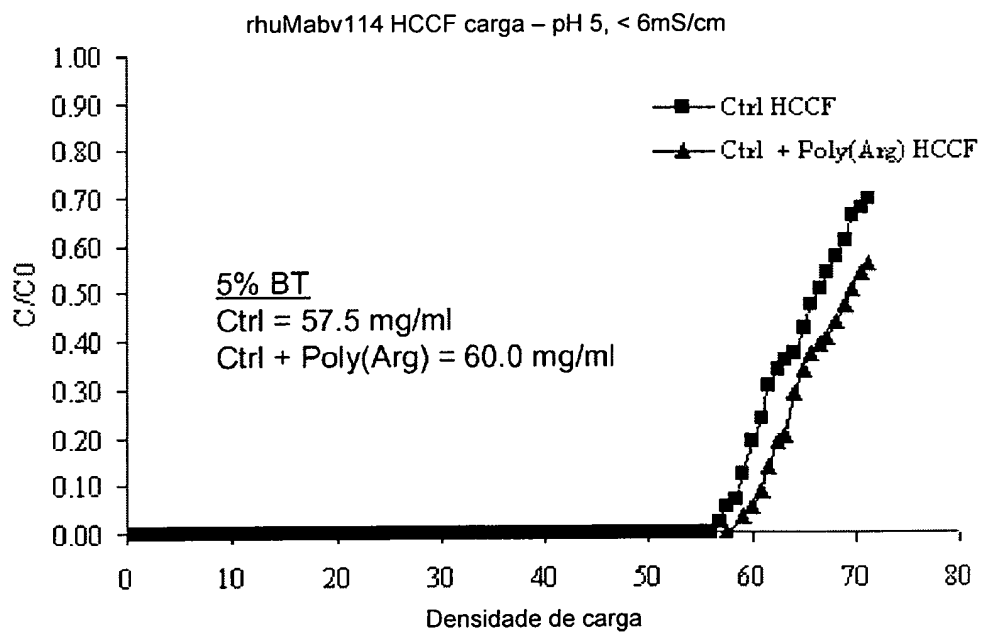
**Fig. 20****Fig. 21**

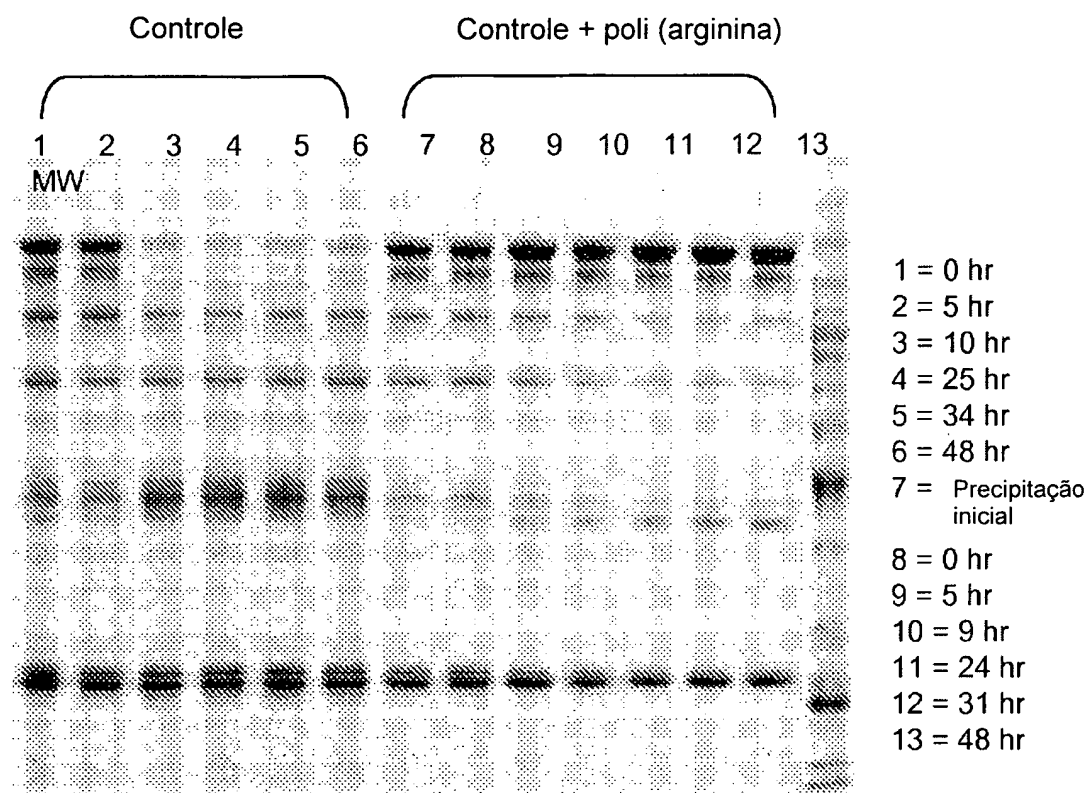
**Fig. 22****Fig. 23**

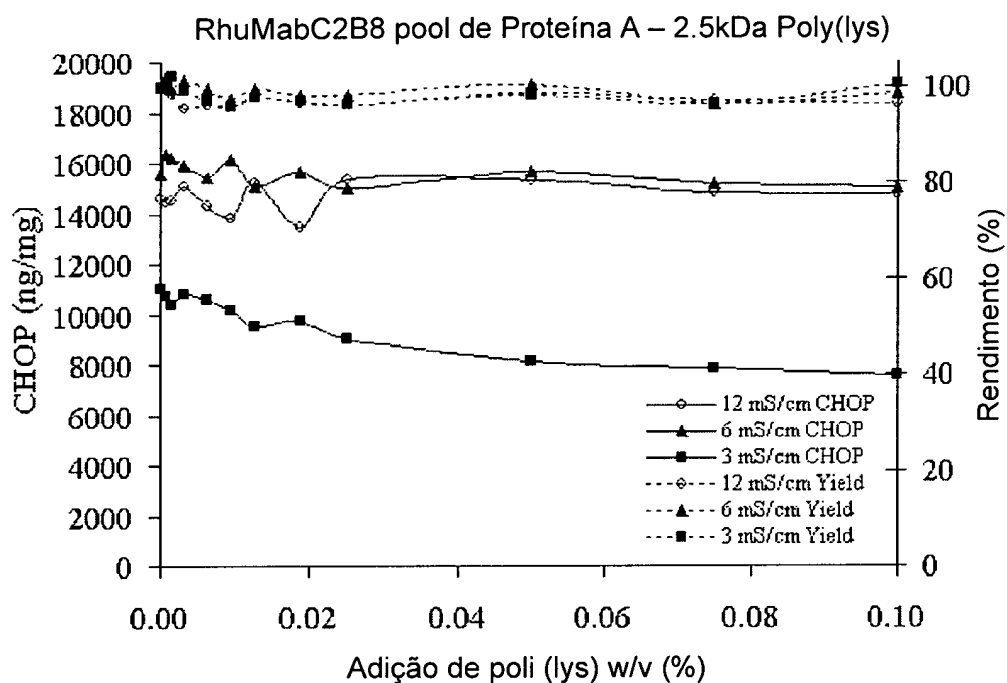
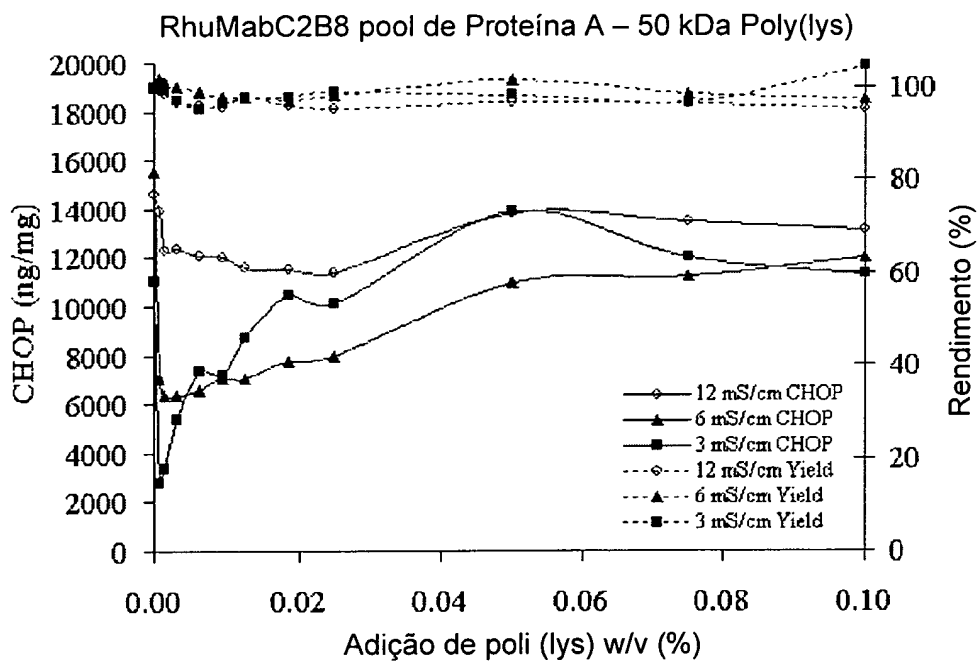
**Fig. 24**

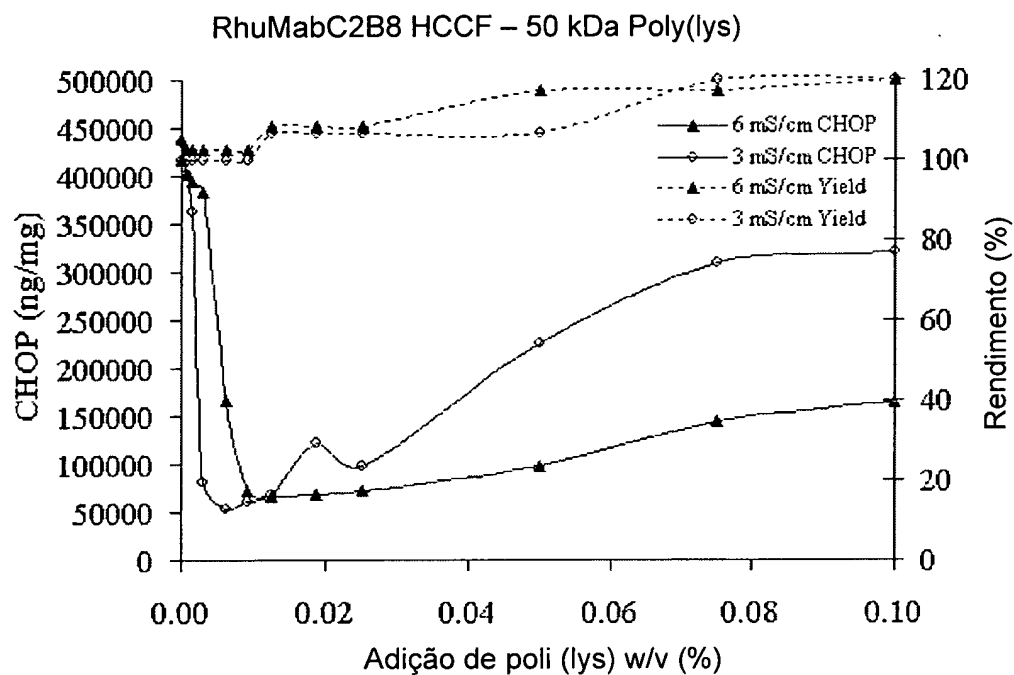
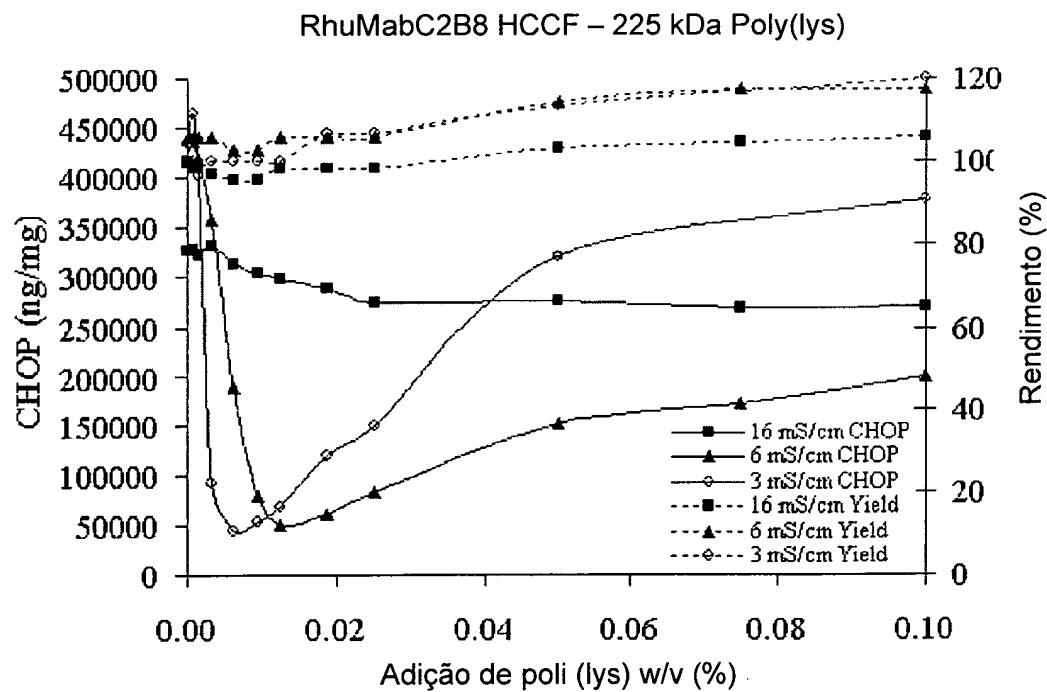
PVS precipitation of flocculated rhuMabv114 CCF

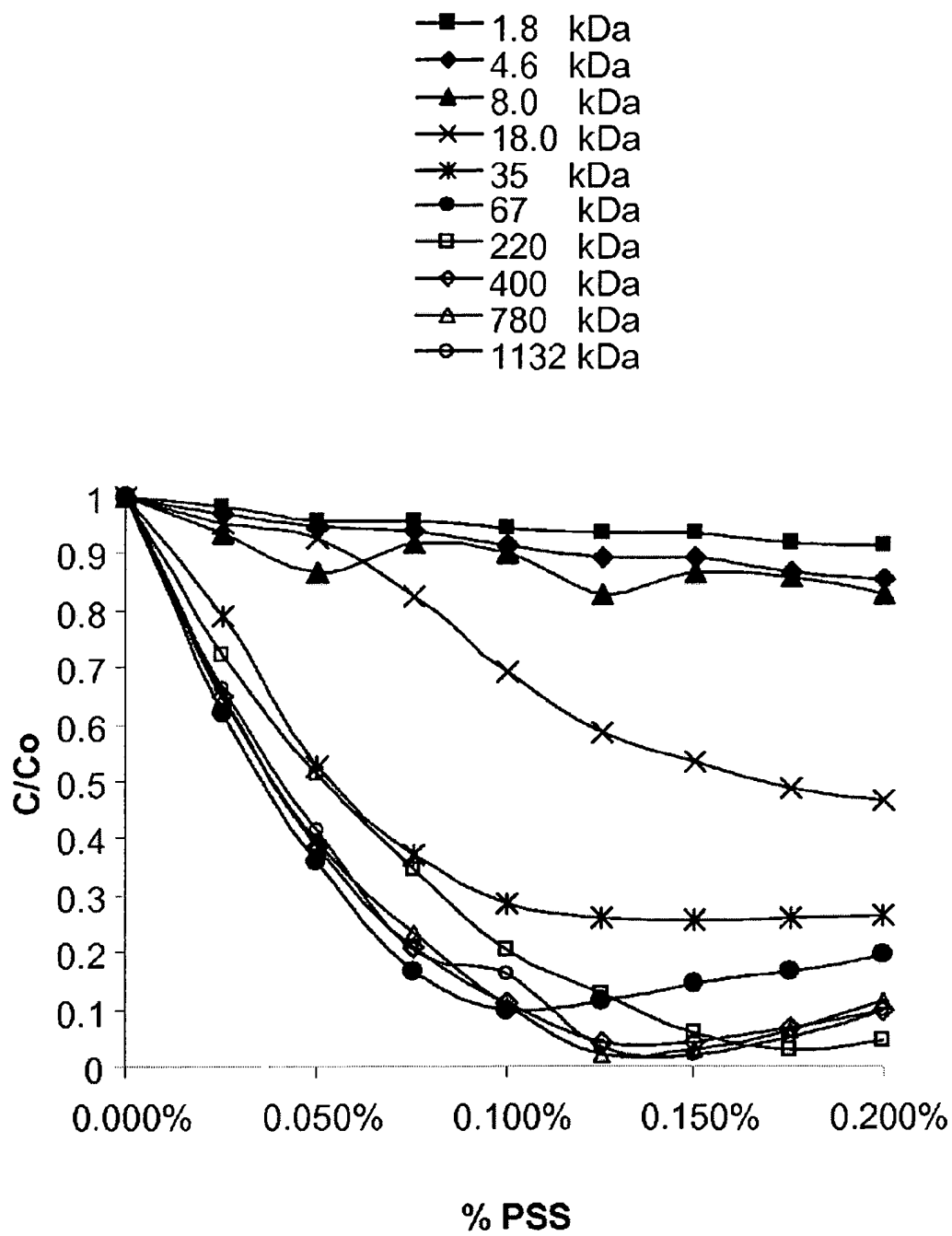
**Fig. 25**

**Fig. 26****Fig. 27**

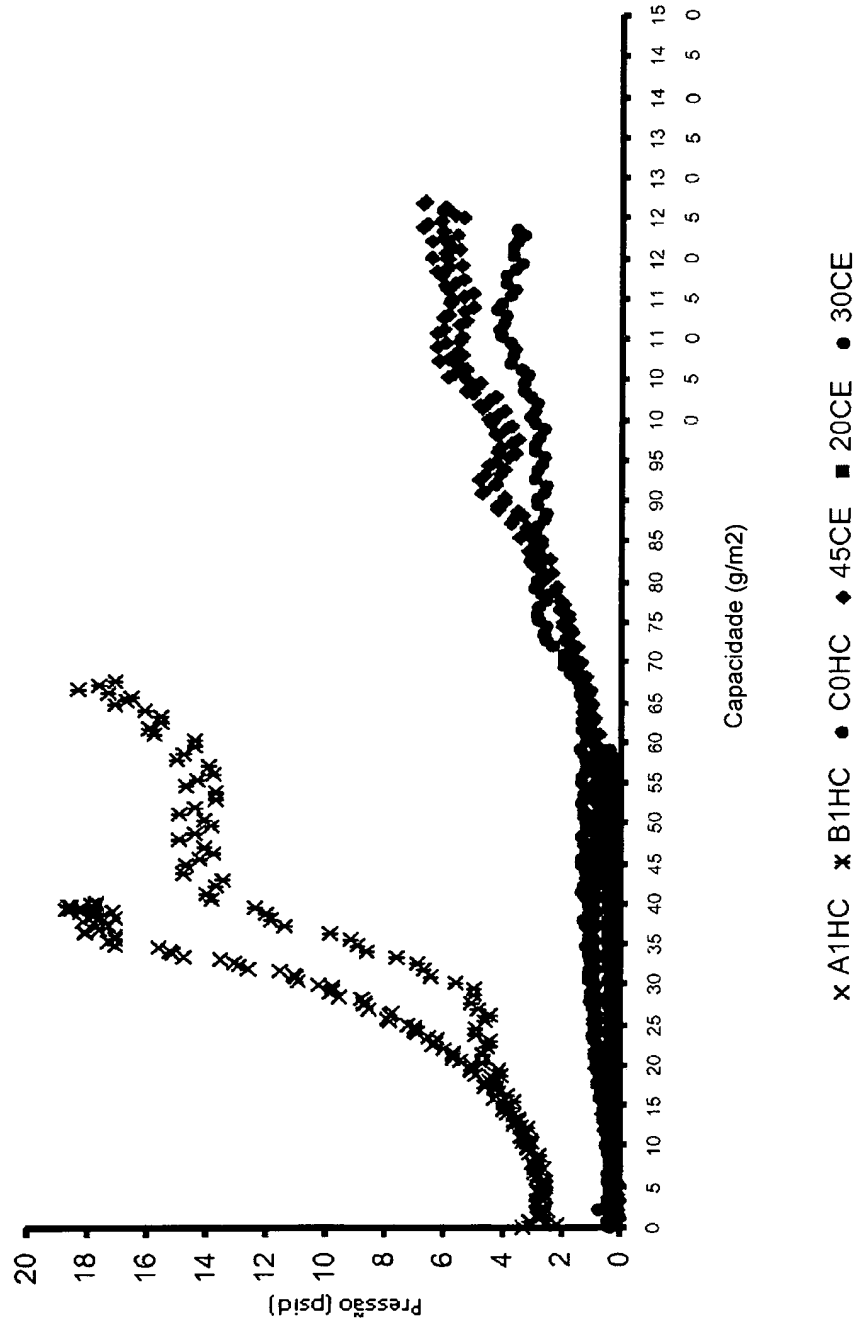
**Fig. 28**

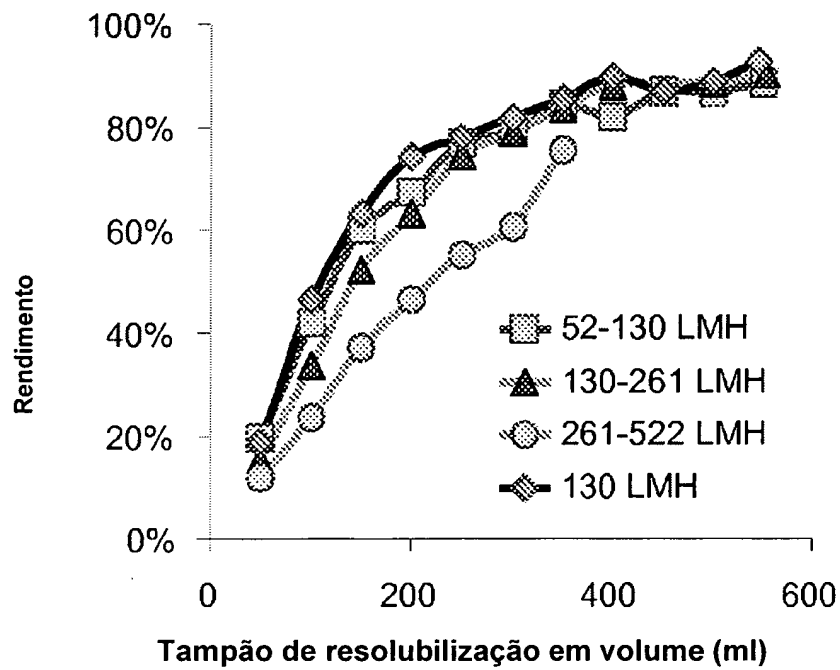
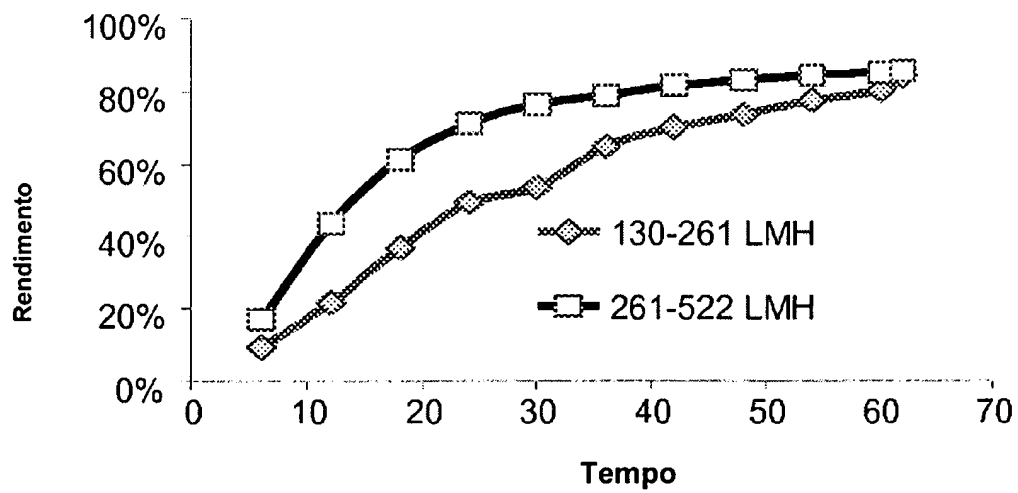
**Fig. 29****Fig. 30**

**Fig. 31****Fig. 32**

**Fig. 33**



**Fig. 34**

**Fig. 35****Fig. 36**

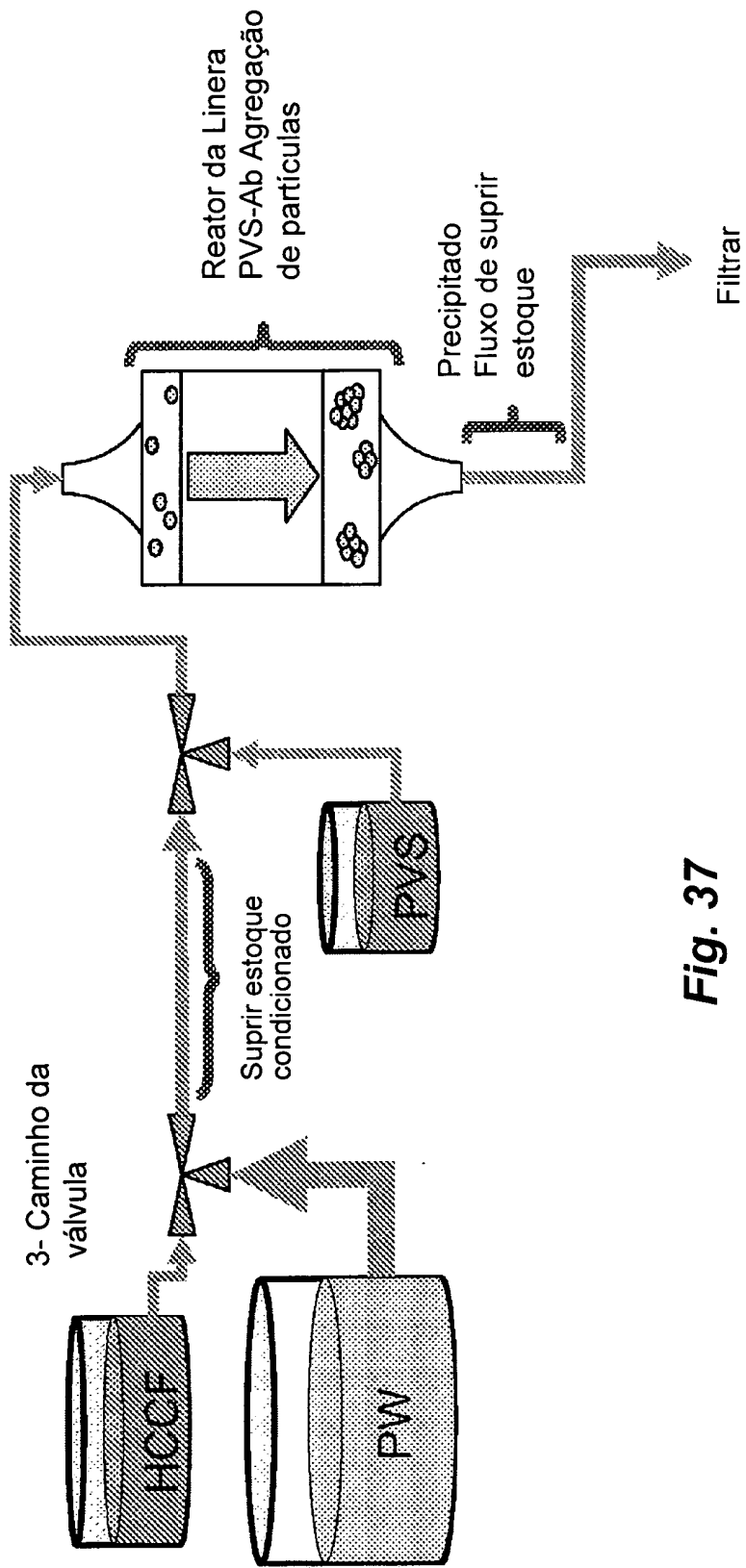
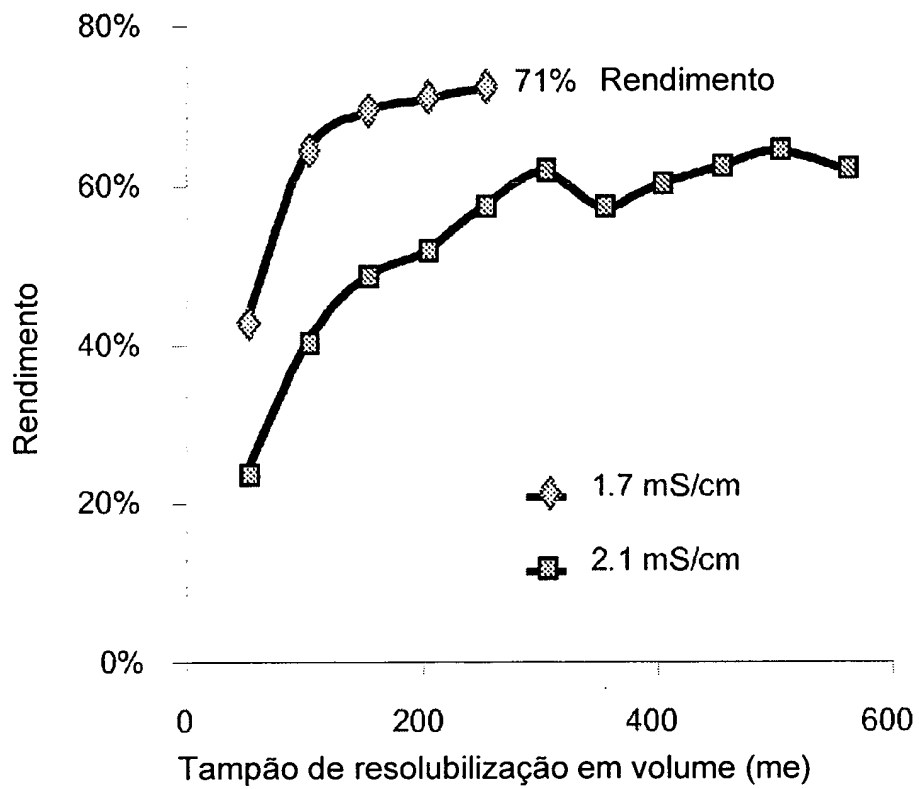


Fig. 37

**Fig. 38**

**RESUMO****"MÉTODOS DE PURIFICAÇÃO DE ANTICORPOS"**

São apresentados métodos para isolar e purificar anticorpos, adicionando um polieletrólito a um fluido de cultura celular, tal como um fluido  
5 de cultura de células coletadas, e precipitando o complexo anticorpo-polieletrólito ou um complexo de impurezas do polieletrólito