



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

(11) PI 0812603-8 B1



(22) Data do Depósito: 08/07/2008

(45) Data de Concessão: 29/06/2021

(54) Título: MÉTODO PARA PREVENIR A REDUÇÃO DE PONTES DISSULFETO

(51) Int.Cl.: C07K 1/00; C07K 14/00.

(30) Prioridade Unionista: 09/07/2007 US 60/948,677.

(73) Titular(es): GENENTECH INC..

(72) Inventor(es): YUNG-HSIANG KAO; MELODY TREXLER SCHIMIDT; MICHAEL W. LAIRD; RITA L. WONG; DANIEL P. HEWITT.

(86) Pedido PCT: PCT US2008069395 de 08/07/2008

(87) Publicação PCT: WO 2009/009523 de 15/01/2009

(85) Data do Início da Fase Nacional: 08/01/2010

(57) Resumo: MÉTODO PARA PREVENIR A REDUÇÃO DE PONTES DISSULFETO. A presente invenção refere-se a métodos e meios de prevenção da redução de pontes dissulfeto durante a produção recombinante de polipeptídeos contendo dissulfeto. Em particular, a presente invenção refere-se à prevenção da redução de pontes dissulfeto durante a coleta de polipeptídeos contendo dissulfeto, incluindo anticorpos, a partir de culturas de cultura de células hospedeiras recombinantes.

“MÉTODO PARA PREVENIR A REDUÇÃO DE PONTES DISSULFETO”**CAMPO DA INVENÇÃO**

[001] A presente invenção refere-se aos métodos e meios de prevenção da redução de pontes dissulfeto durante a produção recombinante de polipeptídeos contendo dissulfeto. Em particular, a presente invenção refere-se à prevenção da redução de pontes dissulfeto durante a coleta de polipeptídeos contendo dissulfeto, incluindo anticorpos, a partir de culturas de cultura de células hospedeiras recombinantes.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

[002] Na indústria biotecnológica, as aplicações farmacêuticas necessitam de uma variedade de proteínas produzidas pelo uso das técnicas de DNA recombinante. Geralmente, proteínas recombinantes são produzidas por cultura celular, utilizando tanto células eucarióticas, tais como células de mamíferos, quanto células procarióticas, tais como células de bactérias, modificadas através de engenharia genética para produzir a proteína de interesse, por inserção de um plasmídeo recombinante contendo o ácido nucléico que codifica a proteína desejada. Para que uma proteína se mantenha biologicamente ativa, a conformação da proteína, incluindo sua estrutura terciária, deve ser mantida durante sua purificação e isolamento, e os grupos funcionais múltiplos da proteína devem ser protegidos da degradação.

[003] As células de mamíferos tornaram-se o sistema dominante para a produção de proteínas de mamíferos para aplicações clínicas, principalmente devido a sua habilidade de produzir proteínas heterólogas reunidas e dobradas de forma apropriada, e sua capacidade de realizar modificações pós-traducionais. Células de ovário de hamster chinês (CHO), e linhagens celulares obtidas a partir de diversas outras fontes mamíferas, tais como, por exemplo, células de mieloma de rato (NS0), de rim de filhote de hamster (BHK), células embrionárias de rim humano (HEK-293) e de retina

humanas, tais como a linhagem celular PER.C6[®] isolada de uma célula de retina humana, que fornece características de glicosilação humana, e é capaz de produzir naturalmente anticorpos que reconhecem a fisiologia humana, foram aprovadas pelas agências reguladoras para a produção de produtos biofarmacêuticos.

[004] Normalmente, para o início do ciclo de produção, um número pequeno de células hospedeiras recombinantes transformadas é colocado para crescimento em cultura por diversos dias (vide, por exemplo, Figura 23). Uma vez que as células passaram por uma série de ciclos de replicação, elas são transferidas para um recipiente maior, onde elas são preparadas para sofrer fermentação. O meio no qual as células são crescidas e os níveis de oxigênio, nitrogênio e dióxido de carbono que existem durante o ciclo de produção, podem apresentar impacto significativo no processo de produção. Os parâmetros de crescimento são determinados especificamente para cada linhagem celular, e tais parâmetros são mensuradas freqüentemente para assegurar ótimas condições de crescimento e produção.

[005] Quando as células crescem a um número suficiente, elas são transferidas para tanques de produção em larga escala e cultivadas por um longo período de tempo. Neste momento do processo, a proteína recombinante pode ser coletada. Tipicamente, as células são submetidas à engenharia genética para secretar o polipeptídeo no meio de cultura celular, então a primeira etapa do processo de purificação é separar as células do meio de cultura. Tipicamente, a coleta inclui centrifugação e filtração para produzir um fluido de cultura celular coletado (HCCF). O meio é então submetido a diversas etapas de purificação adicionais, para remover qualquer resíduo celular, proteínas indesejadas, sais, minerais ou outros elementos indesejados. Ao final do processo de purificação, a proteína recombinante é altamente pura e apropriada para uso terapêutico humano.

[006] Embora este processo venha sendo objeto de muitos estudos e aprimoramentos, ao longo de diversas décadas, a produção de proteínas recombinantes ainda não é realizada sem dificuldades. Assim, por exemplo, durante a produção recombinante de polipeptídeos que compreendem pontes dissulfeto, especialmente polipeptídeos de múltiplas cadeias compreendendo pontes dissulfeto entre as cadeias, tais como anticorpos, é essencial a proteção e manutenção das pontes dissulfeto do começo ao fim do processo de produção, recuperação e purificação, a fim de produzir polipeptídeos apropriadamente dobrados e com a atividade biológica requisitada.

DESCRIÇÃO RESUMIDA DA INVENÇÃO

[007] A presente invenção refere-se, de forma geral, a um método para prevenir a redução de pontes dissulfeto em um polipeptídeo expresso em uma célula hospedeira recombinante, que compreende a suplementação do fluido da cultura coletado ou pré-coletado da célula hospedeira recombinante com um inibidor da tioredoxina ou uma proteína similar a tioredoxina.

[008] Em uma realização, o inibidor da tioredoxina é adicionado ao fluido de cultura pré-coletado.

[009] Em outra realização, o inibidor da tioredoxina é adicionado ao fluido de cultura coletado.

[010] Em uma realização adicional, o inibidor da tioredoxina é um inibidor direto de tioredoxina.

[011] Em todas as realizações, o inibidor da tioredoxina pode, por exemplo, ser um dissulfeto de alquil-2-imidazolil ou um derivado espirocetal de naftoquinona.

[012] Em uma realização adicional, o inibidor da tioredoxina é um inibidor específico da tioredoxina redutase.

[013] Em ainda outra realização adicional, o inibidor da tioredoxina

é um complexo de ouro, onde o complexo de ouro pode, por exemplo, ser aurotioglicose (ATG) ou aurotiomalato (ATM). Enquanto a concentração inibitória eficaz pode variar, ela está tipicamente entre cerca de 0,1 mM e 1 mM. De forma similar, a concentração inibitória eficaz mínima varia de acordo com a natureza do polipeptídeo e circunstâncias gerais, e é tipicamente alcançada quando a concentração de ATG ou ATG é pelo menos cerca de quatro vezes a concentração da tioredoxina no fluido de cultura coletado ou pré-coletado.

[014] Em outra realização deste aspecto da invenção, o inibidor da tioredoxina é um íon metálico, onde o íon metálico, sem limitação, pode ser selecionado do grupo consistindo de Hg^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} , e Mn^{2+} . Quando o íon metálico é adicionado na forma de sulfato cúprico, a concentração de inibidor eficaz geralmente está entre cerca de 5 μM e cerca de 100 μM , ou entre cerca de 10 μM e cerca de 80 μM , ou entre cerca de 15 μM e cerca de 50 μM . A concentração inibitória mínima de sulfato cúprico também varia, mas tipicamente é alcançada quando sulfato cúprico é adicionado a uma concentração de pelo menos cerca de duas vezes a concentração da tioredoxina no fluido de cultura coletado ou pré-coletado.

[015] Em uma realização diferente, o inibidor da tioredoxina é um agente oxidante, ou seja, um inibidor de G6PD, tal como, por exemplo, piridoxal 5'-fosfato, 1 fluoro-2,4 dinitrobenzeno, dehidroepiandrosterona (DHEA) ou epiandrosterona (EA); cistina ou cisteína. Concentrações inibitórias eficazes típicas de DHEA estão entre cerca de 0,05 mM e cerca de 5 mM, ou entre cerca de 0,1 mM e cerca de 2,5 mM.

[016] Em uma realização adicional, o inibidor da tioredoxina é um inibidor da atividade hexoquinase, incluindo, sem limitação, quelantes de íons metálicos, tais como, por exemplo, ácido etilenodiamina tetraacético (EDTA). EDTA é tipicamente adicionado e eficaz a uma concentração entre cerca de 5 mM e cerca de 60 mM, ou entre cerca de 10 mM e cerca de 50 mM, ou entre

cerca de 20 mM e cerca de 40 mM.

[017] Em outras realizações preferidas, o inibidor da atividade de hexoquinase é selecionado a partir do grupo consistindo de sorbose-1-fosfato, polifosfatos, 6-desóxi-6-fluoro glicose, 2-C-hidroxi-metilglicose, xilose, e lixose.

[018] Outros inibidores incluem cistina, cisteína, e glutatona oxidada que são tipicamente adicionados a uma concentração de pelo menos cerca de 40 vezes a concentração do polipeptídeo em questão no fluido de cultura coletado ou pré-coletado.

[019] Em ainda uma realização adicional, o inibidor da tioredoxina é um siRNA, um nucleotídeo *antisense*, ou um anticorpo que se liga especificamente a uma tioredoxina redutase.

[020] Em outra realização, o inibidor da tioredoxina é uma medida que resulta indiretamente na inibição da atividade da tioredoxina. Esta realização inclui, por exemplo, a difusão de ar no fluido de cultura coletado da célula hospedeira recombinante, e/ou redução do pH do fluido de cultura coletado da célula hospedeira recombinante.

[021] Em várias realizações, meios indiretos de inibir a atividade de tioredoxina, tal como difusão de ar e/ou redução do pH, podem ser combinados com o uso de inibidores diretos de tioredoxina, tais como aqueles listados acima.

[022] Em todas as realizações, o polipeptídeo pode, por exemplo, ser um anticorpo, ou um fragmento de anticorpo biologicamente funcional. Fragmentos de anticorpos representativos incluem Fab, Fab', F(ab')₂, scFv, (scFv)₂, dAb, fragmentos de região determinante de complementaridade (CDR), anticorpos lineares, moléculas de anticorpos de cadeia simples, minicorpos, diacorpos, e anticorpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticorpos.

[023] Anticorpos terapêuticos incluem, sem limitação, anticorpos

anti-HER2, anticorpos anti-CD20; anticorpos anti-IL-8; anticorpos anti-VEGF; anticorpos anti-CD40, anticorpos anti-CD11a; anticorpos anti-CD18; anticorpos anti-IgE; anticorpos anti-receptor Apo-2; anticorpos anti-fator tissular (TF); anticorpos anti-integrina $\alpha_4\beta_7$ humana; anticorpos anti-EGFR; anticorpos anti-CD3; anticorpos anti-CD25; anticorpos anti-CD4; anticorpos anti-CD52; anticorpos anti-receptor Fc; anticorpos anti-antígeno carcinoembrionário (CEA); anticorpos direcionados contra células mamárias epiteliais; anticorpos que se ligam a células de carcinoma de cólon; anticorpos anti-CD38; anticorpos anti-CD33; anticorpos anti-CD22; anticorpos anti-EpCAM; anticorpos anti-GpIIb/IIIa; anticorpos anti-RSV; anticorpos anti-CMV; anticorpos anti-HIV; anticorpos anti-hepatite; anticorpos anti-CA 125; anticorpos anti- $\alpha v\beta 3$; anticorpos anti-carcinoma de células renais humanas; anticorpos anti- 17-1A humano; anticorpos anti-tumor coloretal humano; anticorpo anti-melanoma humano R24 direcionado contra gangliosídeo GD3; anti-carcinoma de célula escamosa humana; e anticorpos anti-antígeno de leucócito humano (HLA), e anticorpos anti-HLA DR.

[024] Em outras realizações, o anticorpo terapêutico é um anticorpo de ligação a um receptor HER, VEGF, IgE, CD20, CD11a, CD40, ou DR5.

[025] Em uma realização adicional, o receptor HER é HER1 e/ou HER2, preferencialmente HER2. O anticorpo HER2 pode, por exemplo, compreender uma sequência de domínio variável de cadeia pesada e/ou leve selecionada do grupo consistindo das SEQ ID NOS: 16, 17, 18, e 19.

[026] Em outra realização, o anticorpo terapêutico é um anticorpo que se liga a CD20. O anticorpo anti-CD20 pode, por exemplo, compreender uma sequência de domínio variável de cadeia leve e/ou pesada selecionada a partir do grupo que consiste de SEQ ID NOS: 1 a 15.

[027] Em ainda outra realização, o anticorpo terapêutico é um anticorpo que se liga a VEGF. O anticorpo anti-VEGF pode, por exemplo,

compreender uma sequência de domínio variável de cadeia leve e/ou pesada selecionada a partir do grupo que consiste as SEQ ID NOS: 20 a 25.

[028] Em uma realização adicional, o anticorpo terapêutico é um anticorpo que liga CD11a. O anticorpo anti-CD11a pode, por exemplo, compreender uma sequência de domínio variável de cadeia leve e/ou pesada selecionada a partir do grupo que consiste de SEQ ID NOS: 26 a 29.

[029] Em uma realização adicional, o anticorpo terapêutico se liga a um receptor DR5. O anticorpo anti-DR5 pode, por exemplo, ser selecionado a partir do grupo que consiste de Apomabs 1.1, 2.1, 3.1, 4.1, 5.1, 5.2, 5.3, 6.1, 6.2, 6.3, 7.1, 7.2, 7.3, 8.1, 8.3, 9.1, 1.2, 2.2, 3.2, 4.2, 5.2, 6.2, 7.2, 8.2, 9.2, 1.3, 2.2, 3.3, 4.3, 5.3, 6.3, 7.3, 8.3, 9.3, e 25.3, e preferencialmente é Apomab 8.3 ou Apomab 7.3, e mais preferencialmente Apomab 7.3.

[030] Em outras realizações do método da presente invenção, o polipeptídeo expresso na célula hospedeira recombinante é um polipeptídeo terapêutico. Por exemplo, o polipeptídeo terapêutico pode ser selecionado a partir do grupo consistindo de um hormônio do crescimento, incluindo hormônio do crescimento humano e hormônio do crescimento bovino; fator de liberação do hormônio do crescimento; hormônio da paratireóide; hormônio estimulante da tireóide; lipoproteínas; alfa-1-antitripsina; cadeia A de insulina; cadeia B de insulina; proinsulina; hormônio folículo estimulante; calcitonina; hormônio luteinizante; glucagon; fatores de coagulação, tais como fator VIIIc, fator IX, fator tissular, e fator de von Willebrand; fatores anti-coagulação, tais como Proteína C; fator natriurético atrial; surfactante pulmonar; um ativador de plasminogênio, tal como uroquinase ou urina humana ou ativador de plasminogênio do tipo tissular (t-PA); bombesina; trombina; fator de crescimento hematopoiético; fator alfa e beta de necrose tumoral; encefalinase; RANTES (regulado na ativação normalmente expressada e secretada por células T); proteína inflamatória de macrófago humano (MIP-1-alfa); uma albumina de soro, tais como albumina de

soro humano; substância inibidora de Muellieriana; cadeia A de relaxina; cadeia B de relaxina; prorelaxina; peptídeo associado à gonadotropina de rato; uma proteína microbiana, tal como beta-lactamase; DNase; IgE; um antígeno associado a linfócito T citotóxico (CTLA), tal como CTLA-4; inibina; activina; fator de crescimento endotelial vascular (VEGF); receptores para hormônios ou fatores de crescimento; Proteína A ou D; fatores reumatóides; um fator neurotrófico tal como fator neurotrófico derivado de osso (BDNF), neurotrofina-3, -4, -5, ou -6 (NT-3, NT-4, NT-5, ou NT-6), ou um fator de crescimento de nervo, tal como NGF- β ; fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF); fator de crescimento de fibroblastos, tal como aFGF e bFGF; fator de crescimento epidérmico (EGF); fator de transformação de crescimento (TGF) tal como TGF-alfa e TGF-beta, incluindo TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, TGF- β 4, ou TGF- β 5; fator de crescimento semelhante à insulina tipo I e II (IGF-I e IGF-II); des(1-3)-IGF-I (IGF-I do cérebro), fator de crescimento semelhante à insulina que se liga a proteínas; proteínas CD, tal como CD3, CD4, CD8, CD19, CD20, CD34, e CD40; eritropoietina; fatores osteoindutivos; imunotoxinas; uma proteína morfogenética do osso (BMP); um interferon tal como interferon-alfa, -beta, e -gama; fatores estimulantes de colônia (CSFs), ou seja, M-CSF, GM-CSF, e G-CSF; interleucinas (ILs), tal como IL-1 a IL-10; superóxido dismutase; receptores de células T; proteínas de superfície de membrana; fatores de aceleração do decaimento; antígenos virais, tais como, por exemplo, uma porção de envelope do vírus da AIDS; proteínas de transporte; receptores de *homing*; adressinas; proteínas reguladoras; integrinas, tais como CD11a, CD11b, CD11c, CD18, uma ICAM, VLA-4 e VCAM; um antígeno associado a tumor, tal como receptores HER2, HER3 ou HER4; e fragmentos de tais polipeptídeos.

[031] Em todas as realizações, a célula hospedeira recombinante pode ser uma célula hospedeira eucariótica, tal como uma célula hospedeira de mamífero, incluindo, por exemplo, células de ovário de hamster chinês (CHO).

[032] Em todas as realizações, a célula hospedeira recombinante pode também ser uma célula hospedeira procariótica, tal como célula bacteriana incluindo, sem limitação, células de *E. coli*.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

[033] Figura 1. Experimento de diálise: Imagem digital similar a gel obtida a partir de análise pelo Bioanalisador (cada faixa representando um ponto de tempo) demonstrando que ocrelizumab (rhuMAb 2H7 – Variante A) dentro da bolsa de diálise permaneceu intacto durante o período de incubação.

[034] Figura 2. Experimento de diálise: Imagem digital similar a gel obtida a partir de análise pelo Bioanalisador (cada faixa representando um ponto de tempo) demonstrando que ocrelizumab (rhuMAb 2H7 – Variante A) fora da bolsa de diálise foi reduzido durante o período de incubação. Este fato é evidenciado pela perda do anticorpo intacto (~ 150 kDa) e a formação de fragmentos de anticorpo ilustrada na figura. Ao período de tempo de 48 horas (faixa 7), o anticorpo reduzido pareceu ser re-oxidado, provavelmente como um resultado da perda da atividade de redução no fluido de cultura celular coletado (HCCF). A banda aparente logo após o marcador de 28 kDa surgiu a partir da cadeia leve do anticorpo. Havia uma quantidade significativa de cadeia leve livre já presente no HCCF antes do início da incubação. A presença de excesso de cadeia leve livre e dímeros de cadeia leve no HCCF é típico para a linhagem celular que produz ocrelizumab.

[035] Figura 3. Níveis de tiol livre do experimento de diálise: ocrelizumab purificado em solução salina tamponada com fosfato (PBS) estava dentro da bolsa de diálise e HCCF contendo ocrelizumab estava fora da bolsa de diálise. Os tióis livres dentro (caixas) e fora (diamantes) da bolsa de diálise alcançaram níveis comparáveis dentro de poucas horas, indicando uma boa troca de componentes de molécula pequena no HCCF entre interior e exterior da bolsa de diálise.

[036] Figura 4. Sistema da tioredoxina e outras reações envolvidas na redução de anticorpo: O sistema de tioredoxina, que compreenda tioredoxina (Trx), tioredoxina redutase (TrxR) e NADPH, funções como um sistema doador de hidrogênio para redução das pontes dissulfeto nas proteínas. Trx é uma proteína monomérica pequena com uma unidade de sítio ativa CXXC que catalisa muitas reações redox através da troca de tiol-dissulfeto. O Trx oxidado pode ser reduzido por NADPH via TrxR. O Trx reduzido é então capaz de catalisar a redução de dissulfetos em proteínas. O NADPH necessário para o sistema da tioredoxina é fornecido por reações na via fosfato pentose e glicólise.

[037] Figura 5. Atividade *in vitro* do sistema de tioredoxina: Imagem digital similar a gel a partir de análise por Bioanalisador (cada faixa representando um ponto de tempo) demonstrando que a incubação de ocrelizumab intacto (1 mg/mL) com 0,1 mM TrxR (fígado de camundongo), 5 mM Trx (humano), e 1 mM NADPH em PBS resultou na redução completa de ocrelizumab; o ocrelizumab foi completamente reduzido em menos de 21 horas.

[038] Figura 6. Atividade *in vitro* do sistema da tioredoxina inibido por aurotioglicose: A adição de aurotioglicose (ATG) a mesma mistura de reação descrita para a figura 5, acima, inibiu de forma eficaz a redução de ocrelizumab. Este fato é observado pela imagem digital similar a gel obtida a partir da análise utilizando o Bioanalisador (cada faixa representando um ponto de tempo).

[039] Figura 7. Atividade *in vitro* do sistema da tioredoxina inibido por aurotiomalato: A adição de aurotiomalato (ATM) a uma concentração de 1 mM a mesma mistura de reação descrita para a figura 5, acima, inibiu de forma eficaz a redução de ocrelizumab. Este fato é observado pela imagem digital similar a gel obtida a partir da análise utilizando o Bioanalisador (cada faixa representando um ponto de tempo).

[040] Figura 8. Atividade *in vitro* do sistema de tioredoxina: Imagem digital similar a gel obtida a partir de análise pelo Bioanalisador (cada

faixa representando um ponto de tempo) ilustrando que a incubação de ocrelizumab intacto (1 mg/mL) com 0,1 mM TrxR (fígado de camundongo), 5 mM Trx (humano), e 1 mM NADPH em 10 mM de tampão sulfato de histidina resultou na redução de ocrelizumab em menos de 1 hora.

[041] Figura 9. Atividade *in vitro* do sistema da tioredoxina inibido por CuSO₄: A adição de CuSO₄ a uma concentração de 50 μ M a mesma mistura de reação conforme descrita para a figura 8 inibiu de forma eficaz a redução de ocrelizumab, tal como ilustrado na imagem digital similar a gel obtida a partir de análise pelo Bioanalisador (cada faixa representando um ponto de tempo).

[042] Figura 10. Redução de ocrelizumab: Imagem digital similar a gel obtida a partir da análise utilizando o Bioanalisador (cada faixa representando um ponto de tempo) ilustrando que ocrelizumab foi reduzido no experimento de incubação utilizando HCCF a partir de um CCF homogeneizado gerado a partir de um fermentador 3-L.

[043] Figura 11. Inibição da redução de ocrelizumab no HCCF por aurotioglicose: Imagem digital similar a gel obtida a partir de análise pelo Bioanalisador (cada faixa representando um ponto de tempo) mostrando que a adição de 1 mM de aurotioglicose ao mesmo HCCF utilizado para o experimento de incubação ilustrado na figura 10 inibiu a redução de ocrelizumab.

[044] Figura 12. Inibição da redução de ocrelizumab no HCCF por aurotiomalato: Imagem digital similar a gel obtida a partir de análise pelo Bioanalisador (cada faixa representando um ponto de tempo) indicando que a adição de 1 mM de aurotiomalato ao mesmo HCCF utilizado para o experimento de incubação ilustrado na figura 10 inibiu a redução de ocrelizumab.

[045] Figura 13. Perda da atividade de redução no HCCF: O HCCF de uma das corridas de produção de larga escala para ocrelizumab (a corrida "beta") que foi submetido a diversos ciclos de congelamento/descongelamento demonstrou nenhuma redução de ocrelizumab quando utilizado em um

experimento de incubação. Este fato foi demonstrado pela análise pelo Bioanalisador (cada faixa representando um ponto de tempo), e pode ser contrastado a redução de anticorpo observada anteriormente em HCCF de degelo fresco a partir da mesma batelada de fermentação.

[046] Figura 14. A perda da atividade de redução no HCCF restaurado por adição de NADPH: A redução de ocrelizumab foi observada novamente no ensaio por Bioanalisador (cada faixa representando um ponto de tempo) após a adição de NADPH a uma concentração de 5 mM no HCCF, onde a atividade de redução foi eliminada sob as condições descritas acima para a Figura 13.

[047] Figura 15. A perda da atividade de redução no HCCF restaurado por adição de Glicose-6-fosfato: A redução de ocrelizumab foi novamente observada no ensaio por Bioanalisador (cada faixa representando um ponto de tempo) após a adição de G6P a uma concentração de 10 mM no HCCF, onde a atividade redutora foi eliminada devido ao tratamento descrito acima para a Figura 13.

[048] Figura 16. Redução de ocrelizumab: Uma imagem digital similar a gel obtida a partir de análise pelo Bioanalisador, mostrando que ocrelizumab foi reduzida em um experimento de incubação utilizando um HCCF a partir de 12 kL da corrida 9 de uma corrida de fabricação de larga escala (a corrida "alfa").

[049] Figura 17. EDTA inibe a redução de ocrelizumab: imagem digital similar a gel obtida a partir de análise pelo Bioanalisador (cada faixa representando um ponto de tempo) mostrando que a redução de ocrelizumab foi inibida em um experimento de incubação utilizando um HCCF da corrida a partir de 12 kL da corrida 9 com EDTA adicionado a uma concentração de 20 mM ao HCCF cuja atividade redutora é demonstrada na Figura 16.

[050] Figura 18. A perda da atividade redutora no HCCF da

“corrida beta” restaurado por adição de Glicose-6-fosfato, mas nenhuma inibição de redução por EDTA: A redução de ocrelizumab foi observada no ensaio com Bioanalisador (cada faixa representando um ponto de tempo) após a adição de G6P a uma concentração de 5 mM e 20 mM de EDTA no HCCF, cuja atividade redutora foi perdida (vide figura 13). Em contraste com os resultados apresentados na figura 17, a presença de EDTA não bloqueou a redução de ocrelizumab.

[051] Figura 19. Inibição da redução de ocrelizumab: por (i) adição de EDTA, (ii) adição de CuSO_4 , ou (iii) ajuste do pH a 5,5. Todos os três diferentes métodos, (1) adição de EDTA, (2) adição de CuSO_4 , e (3) ajuste do pH a 5,5, utilizados de forma independente, foram eficazes na inibição da redução de ocrelizumab. Este fato é demonstrado pelos resultados quantitativos do Bioanalisador ilustrados, que demonstraram que quase 100% de anticorpos intactos (150 kDa) permaneceram nos conjuntos de eluição (*pools*) de proteína A. Em contraste, ocrelizumab foi completamente reduzido no HCCF controle após 20 horas de tempo de permanência de HCCF.

[052] Figura 20. Inibição da redução de ocrelizumab por difusão de ar: A difusão de ar no HCCF foi eficaz na inibição da redução de pontes dissulfeto de ocrelizumab. Este fato foi demonstrado pelos resultados quantitativos do Bioanalisador que demonstraram que quase 100% de anticorpos intactos (150 kDa) permaneceram nos conjuntos de eluição de proteína A. Em contraste, ocrelizumab foi quase completamente reduzido no HCCF controle após 5 horas de difusão com nitrogênio.

[053] Figura 21 mostra a sequência de aminoácidos V_L (SEQ ID NO. 24) de um anticorpo anti-Her2 (Trastuzumab).

[054] Figura 22 mostra a sequência de aminoácidos V_H (SEQ ID No. 25) de um anticorpo anti-Her2 (Trastuzumab).

[055] Figura 23 é um representativo esquemático que mostra

algumas etapas de um processo típico de produção em larga escala.

[056] Figura 24 é uma imagem digital similar a gel obtida a partir da análise utilizando o Bioanalisador: 2H7 (Variante A) + 1 mM NADPH + 5 μ M tioredoxina + 0,1 μ M tioredoxina redutase (recombinante) em 10 mM sulfato de histidina.

[057] Figura 25 é uma imagem digital similar a gel obtida a partir de análise pelo Bioanalisador: 2H7 (Variante A) + 1 mM NADPH + 5 μ M tioredoxina + 0,1 μ M tioredoxina redutase (recombinante) em 1 mM de sulfato de histidina + 1 mM ATG.

[058] Figura 26 é uma imagem digital similar a gel obtida a partir de uma análise pelo Bioanalisador: 2H7(Variante A) + 1 mM NADPH + 5 μ M tioredoxina + 0,1 μ M tioredoxina redutase (recombinante) em 10 mM de sulfato de histidina + 0,6 μ M ATG (6:1 ATG: TrxR).

[059] Figura 27 é uma imagem digital similar a gel obtida a partir de análise pelo Bioanalisador: 2H7 (Variante A) + 1 mM NADPH + 5 μ M tioredoxina + 0,1 μ M tioredoxina redutase (recombinante) em 10 mM de sulfato de histidina + 0,4 μ M ATG (4:1 ATG: TrxR).

[060] Figura 28 é uma imagem digital similar a gel obtida a partir de análise pelo Bioanalisador: 2H7 (Variante A)+ 1 mM NADPH + 5 μ M tioredoxina + 0,1 μ M tioredoxina redutase (recombinante) em 10 mM de sulfato de histidina + 0,2 μ M ATG (2:1 ATG: TrxR).

[061] Figura 29 é uma imagem digital similar a gel obtida a partir da análise utilizando o Bioanalisador: 2H7 (Variante A) + 1 mM NADPH + 5 μ M tioredoxina + 0,1 μ M tioredoxina redutase (recombinante) em 10 mM de sulfato de histidina + 0,1 mM aurotiomalato (ATM).

[062] Figura 30 é uma imagem digital similar a gel obtida a partir da análise utilizando o Bioanalisador: 2H7 (Variante A) + 1 mM NADPH + 5 μ M tioredoxina + 0,1 μ M tioredoxina redutase (recombinante) em 10 mM de sulfato

de histidina + 0,01 mM aurotiomalato (ATM).

[063] Figura 31 é uma imagem digital similar a gel obtida a partir da análise utilizando o Bioanalisador: 2H7 (Variante A) + 1 mM NADPH + 5 μ M tioredoxina + 0,1 μ M tioredoxina redutase (recombinante) em 10 mM de sulfato de histidina + 20 μ M CuSO₄ (4:1 Cu²⁺: Trx).

[064] Figura 32 é uma imagem digital similar a gel obtida a partir da análise utilizando o Bioanalisador: 2H7 (Variante A) + 1 mM NADPH + 5 μ M tioredoxina + 0,1 μ M tioredoxina redutase (recombinante) em 10 mM de sulfato de histidina + 10 μ M CuSO₄ (2:1 Cu²⁺: Trx).

[065] Figura 33 é uma imagem digital similar a gel obtida a partir da análise utilizando o Bioanalisador: 2H7 (Variante A) + 1 mM NADPH + 5 μ M tioredoxina + 0,1 μ M tioredoxina redutase (recombinante) em 10 mM de sulfato de histidina + 5 μ M CuSO₄ (1:1 Cu²⁺: Trx).

[066] Figura 34 é uma imagem digital similar a gel obtida a partir da análise utilizando o Bioanalisador: 2H7 (Variante A) + 1 mM NADPH + 5 μ M tioredoxina + 0,1 μ M tioredoxina redutase (recombinante) em 10 mM de sulfato de histidina + 532 μ M cistamina (20:1 cistamina: 2H7 dissulfeto).

[067] Figura 35 é uma imagem digital similar a gel obtida a partir da análise utilizando o Bioanalisador: 2H7 (Variante A) + 1 mM NADPH + 5 μ M tioredoxina + 0,1 μ M tioredoxina redutase (recombinante) em 10 mM de sulfato de histidina + 266 μ M cistamina (10:1 cistamina: 2H7 dissulfeto).

[068] Figura 36 é uma imagem digital similar a gel obtida a partir da análise utilizando o Bioanalisador: 2H7 (Variante A) + 1 mM NADPH + 5 μ M tioredoxina + 0,1 μ M tioredoxina redutase (recombinante) em 10 mM de sulfato de histidina + 133 μ M cistamina (5:1 cistamina: 2H7 dissulfeto).

[069] Figura 37 é uma imagem digital similar a gel obtida a partir da análise utilizando o Bioanalisador: 2H7 (Variante A) + 1 mM NADPH + 5 μ M tioredoxina + 0,1 μ M tioredoxina redutase (recombinante) em 10 mM de sulfato

de histidina + 26,6 μ M cistamina (1:1 cistamina: 2H7 dissulfeto).

[070] Figura 38 é uma imagem digital similar a gel obtida a partir da análise utilizando o Bioanalisador: 2H7 (Variante A) + 1 mM NADPH + 5 μ M tioredoxina + 0,1 μ M tioredoxina redutase (recombinante) em 10 mM de sulfato de histidina (pH=7,6) + 2,6 mM cistina.

[071] Figura 39 é uma imagem digital similar a gel obtida a partir da análise utilizando o Bioanalisador: 2H7 (Variante A) + 1 mM NADPH + 5 μ M tioredoxina + 0,1 μ M tioredoxina redutase (recombinante) em 10 mM de sulfato de histidina + 2,6 mM GSSG (glutathiona oxidada).

[072] Figura 40. Sistema de redução enzimática reconstruído: 1 mg/ml 2H7 (Variante A) + 10 μ g/mL hexoquinase, 50 μ g/mL glicose-6-fosfato desidrogenase, 5 μ M tioredoxina, 0,1 μ M tioredoxina redutase, 2 mM glicose, 0,6 mM ATP, 2 mM Mg^{2+} , e 2 mM NADP em 50 mM de tampão sulfato de histidina a pH=7,38.

[073] Figura 41. O sistema da tioredoxina requer NADPH. 1 mg/ml 2H7 (Variante A) + 5 μ M tioredoxina, 0,1 μ M tioredoxina redutase, e 2 mM NADP em 50 mM de tampão sulfato de histidina a pH=7,38.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

I. DEFINIÇÕES

[074] De acordo com a presente invenção, no contexto de proteínas, incluindo anticorpos, em geral, ou com relação a qualquer proteína ou anticorpo específico, o termo “redução” é utilizado para referir-se a redução de uma ou mais pontes dissulfeto da proteína ou anticorpo. Assim, por exemplo, os termos “redução de orelizumab” é utilizado de forma intercambiável com o termo “redução de pontes dissulfeto de orelizumab” e o termo “redução de anticorpo (Ab)” é utilizado de forma intercambiável com o termo “redução de pontes dissulfeto de anticorpo (Ab).”

[075] Os termos “redução” ou “redução de pontes dissulfeto” são

utilizados no sentido mais amplo, e incluem redução completa e parcial e redução de algumas ou todas as pontes dissulfeto, intercadeia ou intracadeia, presentes em uma proteína tal como um anticorpo.

[076] Por “proteína” entende-se uma sequência de aminoácidos na qual o comprimento da cadeia é suficiente para produzir níveis elevados de estrutura terciária e/ou quaternária. Isto é para distinguir dos “peptídeos” ou outras drogas de peso molecular pequeno que não possuem tal estrutura. Tipicamente, a proteína da presente invenção apresentará um peso molecular de pelo menos cerca de 15-20 kD, preferencialmente, pelo menos cerca de 20 kD. Exemplos de proteínas englobadas dentro da definição da presente invenção incluem todas as proteínas de mamíferos, em particular, proteínas terapêuticas ou de diagnóstico, tais como anticorpos terapêuticos ou de diagnóstico, e, em geral, proteínas que contém uma ou mais pontes dissulfeto, incluindo polipeptídeos de múltiplas cadeias compreendendo uma ou mais pontes dissulfeto inter- e/ou intracadeia.

[077] O termo “proteína terapêutica” ou “polipeptídeo terapêutico” refere-se a uma proteína que é utilizada no tratamento de doenças, independente de sua indicação ou mecanismo de ação. Para que proteínas terapêuticas sejam clinicamente úteis, elas devem ser produzidas em grandes quantidades. Produção de “escala de fabricação” de proteínas terapêuticas, ou outras proteínas, utiliza culturas de células que variam de cerca de 400L a cerca de 80.000 L, dependendo da proteína a ser produzida e a necessidade. Tipicamente, tal produção de escala de fabricação utiliza cultura celular de tamanho que varia de cerca de 400 L a cerca de 25.000 L. Dentro desta faixa, são utilizados tamanhos específicos de cultura celular, tais como, 4.000 L, cerca de 6.000 L, cerca de 8.000, cerca de 10.000, cerca de 12.000 L, cerca de 14.000 L, ou cerca de 16.000 L.

[078] O termo “anticorpo terapêutico” refere-se a um anticorpo que

é utilizado no tratamento de doenças. Um anticorpo terapêutico pode possuir diversos mecanismos de ação. Um anticorpo terapêutico pode ligar e neutralizar a função normal de um alvo associado com um antígeno. Por exemplo, um anticorpo monoclonal que bloqueia a atividade de uma proteína necessária para a sobrevivência de uma célula cancerígena, causa a morte da célula. Outros anticorpos monoclonais terapêuticos podem se ligar e ativar a função normal de um alvo associado com um antígeno. Por exemplo, um anticorpo monoclonal pode se ligar a uma proteína em uma célula e gerar um sinal de apoptose. Ainda outro anticorpo monoclonal pode se ligar a um antígeno alvo expresso apenas no tecido doente; a conjugação de uma carga tóxica (agente eficaz), tal como um agente quimioterápico ou radioativo, ao anticorpo monoclonal pode criar um agente para liberação específica da carga tóxica ao tecido doente, reduzindo os danos ao tecido saudável. Um “fragmento biologicamente funcional” de um anticorpo terapêutico exibirá pelo menos uma, se não algumas ou todas, das funções biológicas atribuídas ao anticorpo intacto, em que a função compreende pelo menos uma ligação específica ao antígeno alvo.

[079] O termo “proteína de diagnóstico” refere-se a uma proteína que é utilizada no diagnóstico de uma doença.

[080] O termo “anticorpo de diagnóstico” refere-se a um anticorpo que é utilizado como um reagente diagnóstico para uma doença. O anticorpo de diagnóstico pode ser ligar a um antígeno alvo que é especificamente associado com, ou exibe expressão aumentada em, uma doença particular. O anticorpo de diagnóstico pode ser utilizado, por exemplo, para detectar um alvo em uma amostra biológica de um paciente, ou em imagem diagnóstica de locais doentes, tal como tumores, em um paciente. Um “fragmento biologicamente funcional” de um anticorpo de diagnóstico exibirá pelo menos uma, se não algumas ou todas, das funções biológicas atribuídas ao anticorpo intacto, em que a função compreende pelo menos a ligação específica a um antígeno alvo.

[081] “Purificado” significa que uma molécula está presente em uma amostra a uma concentração de pelo menos 80-90% em peso da amostra na qual está contida.

[082] A proteína, incluindo anticorpos, que é purificada é preferencialmente essencialmente pura e, de forma desejável, essencialmente homogênea (ou seja, livre de proteínas contaminantes, etc.).

[083] Uma proteína “essencialmente pura” indica uma composição de proteína que compreende pelo menos cerca de 90% em peso da proteína, com base no peso total da composição, de preferência, pelo menos cerca de 95% em peso.

[084] Uma proteína “essencialmente homogênea” significa uma composição de proteína que compreende pelo menos cerca de 99% em peso da proteína, com base no peso total da composição.

[085] Conforme descrito acima, em algumas realizações, a proteína é um anticorpo. “Anticorpos” (Abs) e “imunoglobulinas” (Igs) são glicoproteínas que possuem as mesmas características estruturais. Enquanto os anticorpos exibem especificidade de ligação a um antígeno específico, imunoglobulinas incluem tanto anticorpos como outras moléculas similares a anticorpos, que geralmente são desprovidas de especificidade a um antígeno. Os polipeptídeos do último tipo são, por exemplo, produzidos em baixos níveis pelo sistema linfático, e a níveis maiores por mielomas.

[086] O termo “anticorpo” é utilizado no sentido mais amplo e cobre especificamente anticorpos monoclonais (incluindo anticorpos de comprimento total que possuem uma região Fc de imunoglobulina), composições de anticorpos com especificidade a poliepítopos, anticorpos biespecíficos, diacorpos, e moléculas de cadeia simples, tais como moléculas scFv, bem como fragmentos de anticorpos (tais como, Fab, F(ab')₂, e Fv).

[087] O termo “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 que compreendem a população são idênticos, exceto por possíveis mutações, tais como mutações de ocorrência natural, que podem estar presentes em menos quantidades. Assim, o termo “monoclonal” indica a característica do anticorpo como não sendo uma mistura de anticorpos distintos. Em algumas realizações, tal anticorpo monoclonal tipicamente inclui um anticorpo que compreende uma sequência de polipeptídeos que se liga ao alvo, em que a sequência de polipeptídeos de ligação ao alvo foi obtida por um processo que inclui a seleção de uma sequência de polipeptídeo de ligação ao alvo simples, de uma pluralidade de sequências de polipeptídeos. Por exemplo, o processo de seleção pode ser a seleção de um único clone a partir de uma série de clones, tal como um conjunto de clones de hibridoma, clones de fago, ou clones de DNA recombinante. Deve-se compreender que uma sequência de ligação alvo selecionada pode ser adicionalmente alterada, por exemplo, para melhorar sua afinidade ao alvo, para humanizar a sequência de ligação alvo, para melhorar sua produção na cultura celular, para reduzir sua imunogenicidade *in vivo*, para criar um anticorpo multiespecífico, etc., e que um anticorpo que compreende a sequência de ligação alvo alterada é também um anticorpo monoclonal da presente invenção. Em contraste com preparações de anticorpos policlonais que tipicamente incluem anticorpos diferentes direcionados contra diferentes determinantes (epítomos), cada anticorpo monoclonal de uma preparação de anticorpos monoclonais é direcionado a um único antígeno ou determinante. Além de sua especificidade, preparações de anticorpos monoclonais são vantajosas por serem tipicamente livres de contaminação por imunoglobulinas.

[088] O termo “monoclonal” indica a característica do anticorpo como sendo obtido de uma população de anticorpos substancialmente homogênea, e não deve ser construída como requerendo a produção do

anticorpo por qualquer método particular. Por exemplo, anticorpos monoclonais a serem utilizados de acordo com a presente invenção podem ser preparados por uma série de técnicas, incluindo, por exemplo, o método de hibridoma (descrito por, Kohler *et al.*, *Nature*, 256: 495 (1975); Harlow *et al.*, *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2^a ed. 1988); Hammerling *et al.*, in: *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* 563-681 (Elsevier, N.Y., 1981)), métodos de DNA recombinante (vide Publicação US. 4.816.567), tecnologia e exibição por fago (vide Clackson *et al.*, *Nature*, 352: 624-628 (1991); Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.* 222: 581-597 (1992); Sidhu *et al.*, *J. Mol. Biol.* 338(2): 299-310 (2004); Lee *et al.*, *J. Mol. Biol.* 340(5): 1073-1093 (2004); Fellouse, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101(34): 12467-12472 (2004); e Lee *et al.*, *J. Immunol. Methods* 284(1-2): 119-132(2004), e tecnologias para a produção de anticorpos humanos ou similares a humanos em animais que possuem partes ou todos os genes ou *loci* de imunoglobulina humanos que codificam sequências de imunoglobulina humana (vide documentos WO 98/24893; WO 96/34096; WO 96/33735; WO 91/10741; Jakobovits *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 2551 (1993); Jakobovits *et al.*, *Nature* 362: 255-258 (1993); Bruggemann *et al.*, *Year in Immunol.* 7:33 (1993); Publicação US 5.545.807; US 5.545.806; US 5.569.825; US 5.625.126; US 5.633.425; US 5.661.016; Marks *et al.*, *BioTechnology* 10: 779-783 (1992); Lonberg *et al.*, *Nature* 368: 856-859 (1994); Morrison, *Nature* 368: 812-813 (1994); Fishwild *et al.*, *Nature Biotechnol.* 14: 845-851 (1996); Neuberger, *Nature Biotechnol.* 14: 826 (1996) e Lonberg e Huszar, *Intern. Rev. Immunol.* 13: 65-93 (1995).

[089] Os anticorpos monoclonais da presente invenção incluem especificamente anticorpos “quiméricos”, nos quais uma porção da cadeia pesada e/ou leve é idêntica com ou homóloga a, sequências correspondentes em anticorpos derivados de uma espécie específica, ou pertencendo a uma classe ou subclasse específica de anticorpo, enquanto o restante da cadeia é

idêntico com, ou homólogo a, sequências correspondentes nos anticorpos derivados de outras espécies ou pertencendo a outras classes ou subclasses de anticorpos, bem como fragmentos de tais anticorpos, de forma que eles exibam a atividade biológica desejada (Publicação US 4.816.567; e Morrison *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851-6855 (1984)).

[090] Formas “humanizadas” de anticorpos não-humanos (tal como murino) são anticorpos quiméricos que contém uma sequência mínima derivada de imunoglobulina não-humana. Em uma realização, um anticorpo humanizado é uma imunoglobulina humana (anticorpo receptor) na qual os resíduos de uma região hipervariável do receptor são substituídos por resíduos de uma região hipervariável de uma espécie não-humana (anticorpo doador) tal como, rato, camundongo, coelho, ou um primata não-humano, que possui a especificidade, afinidade e/ou capacidade desejadas. Em alguns casos, resíduos da região estrutural (FR) da imunoglobulina humana são substituídos por resíduos não-humanos correspondentes. Ainda, anticorpos humanizados podem compreender resíduos que não são encontrados no anticorpo receptor ou no anticorpo doador. Estas modificações podem ser realizadas para refinar ainda mais a *performance* do anticorpo. No geral, um anticorpo humanizado compreenderá substancialmente todos de pelo menos um, e tipicamente dois, domínios variáveis, em que todas ou substancialmente todas as alças hipervariáveis correspondem àquelas de uma imunoglobulina não-humana, e todas ou substancialmente todas as FRs são de uma sequência de imunoglobulina humana. O anticorpo humanizado opcionalmente compreenderá ainda pelo menos uma porção de uma região constante de imunoglobulina (Fc), tipicamente aquela de uma imunoglobulina humana. Para maiores detalhes, vide Jones *et al.*, *Nature* 321:522-525 (1986); Riechmann *et al.*, *Nature* 332:323-329 (1988); e Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596 (1992). Vide também os seguintes artigos de revisão e referências citadas no presente: Vaswani e

Hamilton, *Ann. Allergy, Asthma & Immunol.* 1:105-115 (1998); Harris, *Biochem. Soc. Transactions* 23:1035-1038 (1995); Hurle e Gross, *Curr. Op. Biotech.* 5:428-433 (1994). O anticorpo humanizado inclui um anticorpo Primatized™, em que a região de ligação ao antígeno do anticorpo é derivada de um anticorpo produzido por imunização de macacos com o antígeno de interesse.

[091] Um “anticorpo humano” é um que possui uma sequência de aminoácidos que corresponde à sequência de um anticorpo produzido por um humano e/ou foi produzido utilizando qualquer uma das técnicas para a produção de anticorpos humanos descritas no presente. Esta definição de um anticorpo humano exclui especificamente um anticorpo humanizado compreendendo resíduos de ligação de antígeno não-humanos.

[092] Um “anticorpo de afinidade maturada” é um anticorpo com uma ou mais alterações em uma ou mais CDRs/HVRs do mesmo, que resulta em um aprimoramento na afinidade do anticorpo para o antígeno, comparada com a afinidade do anticorpo parental, que não possui tais alterações. Anticorpos de afinidade maturada preferidos irão possuir afinidades nanomolares ou mesmo picomolares para o antígeno alvo. Anticorpos com afinidade maturada são produzidos por procedimentos conhecidos no estado da técnica. Marks *et al.*, *Bio/Technology* 10:779-783 (1992) descreve a maturação da afinidade por embaralhamento dos domínios V_H e V_L. Mutagênese aleatória de CDR/HVR e/ou resíduos de estrutura são descritos por: Barbas *et al.*, *Proc Nat. Acad. Sci. USA* 91:3809-3813 (1994); Schier *et al.*, *Gene* 169:147-155 (1995); Yelton *et al.*, *J. Immunol.* 155:1994-2004 (1995); Jackson *et al.*, *J. Immunol.* 154(7):3310-9 (1995); e Hawkins *et al.*, *J. Mol. Biol.* 226:889-896 (1992).

[093] A “região variável” ou “domínio variável” de um anticorpo refere-se aos domínios amino-terminais da cadeia pesada ou leve do anticorpo. O domínio variável de cadeia pesada pode ser referenciado como “V_H”. O domínio variável de cadeia leve pode ser referenciado como “V_L”. Estes domínios

são geralmente as partes mais variáveis de um anticorpo e contém os sítios de ligação de antígeno.

[094] O termo “variável” refere-se ao fato de que certas porções dos domínios variáveis diferem grandemente em sequência entre anticorpos e são utilizadas na ligação e especificidade de cada anticorpo particular para seu antígeno específico. Entretanto, a variabilidade não é distribuída de forma uniforme entre os domínios variáveis de anticorpos. Ela é concentrada em três segmentos denominados regiões determinantes de complementaridade (CDRs) ou regiões hipervariáveis (HVRs), ambas nos domínios variáveis de cadeia pesada e cadeia leve. As porções mais altamente conservadas dos domínios variáveis são denominadas de regiões de estrutura (FR). Os domínios variáveis de cadeias leve e pesada nativas compreendem, cada um, quatro regiões FR, normalmente adotando uma configuração de folha beta, conectadas por três CDRs, que formam alças de conexão, e em alguns casos, formando parte da estrutura de folha beta. Os resíduos CDRs em cada cadeia são mantidos unidos em grande proximidade pelas regiões FR e, com as CDRs de outra cadeia, contribuem para a formação de um sítio de ligação de antígenos de anticorpos (vide Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Fifth Edition, National Institute of Health, Bethesda, MD (1991)). Os domínios constantes não são diretamente envolvidos na ligação de um anticorpo a um antígeno, mas exibem diversas funções efetoras, tais como participação do anticorpo na toxicidade celular dependente de anticorpo.

[095] As “cadeias leves” de anticorpos (imunoglobulinas) de qualquer espécie vertebrada pode ser atribuída a um ou dois tipos claramente distintos, denominados kappa (κ) e lambda (λ), com base nas sequências de aminoácidos de seus domínios constantes.

[096] Dependendo das sequências de aminoácidos dos domínios constantes de suas cadeias pesadas, anticorpos (imunoglobulinas) podem ser

atribuídos a diferentes classes. Existem cinco classes principais de imunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, e várias destas podem ser adicionalmente divididas em subclasses (isotipos), tais como, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁, e IgA₂. Os domínios constantes de cadeia pesada que correspondem a diferentes classes de imunoglobulinas são denominados a, d, e, g, e m, respectivamente. As estruturas da subunidade e configurações tridimensionais de diferentes classes de imunoglobulinas são bem conhecidas no estado da técnica e descritas de forma geral em, por exemplo, *Abbas et al., Cellular and Mol. Immunology*, 4th ed. (2000). Um anticorpo pode ser parte de uma grande molécula de fusão, formada por associação covalente ou não-covalente do anticorpo com uma ou mais proteínas ou peptídeos diferentes.

[097] Os termos “anticorpo de comprimento total”, “anticorpo intacto” e “anticorpo completo” são utilizados de forma intercambiável para referir-se a um anticorpo na sua forma substancialmente intacta, não fragmentos de anticorpos conforme definidos a seguir. Os termos referem-se particularmente a um anticorpo com cadeias pesadas que contem a região Fc.

[098] “Fragmentos de anticorpos” compreendem apenas uma porção de um anticorpo intacto, em que a porção retém pelo menos uma, várias ou todas, das funções normalmente associadas com aquela porção quando presente no anticorpo intacto. Em uma realização, um fragmento de anticorpo compreende um sítio de ligação de antígeno de um anticorpo intacto e, desta forma, retém a capacidade de ligar-se ao antígeno. Em outra realização, um fragmento de anticorpo, por exemplo, um que compreende a região Fc, retém pelo menos uma das funções biológicas normalmente associadas com a região Fc quando presente em um anticorpo intacto, tal como ligação FcRn, modulação da meia vida do anticorpo, função ADCC e ligação complementar. Em uma realização, um fragmento de anticorpo é um anticorpo monovalente que possui uma meia vida *in vivo* substancialmente similar ao anticorpo intacto. Por

exemplo, tal fragmento de anticorpo pode compreender um braço de ligação de antígeno ligado a uma sequência Fc capaz de conferir estabilidade *in vivo* ao fragmento.

[099] A digestão por papaína de anticorpos produz dois fragmentos de ligação a antígeno idênticos, denominados fragmentos “Fab”, cada um com um único sítio de ligação de antígeno, e um fragmento “Fc” residual, cujo nome reflete sua capacidade de cristalização rápida. Tratamento com pepsina gera um fragmento $F(ab')_2$ que possui dois sítios de combinação a antígeno e ainda é capaz de reticular o antígeno.

[0100] O fragmento Fab contém os domínios variáveis de cadeia leve e pesada e também contém o domínio constante de cadeia leve e o primeiro domínio constante (CH1) da cadeia pesada. Fragmentos Fab' diferem dos fragmentos Fab pela adição de alguns resíduos no terminal carboxila do domínio CH1 da cadeia pesada, incluindo uma ou mais cisteínas da região de articulação do anticorpo. Fab'-SH é a designação do presente para Fab' em que os resíduos de cisteína dos domínios constantes possuem um grupo tiol livre. Fragmentos de anticorpos $F(ab')_2$ foram produzidos originalmente como pares de fragmentos Fab' que possuem cisteínas de articulação entre elas. Outros acoplamentos químicos de fragmentos de anticorpos são conhecidos.

[0101] “Fv” é o fragmento de anticorpo mínimo que contém um sítio de ligação a antígeno completo. Em uma realização, uma espécie Fv de cadeia dupla consiste de um dímero de um domínio variável de cadeia leve e uma cadeia pesada em associação estreita e não-covalente. Em espécies Fv de cadeia simples (scFv), um domínio variável de cadeia leve e um pesado pode ser ligado de forma covalente por um ligante peptídico flexível tal como as cadeias leve e pesadas podem se associar em uma estrutura “dimérica” análoga àquela nas espécies Fv de cadeia dupla. É nesta configuração que as três CDRs de cada domínio variável interagem para definir um sítio de ligação a antígeno

na superfície do dímero V_H - V_L . De forma coletiva, as seis CDRs conferem ao anticorpo especificidade de ligação ao antígeno. Entretanto, mesmo um domínio variável simples (ou metade de um Fv compreendendo apenas três CDRs específicas para um antígeno) possui a capacidade de reconhecer e ligar antígeno, embora em afinidade menor do que o sítio de ligação completo.

[0102] Fragmentos de anticorpos “Fv de cadeia simples” ou “scFv” compreendem os domínios V_H e V_L de um anticorpo, em que estes domínios estão presentes em uma cadeia polipeptídica simples. Geralmente, o polipeptídeo scFv compreende adicionalmente um ligante polipeptídico entre os domínios V_H e V_L que permitem o scFv formar a estrutura desejada para ligação ao antígeno. Para uma revisão de scFv vide Pluckthun, em *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg e Moore eds., Springer-Verlag, Nova Iorque, Págs 269-315 (1994).

[0103] O termo “diacorpos” refere-se a pequenos fragmentos de anticorpos com dois sítios de ligação a antígenos, em que tais fragmentos compreendem um domínio variável de cadeia pesada (V_H) conectado a um domínio variável de cadeia leve (V_L) na mesma cadeia de polipeptídeos (V_H - V_L). Através do uso de um ligante que é muito curto para permitir o pareamento entre os dois domínios na mesma cadeia, os domínios são forçados a parear com os domínios de complementaridade de outra cadeia e criar dois sítios de ligação a antígenos. Os diacorpos podem ser bivalentes ou biespecíficos. Os diacorpos são descritos mais detalhadamente em, por exemplo, EP 404.097; WO 93/1161; Hudson *et al.*, (2003) *Nat. Med.* 9:129-134; e Hollinger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6444-6448 (1993). Os triacorpos e tetraacorpos são também descritos em Hudson *et al.*, (2003) *Nat. Med.* 9:129-134.

[0104] O anticorpo pode se ligar a qualquer proteína, incluindo, mas sem limitação, um membro da família do receptor HER, tal como HER1 (EGFR), HER2, HER3 e HER4; proteínas CD, tais como CD3, CD4, CD8, CD19, CD20,

CD21, CD22, e CD34; moléculas de adesão celular, tais como LFA-1, Mol, p150,95, VLA-4, ICAM-1, VCAM e integrina av/p3 incluindo a subunidade α ou β dos mesmos (tal como anticorpos anti-CD11a, anti-CD18 ou anti-CD11b); fatores de crescimento tais como fator de crescimento endotelial vascular (VEGF); IgE; antígenos do grupo sanguíneo; receptor flk2/flt3; receptor da obesidade (OB); e proteína C. Outros exemplos de proteínas incluem o hormônio do crescimento (GH), incluindo hormônio do crescimento humano (hGH) e hormônio do crescimento bovino (bGH); fator de liberação do hormônio do crescimento; hormônio da paratireóide; hormônio estimulante da tireóide, lipoproteínas; α -1-antitripsina; cadeia A de insulina, cadeia A de insulina; proinsulina; hormônio folículo estimulante; calcitonina; hormônio luteinizante; glucagon; fatores de coagulação, tais como fator VIIIc, fator IX, fator tissular, e fator de von Willebrands; fatores anti-coagulação tais como Proteína C; fator natriurético atrial; surfactante pulmonar; ativador de plasminogênio, tais como uroquinase ou ativador de plasminogênio do tipo de tecido (t-PA); bombazina; trombina; fator de necrose tumoral α e β ; encefalinase; RANTES (regulados em ativação de células T normalmente expressas e secretadas); proteína inflamatória de macrófago humana (MIP-1- α); albumina de soro, tal como albumina de soro humano (HSA); substância inibidora de mulerian; cadeia A de relaxina; cadeia B de relaxina; prorelaxina; peptídeo associado à gonadotropina de rato; DNase; inibina; activina; receptores para hormônios ou fatores de crescimento; integrina; proteína A ou D; fatores reumatóides; fator neurotrófico, tal como fator neurotrófico derivado de osso (BDNF), neurotrofina-3, -4, -5, ou -6 (NT-3, NT-4, NT-5, ou NT-6), ou um fator de crescimento de nervo, tal como NGF- β ; fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF); fator de crescimento de fibroblasto, tal como aFGF e bFGF; fator de crescimento epidérmico (EGF); fator de transformação de crescimento (TGF) tal como TGF- α e TGF- β , incluindo TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, TGF- β 4, ou TGF- β 5; fator de crescimento semelhante à

insulina I e II (IGF-I e IGF-II); des(1-3)-IGF-I (IGF-I do cérebro); proteínas de ligação a fatores de crescimento semelhante à insulina (IGFBPs); eritropoietina (EPO); trombopoietina (TPO); fatores osteoindutores; imunotoxinas; proteína morfogenética de osso (BMP); interferon tal como interferon- α , - β , e - γ ; fatores estimulantes de colônia (CSFs), tal como, M-CSF, GM-CSF, e G-CSF; interleucinas (ILs), tal como IL-1 a IL-10; dismutase superóxido; receptores de células T; proteínas de superfície de membrana; fator de aceleração do decaimento (DAF); um antígeno viral, tal como, por exemplo, uma porção do envelope do vírus da AIDS; proteínas de transporte; receptores de *homing*; adressinas; proteínas reguladoras; imunoadesinas; anticorpos; e fragmentos ou variantes biologicamente ativas de qualquer um dos polipeptídeos descritos acima. Muitos outros anticorpos e/ou proteínas podem ser utilizados de acordo com a presente invenção, e a lista acima não deve ser considerada como limitativa.

[0105] Um “fragmento biologicamente funcional” de um anticorpo compreende apenas uma porção de um anticorpo intacto, em que a porção retém pelo menos uma, e várias ou todas, das funções normalmente associadas com aquela porção quando presente no anticorpo intacto. Em uma realização, um fragmento biologicamente funcional de um anticorpo compreende um sítio de ligação a antígeno do anticorpo intacto e, desta forma, retém a capacidade de se ligar ao antígeno. Em outra realização, um fragmento biologicamente funcional de um anticorpo, por exemplo, um que compreende a região Fc, retém pelo menos uma das funções biológicas normalmente associadas com a região Fc quando presente no anticorpo intacto, tal como ligação a FcRn, modulação da meia vida do anticorpo, função ADCC e ligação complementar. Em uma realização, um fragmento biologicamente funcional de um anticorpo é um anticorpo monovalente que possui uma meia vida *in vivo* substancialmente similar ao anticorpo intacto. Por exemplo, tal fragmento biologicamente funcional

de um anticorpo pode compreender um braço de ligação a antígeno ligado a uma sequência Fc capaz de conferir estabilidade *in vivo* ao fragmento.

[0106] Os termos “inibidor da tioredoxina” e “inibidor de Trx” são utilizados de forma intercambiável, e incluem todos os agentes e medidas eficazes na inibição da atividade da tioredoxina. Assim, inibidores da tioredoxina (Trx) incluem todos os agentes e medidas que bloqueia qualquer componente do sistema enzimático de Trx, G6PD e/ou hexoquinase. Neste contexto, “inibição” inclui a eliminação completa (bloqueio) e redução da atividade da tioredoxina, e, conseqüentemente, eliminação completa ou parcial da redução de pontes dissulfeto na proteína, tal como um anticorpo.

[0107] Um anticorpo “isolado” é um que foi identificado e separado e/ou recuperado de um componente de seu ambiente natural. Componentes contaminantes de seu ambiente natural são materiais que poderiam interferir com usos na pesquisa, diagnóstico ou terapia para o anticorpo, e podem incluir enzimas, hormônios e outros solutos proteináceos ou não-proteináceos. Em algumas realizações, um anticorpo é purificado (1) para mais de 95% em peso do anticorpo conforme determinado por, por exemplo, o método de Lowry, e em algumas realizações, para mais do que 99% em peso; (2) para um grau suficiente para obter pelo menos 15 resíduos de sequência de aminoácidos N-terminal ou interna pelo uso de, por exemplo, um seqüenciador de copo giratório, ou (3) para homogeneidade por SDS-PAGE sob condições de redução ou não redutoras utilizando, por exemplo, azul de Coomassie ou mancha de prata. O anticorpo isolado inclui o anticorpo *in situ* nas células recombinantes uma vez que pelo menos um componente do ambiente natural do anticorpo não estará presente. Normalmente, entretanto, o anticorpo isolado será preparado por pelo menos uma etapa de purificação.

[0108] Os termos “proteína A” e “ProA” são utilizados de forma intercambiável no presente e incluem proteína A recuperada de uma fonte nativa

da mesma, proteína A produzida de forma sintética (tal como por síntese de peptídeos ou por técnicas recombinantes), e suas variantes, que retêm a capacidade de se ligar a proteínas que possuem uma região C_{H2}/C_{H3}, tal como uma região Fc. A proteína A pode ser obtida comercialmente a partir de Repligen, GE Healthcare e Fermatech. A proteína A é geralmente imobilizada em um material suporte de fase sólida. O termo “ProA” também se refere a uma resina ou coluna de cromatografia de afinidade contendo matriz de suporte sólido cromatográfico à qual a proteína A é covalentemente ligada.

[0109] O termo “cromatografia” refere-se ao processo pelo qual um soluto de interesse em uma mistura é separado de outros solutos em uma mistura como um resultado de diferenças na velocidade de migração de cada soluto individual da mistura até um meio estacionário sob a influência de uma fase móvel, ou em processos de eluição e ligação.

[0110] Os termos “cromatografia de afinidade” e “cromatografia de afinidade protéica” são utilizados de forma intercambiável no presente e referem-se a uma técnica de separação protéica na qual uma proteína de interesse ou anticorpo de interesse é ligado de forma reversível e específica a um ligante bioespecífico. De preferência, o ligante bioespecífico é covalentemente ligado a um material de fase sólida cromatográfica e é acessível para a proteína de interesse na solução como a solução que entra em contato com o material de fase sólida cromatográfica. A proteína de interesse (anticorpo, enzima ou proteína receptora) retém sua afinidade de ligação específica para o ligante bioespecífico (antígeno, substrato, cofator, ou hormônio, por exemplo) durante as etapas da cromatografia, enquanto outros solutos e/ou proteínas na mistura não se ligam de forma apropriada ou específica ao ligante. A ligação da proteína de interesse ao ligante imobilizado permite que a contaminação das proteínas ou impurezas da proteína passem através do meio cromatográfico enquanto a proteína de interesse permanece especificamente ligada ao ligante imobilizado

no material de fase sólida. A proteína de interesse ligada especificamente é então removida na forma ativa do ligante imobilizado com baixo pH, alto pH, alta salinidade, competição de ligante, e similares, e passada pela coluna cromatográfica com o tampão de eluição, livre de proteínas contaminantes ou impurezas de proteínas que foram anteriormente passadas pela coluna. Qualquer componente pode ser utilizado como um ligante para a purificação de sua proteína de ligação específica respectiva, tal como anticorpo.

[0111] Os termos “cromatografia sem afinidade” e “purificação sem afinidade” referem-se a um processo de purificação no qual a cromatografia de afinidade não é utilizada. A cromatografia sem afinidade inclui técnicas cromatográficas que são baseadas em interações não-específicas entre a molécula de interesse (tal como uma proteína, ou seja anticorpo) e uma matriz de fase sólida.

[0112] Uma “resina de troca catiônica” refere-se a uma fase sólida que é negativamente carregada, e que possui, desta forma, cátions livres para troca com cátions em uma solução aquosa passada sobre ou através da fase sólida. Um ligante negativamente carregado ligado à fase sólida para formar a resina de troca catiônica pode, por exemplo, ser um carboxilato ou sulfonato. Resinas de troca catiônica, comercialmente disponíveis, incluem carbóxi-metilcelulose, sulfopropil (SP) imobilizado em agarose (tal como SP-SEPHAROSE FAST FLOW™ ou SP-SEPHAROSE HIGH PERFORMANCE™, de GE Healthcare) e sulfonil imobilizado em agarose (tal como S-SEPHAROSE FAST FLOW™ da GE Healthcare). Uma “resina de troca iônica de modo misturado” refere-se a uma fase sólida que é covalentemente modificada com unidades catiônicas, aniônicas, e hidrofóbicas. Uma resina de troca iônica de modo misturado disponível comercialmente é BAKERBOND ABX™ (J.T. Baker, Phillipsburg, NJ) contendo grupos de troca catiônica fracos, uma baixa concentração de grupos de troca aniônica, e ligantes hidrofóbicos ligados a uma

matriz suporte de fase sólida de sílica gel.

[0113] O termo “resina de troca aniônica” é utilizado no presente para referir-se a uma fase sólida que é carregada positivamente, ou seja, que possui um ou mais ligantes carregados positivamente, tal como grupos amino quaternários, ligados a ela. Resinas de troca aniônica comercialmente disponíveis incluem DEAE celulose, QAE SEPHADEX™ e FAST Q SEPHAROSE™ (GE Healthcare).

[0114] Um “tampão” é uma solução que resiste a trocas no pH pela ação de seus componentes conjugados com base em ácido. Diversos tampões que podem ser empregados dependendo, por exemplo, do pH desejado do tampão são descritos em *Buffers. A Guide for the Preparation and Use of Buffers in Biological Systems*, Gueffroy, D., ed. Calbiochem Corporation (1975). Em uma realização, o tampão possui um pH na faixa de cerca de 2 a cerca de 9, alternativamente de cerca de 3 a cerca de 8, alternativamente, de cerca de 4 a cerca de 7, alternativamente de cerca de 5 a cerca de 7. Exemplos não limitativos de tampões que irão controlar o pH nesta faixa incluem MES, MOPS, MOPSO, Tris, HEPES, fosfato, acetato, citrato, succinato, e tampões de amônio, bem como combinações destes.

[0115] O “tampão de carga” é aquele que é utilizado para carregar a composição compreendendo a molécula de polipeptídeo de interesse e uma ou mais impurezas na resina de troca iônica. O tampão de carga possui uma condutividade e/ou pH de forma que a molécula de polipeptídeo de interesse (e geralmente uma ou mais impurezas) seja ligada à resina de troca iônica ou de forma que a proteína de interesse flua pela coluna enquanto as impurezas se liguem à resina.

[0116] O “tampão intermediário” é utilizado para eluir uma ou mais impurezas da resina de troca iônica, antes de eluir a molécula de polipeptídeo de interesse. A condutividade e/ou pH do tampão intermediário está presente de

forma que uma ou mais impurezas sejam eluídas na resina de troca iônica, mas não quantidades significantes do polipeptídeo de interesse.

[0117] O termo “tampão de lavagem” quando utilizado no presente, refere-se a um tampão utilizado para lavar ou re-equilibrar a resina de troca iônica, antes de eluir a molécula de polipeptídeo de interesse. De forma conveniente, o tampão de lavagem e o tampão de carga podem ser o mesmo, mas não necessariamente.

[0118] O “tampão de eluição” é utilizado para eluir o polipeptídeo de interesse da fase sólida. A condutividade e/ou pH do tampão de eluição é de forma que o polipeptídeo de interesse seja eluído da resina de troca iônica.

[0119] Um “tampão de regeneração” pode ser utilizado para regenerar a resina de troca iônica de forma que ela possa ser re-utilizada. O tampão de regeneração possui uma condutividade e/ou pH conforme requerido para remover substancialmente todas as impurezas e o polipeptídeo de interesse da resina de troca iônica.

[0120] O termo “substancialmente similar” ou “substancialmente o mesmo”, da forma utilizada no presente, refere-se a um grau suficientemente alto de similaridade entre dois valores numéricos (por exemplo, um associado com um anticorpo da presente invenção e o outro associado com um anticorpo de referencia/comparação), de forma que um técnico no assunto saberia considerar a diferença entre os dois valores para ser de pequena ou nenhuma significância biológica e/ou estatística no contexto da característica biológica mensurada por ditos valores (tal como valores Kd). A diferença entre ditos dois valores é, por exemplo, menor do que cerca de 50%, menor do que cerca de 40%, menor do que cerca de 30%, menor do que cerca de 20%, e/ou menor do que cerca de 10% como uma função do valor referência/comparação.

[0121] O termo “substancialmente reduzido” ou “substancialmente diferente”, da forma utilizada no presente com relação a quantidades ou valores

numéricos (e não como referência ao processo químico de redução), refere-se a um grau suficientemente alto de diferença entre dois valores numéricos (em geral, um associado com uma molécula e o outro associado com uma molécula de referência/comparação) de forma que um técnico no assunto saberia considerar a diferença entre os dois valores para ser de significância estatística dentro do contexto da característica biológica mensurada por tais valores (tal como valores Kd). A diferença entre ditos dois valores é, por exemplo, maior do que cerca de 10%, maior do que cerca de 20%, maior do que cerca de 30%, maior do que cerca de 40%, e/ou maior do que cerca de 50% como uma função do valor para a molécula referencia/comparação.

[0122] O termo “vetor”, da forma utilizada no presente, refere-se a uma molécula de ácido nucléico capaz de transportar outro ácido nucléico para o qual este foi ligado. Um tipo de vetor é um “plasmídeo”, que se refere a um DNA de fita dupla circular no qual segmentos adicionais de DNA podem ser ligados. Outro tipo de vetor é um vetor de fago. Outro tipo de vetor é um vetor viral, em que segmentos adicionais de DNA podem ser ligados no genoma viral. Determinados vetores são capazes de realizar replicação autônoma em uma célula hospedeira na qual eles são introduzidos (tal como vetores bacterianos que possuem uma origem bacteriana de replicação e vetores epissomais de mamíferos). Outros vetores (tal como vetores não-epissomais de mamíferos) podem ser integrados no genoma de uma célula hospedeira mediante a introdução na célula hospedeira, e então são replicados junto com o genoma hospedeiro. Ainda, determinados vetores são capazes de direcionar a expressão de genes para os quais eles estão operacionalmente ligados. Tais vetores são denominados no presente como “vetores de expressão recombinantes”, ou simplesmente, “vetores de expressão. Em geral, os vetores de expressão de utilidade nas técnicas de DNA recombinante estão freqüentemente na forma de plasmídeos. De acordo com a presente invenção, “plasmídeo” e “vetor” podem

ser utilizados de forma intercambiável uma vez que o plasmídeo é a forma de vetor mais comumente utilizada.

[0123] “Identidade de sequência de aminoácido percentual (%)”, com relação a uma sequência de polipeptídeo referência, é definida como a porcentagem de resíduos de aminoácidos em uma sequência candidata que são idênticos com os resíduos de aminoácidos na sequência de polipeptídeo referência, após alinhamento da sequência e introdução de lacunas (*gaps*), se necessário, para alcançar a identidade de sequência percentual máxima, e não considerando qualquer substituição conservativa como parte da identidade de sequência. O alinhamento para os propósitos de determinação da identidade de sequência de aminoácidos percentual pode ser alcançado de diversas formas de conhecimento do técnico no assunto, por exemplo, utilizando softwares de computador publicamente disponíveis, tais como BLAST, BLAST-2, ALIGN ou Megalign (DNASTAR). Os técnicos no assunto poderão determinar os parâmetros apropriados para o alinhamento de sequências, incluindo qualquer algoritmo necessário para alcançar o alinhamento máximo sobre o comprimento total das sequências que estão sendo comparadas. Para os propósitos da presente invenção, entretanto, os valores da identidade de sequência de aminoácidos % são gerados utilizando o programa de computador para comparação de sequências ALIGN-2. O programa de computador de comparação de sequências ALIGN-2 foi criado pela Genentech, Inc., e o código fonte foi depositado com a documentação de usuário no escritório U.S. Copyright, Washington D.C., 20559, onde está registrado sob o número U.S. TXU510087. O programa ALIGN-2 é publicamente disponível pela Genentech, Inc., South San Francisco, California, ou pode ser compilado a partir do código fonte. O programa ALIGN-2 deve ser compilado para uso no sistema de operação UNIX, preferencialmente UNIX V4.0D digital. Todos os parâmetros de comparação de sequências são descritos pelo programa ALIGN-e não variam.

[0124] Em situações onde o ALIGN-2 é empregado para comparações de sequências de aminoácidos, a identidade de sequência de aminoácido % de uma dada sequência de aminoácidos A para, com, ou contra uma dada sequência de aminoácidos B (que pode alternativamente ser denominada como uma dada sequência de aminoácidos A que possui ou compreende uma certa identidade de sequência de aminoácidos % para, com, ou contra uma dada sequência de aminoácidos B) é calculada conforme segue:

100 vezes a fração X/Y

[0125] Onde X é o número de resíduos de aminoácidos avaliados como combinações idênticas pelo programa de alinhamento de sequências ALIGN-2 no alinhamento do programa de A e B, e

[0126] Onde Y é o número total de resíduos de aminoácidos em B.

[0127] Será apreciado que, onde o comprimento da sequência de aminoácidos A não for igual ao comprimento da sequência de aminoácidos de B, a identidade de sequência de aminoácido % de A para B não será igual a identidade de sequência de aminoácidos % de B para A. A menos que especificado de outra forma, todos os valores de identidade de sequência de aminoácidos % utilizados no presente são obtidos conforme descrito no parágrafo imediatamente anterior, utilizando o programa de computador ALIGN-2.

[0128] "Identidade de sequência de ácido nucléico percentual (%)" é definida como a porcentagem de nucleotídeos em uma sequência candidata que é idêntica com os nucleotídeos em uma sequência de referência que codifica o fator D, após alinhamento das sequências e introdução de lacunas, se necessário, para alcançar a identidade de sequência percentual máxima. O alinhamento para os propósitos de determinação da identidade de sequência de ácido nucléico percentual pode ser alcançado de diversas formas conhecidas no estado da técnica, por exemplo, utilizando softwares de computador

publicamente disponíveis tais como BLAST, BLAST-2, ALIGN ou Megalign (DNASTAR). Os técnicos no assunto podem determinar os parâmetros apropriados para a mensuração do alinhamento, incluindo qualquer algoritmo necessário para alcançar o alinhamento máximo sobre o comprimento total das sequências que estão sendo comparadas. A identidade de sequência é então calculada com relação a sequência mais longa, ou seja, mesmo se uma sequência mais curta apresenta 100% de identidade de sequência com uma porção da sequência mais longa, a identidade de sequência geral será menor do que 100%.

[0129] “Tratamento” refere-se tanto ao tratamento terapêutico quanto a medidas preventivas ou profiláticas. As pessoas que necessitam de tratamento incluem aqueles que já estão com a doença, bem como aqueles nos quais deseja se prevenir a doença. “Tratamento” de acordo com a presente invenção inclui o alívio de doenças e dos sinais e sintomas de uma doença específica.

[0130] Uma “disfunção” é qualquer condição que seria beneficiada pelo tratamento com a proteína. Esta definição inclui disfunções ou doenças crônicas e agudas, incluindo aquelas condições patológicas que pré dispõe o mamífero à disfunção em questão. Exemplos não limitativos de disfunções a serem tratadas pela presente invenção incluem carcinomas e alergias.

[0131] “Mamífero”, para os propósitos de tratamento, refere-se a qualquer animal classificado como mamífero, incluindo humanos, primatas superiores não-humanos, outros vertebrados, animais domésticos ou de fazenda, e animais de estimação, zoológico ou esportes, tais como cachorros, cavalos, gatos, vacas etc. De preferência, o mamífero é humano.

[0132] Um “RNA de interferência” ou “RNA de interferência pequeno (siRNA)” é uma molécula de RNA de fita dupla de menos de cerca de 30 nucleotídeos de comprimento que reduz a expressão de um gene alvo. RNAs

de interferência podem ser identificados e sintetizados utilizando métodos conhecidos (Shi Y., Trends em Genetics 19(1):9-12 (2003), WO 2003/056012 e WO 2003/064621), e bibliotecas de siRNA são comercialmente disponíveis, por exemplo a partir de Dharmacon, Lafayette, Colorado. Freqüentemente, siRNAs podem ser designados de forma bem sucedida para dirigir a extremidade 5' de um gene.

II. COMPOSIÇÃO E MÉTODOS DA PRESENTE INVENÇÃO

[0133] A prática da presente invenção será empregada, a menos que indicado de outra forma, por técnicas convencionais de biologia molecular e similares, que são bem conhecidas do técnico no assunto. Tais técnicas são explicadas por completo na literatura. Vide, por exemplo, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, (J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989); *Current Protocols in Molecular Biology* (F. Ausubel et al., eds., 1987 revisado); *Essential Molecular Biology* (T. Brown ed., IRL Press 1991); *Gene Expression Technology* (Goeddel ed., Academic Press 1991); *Methods for Cloning and Analysis of Eukaryotic Genes* (A. Bothwell et al., eds., Bartlett Publ. 1990); *Gene Transfer and Expression* (M. Kriegler, Stockton Press 1990); *Recombinant DNA Methodology II* (R. Wu et al., eds., Academic Press 1995); *PCR: A Practical Approach* (M. McPherson et al., IRL Press at Oxford University Press 1991); *Oligonucleotide Synthesis* (M. Gait ed., 1984); *Cell Culture for Biochemists* (R. Adams ed., Elsevier Science Publishers 1990); *Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells* (J. Miller & M. Calos eds., 1987); *Mammalian Cell Biotechnology* (M. Butler ed., 1991); *Animal Cell Culture* (J. Pollard et al., eds., Humana Press 1990); *Culture of Animal Cells*, 2nd Ed. (R. Freshney et al., eds., Alan R. Liss 1987); *Flow Cytometry and Sorting* (M. Melamed et al., eds., Wiley-Liss 1990); as séries *Methods in Enzymology* (Academic Press, Inc.); Wirth M. e Hauser H. (1993); *Immunochemistry in Practice*, 3rd edition, A. Johnstone & R. Thorpe, Blackwell Science, Cambridge,

MA, 1996; *Techniques in Immunocytochemistry*, (G. Bullock & P. Petrusz eds., Academic Press 1982, 1983, 1985, 1989); *Handbook of Experimental Immunology*, (D. Weir & C. Blackwell, eds.); *Current Protocols in Immunology* (J. Coligan *et al.*, eds. 1991); *Immunoassay* (E. P. Diamandis & T.K. Christopoulos, eds., Academic Press, Inc., 1996); Goding (1986) *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice* (2d ed) Academic Press, New York; Ed Harlow and David Lane, *Antibodies A laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1988; *Antibody Engineering*, 2nd edition (C. Borrebaeck, ed., Oxford University Press, 1995); e as séries *Annual Review of Immunology*; the series *Advances in Immunology*.

1. PREVENÇÃO DA REDUÇÃO DE PONTES DISSULFETO

[0134] A presente invenção refere-se a métodos para a prevenção da redução de pontes dissulfeto de proteínas durante a produção recombinante. Em particular, a presente invenção refere-se a métodos para a prevenção da redução de pontes dissulfeto de proteínas recombinantes durante o processamento após fermentação. Os métodos de acordo com a presente invenção são particularmente disponíveis para produção em larga escala de proteínas que contém pontes dissulfeto, tal como a uma escala de fabricação. Em uma realização, os métodos de acordo com a presente invenção são úteis para produção de proteína em larga escala a uma escala de mais do que 5.000 L.

[0135] Descobriu-se de forma experimental que a redução das pontes dissulfeto ocorre durante o processamento do fluído de cultura celular coletado (HCCF) produzido durante a fabricação de proteínas recombinantes que contém pontes dissulfeto. Tipicamente, esta redução é observada após a lise celular, especialmente lise celular mecânica durante operações de coleta, quando é encontrado um certo limiar, tal como, por exemplo, de cerca de 30% a cerca de 70%, ou de cerca de 40% a cerca de 60%, ou de cerca de 50% a cerca

de 60% da lise celular total. Este limiar irá variar, dependendo da natureza da proteína (tal como anticorpo) produzida, o hospedeiro recombinante, o sistema de produção, os parâmetros de produção utilizados, e similares, e pode ser prontamente determinado experimentalmente.

[0136] Teoricamente, tal redução deve resultar de uma série de fatores e condições durante o processo de fabricação, e deve ser causado por uma série de agentes redutores. A presente invenção é baseada, pelo menos em parte, no reconhecimento que a causa principal desta redução é um sistema da tioredoxina (Trx) ativo, ou sistema similar a tioredoxina, no HCCF.

[0137] O sistema da enzima Trx, composto de Trx, tioredoxina redutase (TrxR) e NADPH, é um sistema doador de hidrogênio para redução de pontes dissulfeto em proteínas. Trx é uma proteína monomérica pequena com uma unidade de sítio CXXC ativo que catalisa muitas reações redox através de troca tiol-dissulfeto. O Trx oxidado pode ser reduzido por NADPH via TrxR. O Trx reduzido é então capaz de catalisar a redução de dissulfetos em proteínas. O NADPH necessário para o sistema tioredoxina é fornecido através de reações em vias de fosfato pentose e glicólise. Os resultados apresentados no presente mostram que NADPH, que é necessário para a atividade do sistema Trx é fornecido pela atividade de glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD), que gera NADPH a partir de glicose e ATP por hexoquinase (vide Figura 4). Estas enzimas celulares (sistema Trx, G6PD, e hexoquinase) junto com seus substratos são liberadas no CCF durante a lise celular, permitindo que a redução ocorra. Conseqüentemente, a redução de dissulfeto pode ser prevenida por inibidores do sistema enzimático Trx ou sistemas de enzimas anteriores, fornecendo componentes para um sistema Trx ativo, tais como atividade G6PD e hexoquinase.

[0138] Para maiores detalhes sobre os mencionados sistemas enzimáticos, ou com relação a outros detalhes de produção de proteínas, vide,

por exemplo: Babson, A.L. e Babson, S.R. (1973) *Kinetic Colorimetric Measurement of Serum Lactate Dehydrogenase Activity*. *Clin. Chem.* 19: 766-769; Michael W. Laird *et al.*, "Optimization of BlyS Production and Purification from *Escherichia coli*," *Protein Expression and Purification* 39:237-246 (2005); John C. Joly *et al.*, "Overexpression of *Escherichia coli* Oxidoreductases Increases Recombinant Insulin-like Growth Factor-I Accumulation," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:2773-2777 (March 1998); Dana C. Andersen *et al.*, "Production Technologies for Monoclonal Antibodies and Their Fragments," *Current Opinion in Biotechnology* 15:456-462 (2004); Yariv Mazor *et al.*, "Isolation of Engineered, Full-length Antibodies from Libraries Expressed in *Escherichia coli*," *Nature Biotech.* 25, 563 - 565 (01 Jun 2007); Laura C. Simmons *et al.*, "Expression of Full-length Immunoglobulins in *Escherichia coli*: Rapid and Efficient Production of Aglycosylated Antibodies," *Journal of Immunological Methods* 263:133-147 (2002); Paul H. Bessette *et al.*, "Efficient Folding of Proteins with Multiple Disulfide Bonds in the *Escherichia coli* cytoplasm," *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96(24):13703-08 (1999); Chaderjian, W.B., Chin, E.T., Harris, R.J., e Etcheverry, T.M., (2005) "Effect of copper sulfate on performance of a serum-free CHO cell culture process and the level of free thiol in the recombinant antibody expressed," *Biotechnol. Prog.* 21: 550-553; Gordon G., Mackow M.C., e Levy H.R., (1995) "On the mechanism of interaction of steroids with human glucose 6-phosphate dehydrogenase," *Arch. Biochem. Biophys.* 318: 25-29; Gromer S., Urig S., e Becker K., (2004) "The Trx System – From Science to Clinic," *Medicinal Research Reviews*, 24: 40-89; Hammes G.G. e Kochavi D., (1962a) "Studies of the Enzyme Hexokinase. I. Steady State Kinetics at pH 8," *J. Am. Chem. Soc.* 84:2069-2073; Hammes G.G. e Kochavi D., (1962b) "Studies of the Enzyme Hexokinase. III. The Role of the Metal Ion," *J. Am. Chem. Soc.* 84:2076-2079; Johansson C., Lillig C.H., e Holmgren A., (2004) "Human Mitochondrial Glutaredoxin Reduces S-Glutathionylated Proteins with High Affinity Accepting Electrons from Either

Glutathione or Thioredoxin Reductase,” *J. Biol. Chem.* 279:7537-7543; Legrand, C., Bour, J.M., Jacob, C., Capiamont J., Martial, A., Marc, A., Wudtke, M., Kretzmer, G., Demangel, C., Duval, D., e Hache J., (1992) “*Lactate Dehydrogenase (LDH) Activity of the Number of Dead Cells in the Medium of Cultured Eukaryotic Cells as Marker*,” *J. Biotechnol.*, 25: 231-243; McDonald, M.R., (1955) “*Yeast Hexokinase : ATP + Hexose --> Hexose-6-phosphate + ADP*,” *Methods in Enzymology*, 1: 269-276, Academic Press, NY; Sols, A., DelaFuente, G., Villar-Palasi, C., e Asensio, C., (1958) “*Substrate Specificity and Some Other Properties of Bakers' Yeast Hexokinase*,” *Biochim Biophys Acta* 30: 92-101; Kirkpatrick D.L., Kuperus M., Dowdeswell M., Potier N., Donald L.J., Kunkel M., Berggren M., Angulo M., e Powis G., (1998) “*Mechanisms of inhibition of the Trx growth factor system by antitumor 2-imidazolyl disulfides*,” *Biochem. Pharmacol.* 55: 987-994; Kirkpatrick D.L., Watson S., Kunkel M., Fletcher S., Ulhaq S., e Powis G., (1999) “*Parallel syntheses of disulfide inhibitors of the Trx redox system as potential antitumor agents*,” *Anticancer Drug Des.* 14: 421-432; Milhausen, M., e Levy, H.R., (1975) “*Evidence for an Essential Lysine in G6PD from Leuconostoc mesenteroides*,” *Eur. J. Biochem.* 50: 453-461; Pleasants, J.C., Guo, W., e Rabenstein, D.L., (1989) “*A comparative study of the kinetics of selenol/diselenide and thiol/disulfide exchange reactions*,” *J. Am. Chem. Soc.* 111: 6553-6558; Whitesides, G.M., Lilburn, J.E., e Szajewski, R.P., (1977) “*Rates of thioldisulfide interchange reactions between mono- and dithiols and Ellman's reagent*,” *J. Org. Chem.* 42: 332-338; e Wipf P., Hopkins T.D., Jung J.K., Rodriguez S., Birmingham A., Southwick E.C., Lazo J.S., e Powis G, (2001) “*New inhibitors of the Trx–TrxR system based on a naphthoquinone spiroketal natural product lead*,” *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 11: 2637-2641.

[0139] De acordo com um aspecto da presente invenção, a redução das pontes dissulfeto pode ser prevenida através do bloqueio de qualquer componente dos sistemas enzimáticos de Trx, G6PD e hexoquinase. Os

inibidores de tais sistemas enzimáticos são coletivamente referenciados no presente como “inibidores da tioredoxina”, ou “inibidores da Trx”. Os inibidores da Trx são tipicamente adicionados ao fluido de cultura celular (CCF), que contém as células hospedeiras recombinantes e o meio de cultura, e/ou ao fluido de cultura celular coletado (HCCF), que é obtido após a coleta por centrifugação, filtração, ou métodos similares de separação. O HCCF é deficiente em células hospedeiras intactas, mas contém tipicamente proteínas de células hospedeiras e outros contaminantes, incluindo DNA, que são removidos em etapas subsequentes de purificação. Desta forma, os inibidores da Trx podem ser adicionados antes da coleta e/ou durante a coleta, preferencialmente, antes da coleta.

[0140] Alternativamente, ou adicionalmente, outros métodos não-específicos podem também ser utilizados para prevenir a redução da redução de pontes dissulfeto após a fermentação, durante a produção recombinante de proteínas recombinantes, tal como pulverização de ar ou ajuste do pH. Determinados métodos de inibição da redução contemplados pela presente invenção são listados na tabela 1 a seguir.

TABELA 1

MÉTODOS DE INIBIÇÃO DA REDUÇÃO

Método¹	Propósito
Adição de EDTA, EGTA, ou citrato	Inibir hexoquinase
Adição de sorbose-1-fosfato, polifosfatos, 6-deoxi-6-fluoroglicose, 2-C-hidroxi-metilglicose, xilose, ou lioxose	Inibir hexoquinase
Adição de epiandrosterona ou desidroepiandrosterona (DHEA)	Inibir G6PD
Adição de piridoxal 5'-fosfato ou 1-fluoro-2,4-dinitrobenzeno	Inibir G6PD
Adição de íons metálicos tais como Cu ²⁺ , Zn ²⁺ , Hg ²⁺ , Co ²⁺ , ou Mn ²⁺	Inibir o sistema de Trx
Adição de dissulfeto de alquil-2-imidazolil e compostos relacionados (tal como dissulfeto de 1 metilpropil-2-imidazolil ²) ou derivados espirocetal de naftoquinona (tal como	Inibir Trx

Método¹	Propósito
palmarumicin CP ₁ ²)	
Adição de aurotioglicose (ATG) ou aurotiomalato (ATM)	Inibir TrxR
Pulverização de ar	Depredar G6P e NADPH; agente oxidante
Cistina	Agente oxidante
Glutaciona oxidada	Agente oxidante
Ajuste do pH para abaixo de 6,0	Reduzir a velocidade de troca tiol-dissulfeto e a atividade do sistema de Trx

¹ Aplicado ao CCF antes da coleta ou no HCCF imediatamente após a coleta.

² Atualmente não disponível comercialmente.

[0141] Os “inibidores da Trx” para uso nos métodos da presente invenção incluem, mas sem limitação: (1) inibidores diretos de Trx, tais como dissulfeto de alquil-2-imidazolil e compostos relacionados (tal como dissulfeto de 1 metilpropil-2-imidazolil) (Kirkpatrick *et al.*, 1998 e 1999, acima) e derivados espirocetal de naftoquinona (tal como, palmarumicin CP₁) (Wipf *et al.*, 2001, acima); (2) inibidores específicos de TrxR, incluindo complexos de ouro, tal como aurotioglicose (ATG) e aurotiomalato (ATM) (vide, por exemplo, a revisão por Gromer *et al.*, 2004), que são exemplos de inibidores irreversíveis de TrxR; (3) íons metálicos, tal como Hg²⁺, Cu²⁺, Zn²⁺, Co²⁺, e Mn²⁺, que podem formar prontamente complexos com tióis e selenóis, e, desta forma, podem ser utilizados em realizações da presente invenção como inibidores da TrxR ou Trx; (4) inibidores de G6PD, tal como, por exemplo, piridoxal 5'-fosfato e 1 fluoro-2,4 dinitrobenzeno (Milhausen e Levy 1975, acima), determinados esteróides, tal como dehidroepiandrosterona (DHEA) e epiandrosterona (EA) (Gordon *et al.*, 1995, acima); e (4) inibidores da atividade de hexoquinase (e portanto produção de G6P para o G6PD), incluindo quelantes de íons metálicos, tal como Mg²⁺, tal como EDTA, e compostos que reagem com grupos SH, sorbose-1-fosfato, polifosfatos, 6-deoxi-6-fluoroglicose, 2-C-hidroxi-metilglicose, xilose e lixose (Sols *et al.*, 1958, acima; McDonald, 1955, acima); inibidores de hexoquinase

adicionais são descritos na publicação US 5.854.067 intitulada "Hexokinase Inhibitors". Deve-se compreender que tais inibidores são listados apenas para ilustração. Outros inibidores da Trx existem e poderão ser utilizados, sozinhos ou em combinações diversas, nos métodos da presente invenção.

[0142] Os "inibidores da Trx" para uso nos métodos da presente invenção também incluem reagentes onde a redução dos anticorpos ou proteínas produzidos de forma recombinante pode ser reduzida ou prevenida pela diminuição dos níveis de enzimas do sistema de Trx, da via de pentose fosfato ou hexoquinase em diversos pontos durante o processo de produção. Em algumas realizações, esta redução dos níveis enzimáticos pode ser realizada pelo uso siRNAs alvos, nucleotídeos *antisense*, ou anticorpos. Para produzir os siRNAs alvos ou nucleotídeos *antisense* aos genes conforme encontrados em células CHO, tais sequências de gene são disponíveis a partir de base de dados públicas para a seleção de sequências para reconhecer enzimas alvo em diferentes organismos. Vide o exemplo 9 abaixo para exemplos dos genes de *E. coli* e sistema Trx de rato.

[0143] Além do uso de inibidores descrito acima, é ainda possível em algumas realizações da presente invenção, prevenir a redução de uma proteína recombinante a ser purificada por pulverização do HCCF com ar, para manter um potencial redox oxidante no HCCF. Esta é uma medida não-direta que pode deprestar glicose, G6P e NADPH pela oxidação contínua das formas reduzidas de Trx e TrxR. A pulverização com ar do tanque de HCCF pode ser realizada, por exemplo, com um fluxo de ar de cerca de 100 litros a cerca de 200 litros, tal como, por exemplo, 150 litros por minuto. A difusão do ar pode ser realizada para alcançar uma porcentagem de saturação final; por exemplo, a pulverização de ar pode ser continuada até que o HCCF seja cerca de 100% saturado com ar, ou pode ser continuada até que o HCCR seja cerca de 30% saturado com ar, ou até ele ser entre cerca de 100% saturado a cerca de 30%

saturado com ar. A quantidade mínima de oxigênio dissolvido (dO_2) necessária para o efeito inibitório desejado dependerá ainda do anticorpo ou outra proteína recombinantes produzidos. Desta forma, por exemplo, cerca de 10% de dO_2 (ou cerca de 10 sccm para fluxo contínuo) apresentará o efeito desejado durante a produção do anticorpo 2H7 (Variante A), enquanto Apomab requer um nível elevado (cerca de 30%) de dO_2 .

[0144] Em realizações adicionais da presente invenção, outro método não-direto utilizável para bloquear a redução de proteínas recombinantes é a diminuição do pH do HCCF. Esta realização é vantajosa pela lenta troca de tiol-dissulfeto em valores reduzidos de pH (Whitesides *et al.*, 1977, acima; Pleasants *et al.*, 1989, acima). Assim, a atividade do sistema de Trx é significativamente reduzida sob valores de pH abaixo de 6, e portanto a redução da proteína recombinante, tal como ocrelizumab, pode ser inibida.

[0145] As realizações não-diretas podem ainda ser combinadas umas com as outras, e/ou com o uso de um ou mais inibidores da Trx.

[0146] A redução das pontes dissulfeto pode ser inibida (ou seja, bloqueada parcial ou completamente) pelo uso de um ou mais inibidores da Trx e/ou aplicação de procedimentos não-diretos seguindo a conclusão do processo de cultura celular, preferencialmente, para o CCF antes da coleta ou no HCCF imediatamente após a coleta. O tempo e modo ótimos de aplicação e quantidades eficazes dependerão da natureza da proteína a ser purificada, das células hospedeiras, e do método de produção específico utilizado. A determinação dos parâmetros ótimos poderá ser claramente determinada pelos técnicos no assunto.

[0147] Por exemplo, em um processo de cultura celular de mamíferos, tal como o processo de produção de anticorpos de CHO descrito nos exemplos da presente invenção, se sulfato cúprico ($CuSO_4$ na forma de pentahidrato ou na forma anidra) é utilizado como um inibidor de Trx, ele pode

ser adicionado para suplementar o CCF ou HCCF na faixa de concentração de cerca de 5 μM a cerca de 100 μM , tal como a partir de cerca de 10 μM a cerca de 80 μM , de preferência a partir de cerca de 15 μM a cerca de 50 μM . Uma vez que algumas culturas celulares já contém cobre (tal como cerca de 0,04 μM CuSO_4 para as culturas de células CHO utilizadas nos exemplos da presente invenção), esta quantidade é em adição ao cobre, se presente, já constante na cultura celular. Qualquer sal de cobre (II) pode ser utilizado no lugar de CuSO_4 , uma vez que a solubilidade não é uma preocupação. Por exemplo, acetato de cobre e cloreto de cobre, que são ambos solúveis em água, podem ser utilizados no lugar de CuSO_4 . A concentração eficaz mínima pode ainda depender do anticorpo produzido e do estágio onde o inibidor é utilizado. Desta forma, por exemplo, quando o sulfato cúprico é adicionado antes da lise, para anticorpo 2H7 (Variante A) a concentração eficaz mínima é de cerca de 30 μM , para Apomab é cerca de 75 μM , e para anticorpo Variante C (vide tabela 2) é cerca de 50 μM . Quando o sulfato cúprico é adicionado no meio CC, para anticorpo 2H7 (Variante A), a concentração eficaz mínima é cerca de 15 μM , para Apomab é cerca de 25 μM , e para anticorpo Variante C é cerca de 20 μM . Outra concentração inibitória mínima típica de CuSO_4 é 2 x a concentração do Trx (ou equivalente a Trx).

[0148] EDTA pode ser utilizado em uma ampla faixa de concentração, dependendo da extensão da lise celular, da célula hospedeira recombinante utilizada e outros parâmetros do processo de produção. Por exemplo, quando é utilizado as CHO ou outras células hospedeiras de mamíferos, o EDTA pode ser tipicamente adicionado em uma concentração entre cerca de 5 mM e cerca de 60 mM, tal como de cerca de 10 mM a cerca de 50 mM, ou de cerca de 20 mM a cerca de 40 mM, dependendo da extensão da lise celular. Para graus reduzidos de lise celular, baixas concentrações de EDTA serão suficientes, enquanto que para uma lise celular de cerca de 75%-100%, a concentração de EDTA necessária é maior, tal como, por exemplo, de cerca de

20 mM a cerca de 40 mM. A concentração eficaz mínima pode ainda depender do anticorpo produzido. Assim, por exemplo, para o anticorpo 2H7 (Variante A) a concentração mínima eficaz de EDTA é cerca de 10 mM.

[0149] DHEA como um inibidor de Trx é tipicamente eficaz a uma baixa concentração, tal como, por exemplo, na faixa de concentração de cerca de 0,05 mM a cerca de 5 mM, preferencialmente, de cerca de 0,1 mM a cerca de 2.5 mM.

[0150] Outros inibidores da Trx, tal como aurotioglicose (ATG) e aurotiomalato (ATM) inibem a redução de pontes dissulfeto na faixa de concentração de μ M. Desta forma, por exemplo, ATG ou ATM podem ser adicionados em uma concentração entre cerca de 0,1 mM a cerca de 1 mM. Enquanto a concentração inibitória mínima varia de acordo com as condições atuais, para ATG e ATM ela é tipicamente cerca de 4 x a concentração de TrxR.

[0151] Observa-se que todos os inibidores podem ser utilizados em uma quantidade em excesso, portanto, não é sempre necessário saber a quantidade de Trx ou TrxR no sistema.

[0152] Em uma realização preferida, a célula hospedeira de mamífero utilizada no processo de fabricação é uma célula de ovário de hamster chinês (CHO) (Urlaub *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216 (1980)). Outras células hospedeiras de mamíferos incluem, sem limitação, linhagem CV1 de rim de macaco transformada por SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); linhagem de rim embriônico humano (células 293 ou 293 subclonadas para crescimento na cultura de suspensão), Graham *et al.*, *J. Gen Virol.* 36:59 (1977)); células de rim de hamster filhote (BHK, ATCC CCL 10); células de Sertoli de rato (TM4, Mather, *Biol. Reprod.* 23:243-251 (1980)); células de rim de macaco (CV1 ATCC CCL 70); células de rim de macaco verde africano (*African green monkey*) (VERO-76, ATCC CRL-1587); células de carcinoma cervical humano (HELA, ATCC CCL 2); células de rim canino (MDCK, ATCC CCL 34); células de fígado de camundongo

buffalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442); células de pulmão humano (W138, ATCC CCL 75); células de fígado humano (Hep G2, HB 8065); tumor de mama de rato (MMT 060562, ATCC CCL51); células TRI (Mather *et al.*, *Annals N.Y. Acad. Sci.* 383:44-68 (1982)); células MRC 5; células FS4; uma linhagem de hepatoma humano (Hep G2); e células de mieloma ou linfoma (tal como células Y0, J558L, P3 e NS0) (vide publicação US 5.807.715).

[0153] Uma célula hospedeira preferida para a produção dos polipeptídeos da presente invenção é a linhagem celular DP12 de CHO (CHO K1 dhfr). Esta é uma das melhores linhagens celulares de CHO conhecidas, amplamente utilizada em prática laboratorial (vide, por exemplo, EP 0.307.247, publicada em 15 de março de 1989). Ainda, outras linhagens celulares CHO-K1 (dhfr) são conhecidas e podem ser utilizadas nos métodos da presente invenção.

[0154] As células hospedeiras de mamíferos utilizadas para produzir peptídeos, polipeptídeos e proteínas podem ser cultivadas em uma série de meios. Meios comercialmente disponíveis, tal como Ham's F10 (Sigma), Meio Essencial Mínimo ((MEM), Sigma), RPMI-1640 (Sigma), e meio Eagle modificado por Dulbecco ((DMEM, Sigma) são apropriados para cultura de células hospedeiras. Adicionalmente, qualquer um dos meios descritos em Ham e Wallace (1979), *Meth. in Enz.* 58:44, Barnes e Sato (1980), *Anal. Biochem.* 102:255, Publicação US 4.767.704; US 4.657.866; US 4.927.762; ou US 4.560.655; documento WO 90/03430; documento WO 87/00195; US 30.985; ou US 5.122.469, em que as descrições dos mesmos são incorporadas ao presente como referência, podem ser utilizados como meio de cultura para as células hospedeiras. Qualquer um destes meios pode ser suplementado conforme necessário com hormônios e/ou outros fatores de crescimento (tal como insulina, transferrin, ou fator de crescimento epidérmico), sais (tais como cloreto de sódio, cálcio, magnésio, e fosfato), tampões (tal como HEPES), nucleosídeos (tal como

adenosina e timidina), antibióticos (tal como droga Gentamycin™), elementos de traço (definidos como compostos inorgânicos normalmente presentes em concentrações finais na faixa micromolar), e glicose ou uma fonte de energia equivalente. Qualquer outro suplemento necessário pode ainda ser incluído em concentrações apropriadas que poderia ser prevista a um técnico 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 previsível ao técnico no assunto.

[0155] Um protocolo para a produção, recuperação e purificação de anticorpos recombinantes em células de mamíferos, tal como CHO, pode incluir as seguintes etapas:

[0156] As células podem ser cultivadas em um sistema bioreator de tanque de agitação e um procedimento de cultura de alimentação por batelada é empregado. Em uma cultura de alimentação por batelada preferida, as células hospedeiras de mamíferos, e meio de cultura, são inicialmente fornecidos a um frasco de cultura e nutrientes adicionais de cultura são alimentados, continuamente ou em pequenas adições, à cultura durante o cultivo, com ou sem coleta periódica de célula e/ou produto antes do término da cultura. A cultura de alimentação por batelada pode incluir, por exemplo, uma cultura de alimentação por batelada semi-contínua, em que periodicamente toda a cultura (incluindo células e meio) é removida e substituída por meio fresco. A cultura de alimentação por batelada é diferenciada da cultura por batelada simples em que todos os componentes para o cultivo celular (incluindo as células e todos os nutrientes da cultura) são fornecidos a frascos de cultura no início do processo de cultivo. A cultura de alimentação por batelada pode adicionalmente ser distinguida da cultura por perfusão uma vez que o sobrenadante não é removido dos frascos de cultura durante o processo (em cultura por perfusão, as células são novamente colocadas em cultura por, por exemplo, filtração, encapsulação,

ancoramento de microcarreadores, etc. e o meio de cultura é continuamente ou intermitentemente introduzido e removido do frasco de cultura).

[0157] Ainda, as células da cultura podem ser propagadas de acordo com qualquer esquema ou rotina que possa ser apropriado para a célula hospedeira e plano de produção específicos contemplados. Portanto, um procedimento de cultivo de uma única etapa ou múltiplas etapas pode ser empregado. Na cultura de uma única etapa, as células hospedeiras são inoculadas em um ambiente de cultura e os processos são empregados durante uma única fase de produção de cultura celular. Alternativamente, uma cultura de múltiplos estágios pode ser utilizada. Em uma cultura de múltiplos estágios, as células podem ser cultivadas em uma série de etapas ou fases. Por exemplo, as células podem ser crescidas em uma primeira etapa ou cultivo de fase de crescimento em que as células, possivelmente removidas do armazenamento, são inoculadas em um meio apropriado para promover o crescimento e alta viabilidade. As células podem ser mantidas na fase de crescimento por um ponto de tempo apropriado pela adição de meio fresco à cultura de células hospedeiras.

[0158] Em determinadas realizações, as condições da cultura celular contínua ou de alimentação por batelada podem ser planejadas para aumentar o crescimento das células de mamíferos na fase de crescimento da cultura celular. Na fase de crescimento, as células são crescidas sob condições e por um ponto de tempo que são maximizados para crescimento. As condições da cultura, tais como temperatura, pH, oxigênio dissolvido (dO_2) e similares, são as mesmas utilizadas com o hospedeiro específico e serão aparentes a um técnico no assunto. Em geral, o pH é ajustado a um nível entre cerca de 6,5 e 7,5 utilizando tanto um ácido (tal como CO_2) quanto uma base (tal como Na_2CO_3 ou $NaOH$). Uma faixa de temperatura apropriada para o cultivo de células de mamíferos, tais como células CHO, é entre cerca de $30^\circ C$ a $38^\circ C$, e um dO_2

apropriado é entre 5-90% de saturação de ar.

[0159] Em um estágio particular, as células podem ser utilizadas para inocular uma fase ou etapa de produção do cultivo de células. De forma alternativa, conforme descrito acima, a fase ou etapa de produção podem ser contínuas com a fase ou etapa de inoculação ou crescimento.

[0160] O ambiente da cultura de células durante a fase de produção da cultura celular é tipicamente controlada. Assim, se uma glicoproteína é produzida, os fatores que afetam a produtividade celular específica da célula hospedeira de mamífero, podem ser manipulados de forma que o teor de ácido siálico desejado seja alcançado na glicoproteína resultante. Em um aspecto preferido, a fase de produção do processo de cultura celular é precedida por uma fase de transição da cultura celular na qual os parâmetros para a fase de produção da cultura celular são engajados. Detalhes adicionais para este processo são encontrados nos seguintes documentos: US 5.721.121, e Chaderjian et al., *Biotechnol. Prog.* 21(2):550-3 (2005), sendo que os relatórios dos mesmos é expressamente incorporados ao presente como referência.

[0161] Após a fermentação, as proteínas são purificadas. Os procedimentos para purificação de proteínas a partir de resíduos celulares depende inicialmente do sítio de expressão da proteína. Algumas proteínas podem ser levadas a serem secretadas diretamente da célula no meio de crescimento circundante; outras são secretadas de forma intracelular. Para estas últimas proteínas, a primeira etapa de um processo de purificação envolve a lise da célula, que pode ser realizada por uma série de métodos, incluindo cisalhamento mecânico, choque osmótico ou tratamentos enzimáticos. Tal disrupção libera o conteúdo completo da célula no homogenato, e ainda produz fragmentos subcelulares que são difíceis de remover devido ao seu pequeno tamanho. Tais fragmentos são geralmente removidos por centrifugação diferencial ou filtração. O mesmo problema acontece, embora em menor escala,

com as proteínas diretamente secretadas, devido à morte natural das células e liberação de proteínas intracelulares da célula hospedeira e componentes do processo de produção da proteína.

[0162] Uma vez obtida uma solução clara contendo a proteína de interesse, sua separação das outras proteínas produzidas pela célula é normalmente realizada pelo uso de uma combinação de diferentes técnicas cromatográficas. Tais técnicas separam misturas de proteínas com base na sua carga, grau de hidrofobicidade ou tamanho. Diversas resinas diferentes de cromatografia estão disponíveis para cada uma das técnicas, permitindo nível apurado do esquema de purificação da proteína particular envolvida. A essência de cada um dos métodos de separação é que as proteínas podem ser levadas tanto a se moverem em velocidades diferentes ao longo de uma longa coluna, alcançado uma separação física que aumenta conforme passam pela coluna, quanto a se aderirem de forma seletiva a um meio de separação, sendo então eluídas de forma diferente por solventes também diferentes. Em alguns casos, a proteína desejada é separada das impurezas quando as impurezas se aderem de forma específica à coluna, e a proteína de interesse não, ou seja, a proteína de interesse está presente “no fluxo”. Desta forma, a purificação de proteínas recombinantes a partir da cultura celular de células hospedeiras de mamíferos pode incluir uma ou mais etapas de cromatografia por afinidade (tal como proteína A) e/ou de troca iônica.

[0163] A cromatografia de troca iônica é uma técnica cromatográfica normalmente utilizada para a purificação de proteínas. Na cromatografia de troca iônica, regiões carregadas na superfície do soluto são atraídas por cargas opostas ligadas à matriz de cromatografia, desde que a força iônica do tampão circundante seja baixa. A eluição é geralmente alcançada por aumento na força iônica (ou seja condutividade) do tampão para competir com o soluto para os sítios carregados da matriz de troca iônica. A alteração do pH e

assim alteração da carga do soluto é outra forma de alcançar a eluição do soluto. A mudança na condutividade ou pH pode ser gradual (gradiente de eluição) ou em etapas (etapa de eluição). No passado, tais alterações eram progressivas; ou seja, o pH ou condutividade é aumentada ou reduzida em uma única direção.

[0164] Para maiores detalhes sobre purificação industrial de anticorpos terapêuticos vide, por exemplo, Fahrner et al., *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* 18:301-27 (2001), descrição do qual está integralmente incorporada ao presente como referência.

[0165] Além das células hospedeiras de mamíferos, outros organismos eucarióticos podem ser utilizados como células hospedeiras para expressão da proteína recombinante. Para expressão em células hospedeiras de leveduras, tal como levedura de comum para pães, ou *Saccharomyces cerevisiae*, vetores apropriados incluem vetores de replicação episomal com base no plasmídeo de 2-mícron, vetores de integração, e os vetores de cromossomo artificial de levedura (YAC). Outras leveduras apropriadas para produção recombinante de proteínas heterólogas incluem *Schizosaccharomyces pombe* (Beach e Nurse, *Nature*, 290: 140 (1981); EP 139.383 publicada em 2 de maio de 1985); hospedeiros *Kluyveromyces* (Publicação US 4.943.529; Fleer et al., *Bio/Technology*, 2: 968 975 (1991)) tal como, por exemplo, *K. lactis* (MW98-8C, CBS683, CBS4574; Louvencourt et al., *J. Bacteriol.*, 737 (1983)), *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; Van den Berg et al., *Bio/Technology*, 8: 135 (1990)), *K. thermotolerans*, e *K. marxianus*; *yarrowia* (EP 402.226); *Pichia pastoris* (EP 183.070; Sreekrishna et al., *J. Basic Microbiol.*, 28: 265 278 (1988)); *Candida*; *Trichoderma reesia* (EP 244.234); *Neurospora crassa* (Case et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76: 5259 5263 (1979)); *Schwanniomyces* tal como *Schwanniomyces occidentalis* (EP 394.538 publicada em 31 de outubro de 1990); e fungos filamentosos tal como, por exemplo, *Neurospora*, *Penicillium*,

Tolypocladium (WO 91/00357 publicado em 10 de janeiro de 1991), e hospedeiros *Aspergillus* tal como *A. nidulans* (Ballance *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 112: 284 289 (1983); Tilburn *et al.*, *Gene*, 26: 205 221 (1983); Yelton *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81: 1470 1474 (1984)) e *A. niger* (Kelly e Hynes, *EMBO J.*, 4: 475 479 (1985)). Leveduras metilotrópicas são apropriadas para a presente invenção e incluem, sem se limitar, levedura capaz de crescimento em metanol selecionada a partir do gênero que consiste em *Hansenula*, *Candida*, *Kloeckera*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Torulopsis*, e *Rhodotorula*. Uma lista de espécies específicas que são exemplos desta classe de leveduras pode ser encontrada em C. Anthony, *The Biochemistry of Methylotrophs*, 269 (1982). O sistema de expressão para as leveduras listadas e outras, é bem conhecido do técnico no assunto e/ou está comercialmente disponível.

[0166] Para expressão em células hospedeiras de insetos, tal como células Sf9, vetores apropriados incluem vetores baculovirais. Para expressão em células hospedeiras de plantas, particularmente hospedeiros vegetais dicotiledônios, tal como tabaco, vetores de expressão apropriados incluem vetores derivados do plasmídeo Ti de *Agrobacterium tumefaciens*.

[0167] Os métodos da presente invenção também se estendem às culturas de células hospedeiras procarióticas. Células hospedeiras procarióticas apropriadas para expressão de anticorpos e outras proteínas a serem protegidas por meio da presente invenção incluem *Archaeobacteria* e *Eubacteria*, tal como organismos Gram-negativos ou Gram-positivos. Exemplos de bactérias úteis incluem *Escherichia* (tal como *E. coli*), *Bacilli* (tal como *B. subtilis*), *Enterobacteria*, espécies *Pseudomonas* (tal como *P. aeruginosa*), *Salmonella typhimurium*, *Serratia marcescans*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Shigella*, *Rhizobia*, *Vitreoscilla*, ou *Paracoccus*. Em uma realização, as células gram-negativas são utilizadas. Exemplos de linhagens de *E. coli* incluem a linhagem W3110

(Bachmann, Cellular and Molecular Biology, vol. 2 (Washington, D.C.: *American Society for Microbiology*, 1987), pp. 1190-1219; depósito ATCC 27.325) e derivados dos mesmos, incluindo a linhagem 33D3 que possui genótipo W3110 Δ fhuA (Δ tonA) ptr3 lac lq lacL8 Δ ompT Δ (nmpc-fepE) degP41 kanR (Publicação US 5.639.635). Outras linhagens e seus derivados, tal como *E. coli* 294 (ATCC 31.446), *E. coli* B, *E. coli* 1776 (ATCC 31.537) e *E. coli* RV308 (ATCC 31.608) também estão incluídas. Tais exemplos são ilustrativos e não limitativos. Métodos para a construção de derivados de qualquer uma das bactérias acima mencionadas, que possuem genótipos definidos, são bem conhecidos no estado da técnica e descritos em, por exemplo, Bass *et al.*, *Proteins*, 8:309-314 (1990). É geralmente necessário selecionar a bactéria apropriada levando em consideração a capacidade de replicação do replicon nas células das bactérias. Por exemplo, as espécies *E. coli*, *Serratia*, ou *Salmonella* podem ser utilizadas de forma apropriada como hospedeiros quando plasmídeos bem conhecidos, tais como pBR322, pBR325, pACYC177, ou pKN410, são utilizados para fornecer o replicon. Tipicamente, a célula hospedeira deve secretar quantidades mínimas de enzimas proteolíticas, e inibidores de protease adicionais podem ser desejáveis para incorporação na cultura celular.

[0168] Os métodos para a produção, recuperação e purificação de proteínas recombinantes a partir de culturas de células hospedeiras que não sejam de mamíferos, são bem conhecidos no estado da técnica. Se o polipeptídeo for produzido em uma célula hospedeira que não de mamífero, tal como um microorganismo, tal como fungo ou *E. coli*, o polipeptídeo será recuperado dentro da célula ou no espaço periplasmático (Kipriyanov e Little, *Molecular Biotechnology*, 12: 173 201 (1999); Skerra e Pluckthun, *Science*, 240: 1038 1040 (1988)). Assim, é necessário liberar a proteína das células para o meio extracelular por extração, tal como lise das células. Tal disruptão libera todo o conteúdo da célula no homogenato, e ainda produz fragmentos

subcelulares que são difíceis de remover devido ao seu pequeno tamanho. Tais resíduos são normalmente removidos por centrifugação diferencial ou por filtração.

[0169] A lise celular é tipicamente realizada pelo uso de técnicas de ruptura mecânica tal como homogeneização ou moagem. Enquanto a proteína de interesse é em geral liberada de forma eficaz, tais técnicas possuem diversas desvantagens (Engler, *Protein Purification Process Engineering*, Harrison eds., 37 55 (1994)). O aumento da temperatura, que normalmente ocorre durante o processamento, pode resultar na inativação da proteína. Ainda, a suspensão resultante contém amplo espectro de proteínas contaminantes, ácidos nucleicos, e polissacarídeos. Os ácidos nucleicos e polissacarídeos aumentam a viscosidade da solução, complicando potencialmente a processamento subsequente de centrifugação, filtração por fluxo cruzado ou cromatografia. Associações de complexos de tais contaminantes com a proteína de interesse podem complicar o processo de purificação e resultar em níveis baixos de rendimento, inaceitáveis. Métodos aprimorados para a purificação de polipeptídeos heterólogos a partir de caldo ou homogenato de fermentação microbial são descritos, por exemplo, na Publicação US 7.169.908, conteúdo do qual está inteiramente incorporado ao presente como referência.

[0170] Enfatiza-se que os métodos de fermentação, recuperação e purificação descritos pela presente invenção são apenas a título ilustrativo. Os métodos da presente invenção podem ser combinados com qualquer processo de fabricação desenvolvido para a produção, recuperação e purificação de proteínas recombinantes.

2. ANTICORPOS

[0171] Em uma realização preferida, os métodos da presente invenção são usados para prevenir a redução de pontes de dissulfeto inter- e/ou intracadeia de anticorpos, incluindo anticorpos terapêuticos e diagnósticos. Os

anticorpos no escopo da presente invenção incluem, mas não estão limitados a: anticorpos anti-HER2 incluindo o Trastuzumab (HERCEPTIN®) (Carter *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285-4289, (1992), Publicação US 5.725.856); anticorpos anti-CD20 tais como quimérico anti-CD20 “C2B8” descrito na publicação US 5.736.137 (RITUXAN®), uma variante quimérica ou humanizado anticorpo 2H7 como descrito na publicação US 5.721.108, B1 ou Tositumomab (BEXXAR®); anti-IL-8 (St John *et al.*, *Chest*, 103:932 (1993), e documento WO 95/23865); anticorpos anti-VEGF que incluem anticorpos anti-VEGF humanizados e/ou maturados por afinidade tais como o anticorpo huA4.6.1 anti-VEGF humanizado AVASTIN® (Kim *et al.*, *Growth Factors*, 7:53-64, (1992), documento WO 96/30046, e documento WO 98/45331, publicado em 15 de outubro de 1998); anticorpos anti-PSCA (WO01/40309); anticorpos anti-CD40, incluindo S2C6 e variantes humanizadas do mesmo (documento WO00/75348); anti-CD11a (publicação US 5.622.700, WO 98/23761, Steppe *et al.*, *Transplant Intl.* 4:3-7, (1991), e Hourmant *et al.*, *Transplantation* 58:377-380 (1994)); anti-IgE (Presta *et al.*, *J. Immunol.* 151:2623-2632, (1993), e WO 95/19181); anti-CD18 (publicação US 5.622.700, concedida em 22 de abril de 1997, ou como descritos no documento WO 97/26912, publicado em 31 de julho de 1997); anti-IgE (incluindo E25, E26 e E27; Publicação US 5.714.338, concedida em 3 de fevereiro de 1998 ou Publicação US 5.091.313, concedida em 25 de fevereiro de 1992, WO 93/04173 publicada em 4 de março de 1993, ou documento PCT/US98/13410 depositado em 30 de junho de 1998, publicação US 5.714.338); anticorpo receptor anti-Apo-2 (WO 98/51793 publicado em 19 de novembro de 1998); anticorpos anti-TNF- α que incluem cA2 (REMICADE®), CDP571 e MAK-195 (vide, publicação US 5.672.347 concedida em 30 de setembro de 1997, Lorenz *et al.* *J. Immunol.* 156(4):1646-1653 (1996), e Dhainaut *et al.* *Crit. Care Med.* 23(9):1461-1469 (1995)); fator anti-tecido (TF) (Publicação européia 0.420.937 B1 concedida em 9 de novembro de 1994);

integrina anti- $\alpha_4\text{-}\beta_7$ humano (WO 98/06248 publicado em 19 de fevereiro de 1998); anti-EGFR (anticorpo 225 quimérico ou humanizado conforme os descritos no documento WO 96/40210 publicado em 19 de dezembro de 1996); anticorpos anti-CD3 tais como OKT3 (publicação US 4.515.893 emitida em 7 de maio de 1985); anticorpos anti-CD25 ou anti-tac tais como CHI-621 (SIMULECT®) e (ZENAPAX®) (vide a publicação US 5.693.762 emitida em 2 de dezembro de 1997); anticorpos anti-CD4 tais como o anticorpo cM-7412 (Choy *et al. Arthritis Rheum* 39(1):52-56) (1996); anticorpos anti-CD52 tais como CAMPATH-1H (Riechmann *et al. Nature* 332:323-337 (1988); anticorpos receptores anti-Fc tais como o anticorpo M22 dirigido contra Fc (RI como descrito em Graziano *et al., J. Immunol.* 155(10):4996-5002 (1995); anticorpos anti-antígeno carcinoembrionário (CEA) tal como hMN-14 (Sharkey *et al., Câncer Res.* 55(23Suppl): 5935s-5945s (1995); anticorpos dirigidos contra células epiteliais da mama incluindo huBrE-3, hu-Mc 3 e CHL6 (Ceriani *et al., Câncer Res.* 55(23): 5852s-5856s (1995); e Richman *et al., Câncer Res.* 55(23 Suppl): 5916s-5920s (1995)); anticorpos que se ligam a células de carcinoma do cólon tais como C242 (Litton *et al., Eur J. Immunol.* 26(1):1-9 (1996)); anticorpos anti-CD38, tais como AT 13/5 (Ellis *et al., J. Immunol.* 155(2):925-937 (1995)); anticorpos anti-CD33 tais como Hu M195 (Jurcic *et al., Câncer Res* 55(23 Suppl):5908s-5910s (1995) e CMA-676 ou CDP771; anticorpos anti-CD22 tais como LL2 ou LymphoCide (Juweid *et al., Câncer Res* 55(23 Suppl):5899s-5907s (1995); anticorpos anti-EpCAM tais como 17-1A (PANOREX®); anticorpos anti-GpIIb/IIIa tais como abciximab ou c7E3 Fab (REOPRO®); anticorpos anti-RSV tais como MEDI-493 (SYNAGIS®); anticorpos anti-CMV tais como PROTOVIR®; anticorpos anti-HIV tais como PRO542; anticorpos anti-hepatite tais como anticorpo anti-Hep B OSTAVIR®; anticorpo anti-CA 125 OvaRex; anticorpo anti-epítipo GD3 idiotípico BEC2; anticorpo anti- $\alpha\text{v}\beta_3$ VITAXIN®; anticorpo anti-carcinoma de células renais humanas tais como ch-G250; ING-1; anticorpo anti-

17-1A humano (3622W94); anticorpo anti-tumor colo-retal humano (A33); anticorpo anti-melanoma humano R24 dirigido contra gangliosídeo GD3; anticorpos anti-carcinoma de células escamosas humano (SF-25); e anti-antígeno leucocítico humano (HLA) tais como Smart ID10 e o anticorpo anti-HLA DR Oncolym (Lym-1). Os antígenos alvo preferidos para o anticorpo da presente invenção são: o receptor HER2, VEGF, IgE, CD20, CD11a e CD40.

[0172] Muitos destes anticorpos são amplamente utilizados na prática clínica para tratar várias doenças, incluindo o câncer.

[0173] Em certas realizações específicas, os métodos da presente invenção são utilizados para a produção dos seguintes anticorpos e proteínas recombinantes.

ANTICORPOS ANTI-CD20

[0174] O anticorpo rituximab (Rituxan[®]) é um anticorpo monoclonal, humano/murino quimérico, geneticamente elaborado direcionado contra o antígeno CD20. Rituximab é o anticorpo denominado “C2B8” na Publicação US 5.736.137, publicada em 7 de abril de 1998 (Anderson *et al.*). Rituximab é indicado para o tratamento de pacientes com linfoma não-Hodgkin de células B, CD20-positivos, foliculares ou de baixo grau refratário ou recidivado. Estudos do mecanismo de ação *in vitro* demonstraram que Rituximab liga o complemento humano e lisa as linhagens de células B linfóides por meio de citotoxicidade dependente de complemento (CDC) (Reff *et al.*, *Blood* 83 (2):435-445 (1994)). Além disso, ele possui atividade significativa em testes de citotoxicidade celular dependente de anticorpos (ADCC). Mais recentemente demonstrou-se que Rituximab possui efeitos anti-proliferativos em testes de incorporação de timidina tritiada e induz a apoptose de maneira direta, enquanto outros anticorpos anti-CD19 e CD20 não o fazem (Maloney *et al.*, *Blood* 88 (10):637a (1996)). A sinergia entre Rituximab e quimioterapias e toxinas também foi observada experimentalmente. Particularmente, Rituximab sensibiliza as linhagens de

células de linfoma de células B humanas resistentes a fármacos aos efeitos citotóxicos da doxorubicina, CDDP, VP-16, toxina da difteria e rícina (Demidem *et al.*, *Cancer Chemotherapy & Radiopharmaceuticals* 12 (3):177-186 (1997)). Estudos *in vivo* pré-clínicos prévios demonstraram que Rituximab depleta as células B do sangue periférico, dos linfonodos e da medula óssea de macacos cinomolgos, presumivelmente, por meio de processos mediados por células e complemento (Reff *et al.*, *Blood* 83 (2):435-445 (1994)).

[0175] Patentes e publicações de patentes relativas a anticorpos CD20 incluem; Publicações US 5.776.456, US 5.736.137, US 6.399.061, e 5,843,439, bem como Pedido de Patente US 2002/0197255A1, US 2003/0021781A1, US 2003/0082172 A1, US 2003/0095963 A1, US 2003/0147885 A1 (Anderson *et al.*); Publicação US 6.455.043B1 e documento WO00/09160 (Grillo-Lopez, A.); documento WO00/27428 (Grillo-Lopez e White); documento WO00/27433 (Grillo-Lopez e Leonard); documento WO00/44788 (Braslowsky *et al.*); documento WO01/10462 (Rastetter, W.); documento WO01/10461 (Rastetter e White); documento WO01/10460 (White e Grillo-Lopez); Pedido de Patente US2002/0006404 e documento WO02/04021 (Hanna e Hariharan); Pedido de Patente US2002/0012665 A1 e documento WO01/74388 (Hanna, N.); Pedido de Patente US 2002/0058029 A1 (Hanna, N.); Pedido de Patente US 2003/0103971 A1 (Hariharan e Hanna); Pedido de Patente US2002/0009444A1, e documento WO01/80884 (Grillo-Lopez, A.); documento WO01/97858 (White, C.); Pedido de Patente US2002/0128488A1 e documento WO02/34790 (Reff, M.);WO02/060955 (Braslowsky *et al.*);WO2/096948 (Braslowsky *et al.*);WO02/079255 (Reff e Davies); Publicação US 6.171.586B1, e documento WO98/56418 (Lam *et al.*); documento WO98/58964 (Raju, S.); documento WO99/22764 (Raju, S.);WO99/51642, Publicação US 6,194,551B1, Publicação US 6,242,195B1, Publicação US 6,528,624B1 e Publicação US 6,538,124 (Idusogie *et al.*); documento

WO00/42072 (Presta, L.); documento WO00/67796 (Curd *et al.*); documento WO01/03734 (Grillo-Lopez *et al.*); Pedido de Patente US 2002/0004587A1 e documento WO01/77342 (Miller e Presta); Pedido de Patente US2002/0197256 (Grewal, I.); Pedido de Patente US 2003/0157108 A1 (Presta, L.); Publicações US 6.090.365B1, US 6.287.537B1, US 6.015.542, US 5.843.398, e US 5.595.721, (Kaminski *et al.*); Publicações US 5.500.362, US 5.677.180, US 5.721.108, e US 6.120.767 (Robinson *et al.*); Publicação US 6,410,391B1 (Raubitschek *et al.*); Publicação US 6,224,866B1 e documento WO00/20864 (Barbera-Guillem, E.); documento WO01/13945 (Barbera-Guillem, E.); documento WO00/67795 (Goldenberg); Pedido de Patente US 2003/01339301 A1 e documento WO00/74718 (Goldenberg e Hansen); documento WO00/76542 (Golay *et al.*); WO01/72333 (Wolin e Rosenblatt); Publicação US 6,368,596B1 (Ghetie *et al.*); Pedido de Patente US2002/0041847 A1, (Goldenberg, D.); Pedido de Patente US2003/0026801A1 (Weiner e Hartmann); documento WO02/102312 (Engleman, E.); pedido de patente US 2003/0068664 (Albitar *et al.*); documento WO03/002607 (Leung, S.); documento WO 03/049694 e US 2003/0185796 A1 (Wolin *et al.*); documento WO03/061694 (Sing e Siegall); US 2003/0219818 A1 (Bohen *et al.*); US 2003/0219433 A1 e documento WO 03/068821 (Hansen *et al.*) cada um dos quais é expressamente incorporado ao presente pela referência. Vide também, Publicação US 5.849.898 e pedido de Patente EP 330.191 (Seed *et al.*); Publicação US 4.861.579 e EP 332.865A2 (Meyer e Weiss); Publicação US 4.861.579 (Meyer *et al.*) e documento WO95/03770 (Bhat *et al.*).

[0176] Publicações sobre a terapia com Rituximab incluem: Perotta e Abuel “*Response of chronic relapsing ITP of 10 years duration to Rituximab*” Resumo #3360 *Blood* 10(1) (parte 1-2): pág. 88B (1998); Stashi *et al.* “*Rituximab chimeric anti-CD20 monoclonal antibody treatment for adults with chronic idiopathic thrombocytopenic purpura*” *Blood* 98(4):952-957 (2001); Matthews, R.

"Medical Heretics" *New Scientist* (7 de abril de 2001); Leandro et al. "Clinical outcome in 22 patients with rheumatoid arthritis treated with B lymphocyte depletion" *Ann Rheum Dis* 61:833-888 (2002); Leandro et al. "Lymphocyte depletion in rheumatoid arthritis: early evidence for safety, efficacy and dose response". *Arthritis & Rheumatism* 44(9): S370 (2001); Leandro et al., "An open study of B lymphocyte depletion in systemic lupus erythematosus", *Arthritis & Rheumatism* 46(1):2673-2677 (2002); Edwards e Cambridge "Sustained improvement in rheumatoid arthritis following a protocol designed to deplete B lymphocytes" *Rheumatology* 40:205-211 (2001); Edwards et al., "B-lymphocyte depletion therapy in rheumatoid arthritis and other autoimmune disorders" *Biochem. Soc. Trans.* 30(4):824-828 (2002); Edwards et al., "Efficacy and safety of Rituximab, a B-cell targeted chimeric monoclonal antibody: A randomized, placebo controlled trial in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatism* 46(9): S197 (2002); Levine e Pestronk "IgM antibody-related polyneuropathies: B-cell depletion chemotherapy using Rituximab" *Neurology* 52: 1701-1704 (1999); DeVita et al., "Efficacy of selective B cell blockade in the treatment of rheumatoid arthritis" *Arthritis & Rheumatism* 46:2029-2033 (2002); Hidashida et al., "Treatment of DMARD-Refractory rheumatoid arthritis with rituximab." Apresentado na Reunião Científica Anual do *American College of Rheumatology*; 24-29 de outubro; Nova Orleans, La. 2002; Tuscano, J. "Successful treatment of Infliximab-refractory rheumatoid arthritis with rituximab" Apresentado na Reunião Científica Anual do *American College of Rheumatology*; 24-29 de outubro; Nova Orleans, La. 2002. Sarwal et al., *N. Eng. J. Med.* 349(2):125-138 (10 de julho de 2003) relatam a heterogeneidade molecular na rejeição aguda do transplante renal identificado pelo perfil de microarranjo de DNA (*DNA microarray*).

[0177] Em várias realizações, a presente invenção fornece composições farmacêuticas compreendendo anticorpos 2H7 humanizados anti-

CD20. Em realizações específicas, o anticorpo 2H7 é um anticorpo humanizado listado na Tabela 2.

TABELA 2

ANTICORPO HUMANIZADO ANTI-CD20 E VARIANTES DESTES

Variante de 2H7	V _L SEQ ID Nº	V _H SEQ ID Nº	Cadeia L Total SEQ ID Nº.	Cadeia H Total SEQ ID Nº
A	1	2	6	7
B	1	2	6	8
C	3	4	9	10
D	3	4	9	11
F	3	4	9	12
G	3	4	9	13
H	3	5	9	14
I	1	2	6	15

[0178] Cada um dos variantes de anticorpos A, B e I da Tabela 2 compreende a sequência variável da cadeia leve (V_L):

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSSVSYMHWYQQKPGKAP
KPLIYAPSNLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQWSFNPT
FGQGTKVEIKR (SEQ ID NO:1); e

a sequência variável de cadeia pesada (V_H):

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHWVRQAP
GKGLEWVGAIYPGNGDTSYNQKFKGRFTISVDKSKNTLYLQMNSLRAEDTAV
YYCARVYYYSNSYWFYFDVWGQGTLLTVSS (SEQ ID NO:2).

[0179] Cada um dos anticorpos variantes C, D, F e G da Tabela 2 compreende a sequência variável da cadeia leve (V_L):

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSSVSYLHWYQQKPGKAPKPLIYA
PSNLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQWAFNPTFGQGT

KVEIKR (SEQ ID NO:3), e

a sequência variável de cadeia pesada (V_H):

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHWVRQAPGKGLE
WVGAIYPGNGATSYNQKFKGRFTISVDKSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
VVYYASASYWYFDVWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:4).

[0180] O anticorpo variante H da Tabela 2 compreende a sequência variável de cadeia leve (V_L) da SEQ ID NO: 3 (acima) e a sequência variável da cadeia pesada (V_H):

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHWVRQAPGKGLE
WVGAIYPGNGATSYNQKFKGRFTISVDKSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
VVYYSYRYWYFDVWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:5)

[0181] Cada um dos anticorpos variantes A, B e I da Tabela 2 compreende a sequência da cadeia leve de comprimento total:

DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASSSVSYMHWYQQKPGKAPKPLIY
APSNLASGVPSRFSGSGGTDFLTISLQPEDFATYYCQQWSFNPPTFGQG
TKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL
QSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVT
KSFNRGEC (SEQ ID NO:6).

[0182] O variante A da Tabela 2 compreende a sequência da cadeia pesada de comprimento total:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHWVRQAPGKGLE
WVGAIYPGNGDTSYNQKFKGRFTISVDKSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
VVYYSNSYWYFDVWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL
VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT
YICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT
LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV
VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR
EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLY

SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:7).

[0183] O variante B da Tabela 2 compreende a sequência da cadeia pesada de comprimento total:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHWVRQAPGKGLE
WVGAIYPGNGDTSYNQKFKGRFTISVDKSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
VYYYSNSYWYFDVWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL
VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQT
YICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT
LMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNATYRV
VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIAATISKAKGQPREPQVYTLPPSR
EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLY
SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:8).

[0184] O variante I da Tabela 2 compreende a sequência da cadeia pesada de comprimento total:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHWVRQAPGKGLE
WVGAIYPGNGDTSYNQKFKGRFTISVDKSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
VYYYSNSYWYFDVWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL
VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQT
YICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT
LMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNATYRV
VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNAALPAPIAATISKAKGQPREPQVYTLPPSR
EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLY
SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:15).

[0185] Cada um dos anticorpos variantes C, D, F e G da Tabela 2 compreendem a sequência da cadeia leve de comprimento total:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSSVSYLHWYQQKPGKAPKPLIYA
PSNLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQWAFNPPTFGQGT
KVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQ

SGNSQESVTEQDSKDYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTK
SFNRGEC (SEQ ID NO:9).

[0186] O variante C da Tabela 2 compreende a sequência da cadeia pesada de comprimento total:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHWVRQAPGKGLE
WVGAIYPGNGATSYNQKFKGRFTISVDKSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
VYYYSASYWYFDVWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL
VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQT
YICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT
LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNATYRV
VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIAATISKAKGQPREPQVYTLPPSR
EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLY
SKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:10).

[0187] O variante D da Tabela 2 compreende a sequência da cadeia pesada de comprimento total:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHWVRQAPGKGLE
WVGAIYPGNGATSYNQKFKGRFTISVDKSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
VYYYSASYWYFDVWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL
VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQT
YICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT
LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNATYRV
VSVLTVLHQDWLNGKEYKCAVSNKALPAPIEATISKAKGQPREPQVYTLPPSR
EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLY
SKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:11).

[0188] O variante F da Tabela 2 compreende a sequência da cadeia pesada de comprimento total:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHWVRQAPGKGLE
WVGAIYPGNGATSYNQKFKGRFTISVDKSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR

VVYYSASYWYFDVWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL
VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT
YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT
LMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNATYRV
VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNALPAPIAATISKAKGQPREPQVYTLPPSR
EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLY
SKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:12).

[0189] O variante G da Tabela 2 compreende a sequência da cadeia pesada de comprimento total:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHWVRQAPGKGLE
WVGAIYPGNGATSYNQKFKGRFTISVDKSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
VVYYSASYWYFDVWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL
VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT
YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT
LMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNATYRV
VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNALPAPIAATISKAKGQPREPQVYTLPPSR
EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLY
SKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHWHYHTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:13).

[0190] O variante H da Tabela 2 compreende a sequência da cadeia pesada de comprimento total:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHWVRQAPGKGLE
WVGAIYPGNGATSYNQKFKGRFTISVDKSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
VVYYSYRYWYFDVWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL
VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT
YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT
LMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNATYRV
VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNALPAPIAATISKAKGQPREPQVYTLPPSR
EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLY

SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:14).

[0191] Em determinadas realizações, o anticorpo humanizado 2H7 da presente invenção compreende adicionalmente de alterações nos aminoácidos do IgG Fc e apresenta afinidade de ligação para FcRn humano aumentada com relação a um anticorpo com IgG Fc do tipo selvagem, com um aumento de pelo menos 60 vezes, pelo menos 70 vezes, pelo menos 80 vezes, mais preferencialmente, pelo menos 100 vezes, preferencialmente, pelo menos, 125 vezes, e ainda mais preferencialmente pelo menos 150 vezes a 170 vezes.

[0192] O sítio de N-glicosilação no IgG está no Asn297 no domínio CH2. As composições de anticorpo 2H7 humanizado da presente invenção incluem composições de qualquer um dos anticorpos 2H7 humanizados anteriores possuindo uma região Fc, onde cerca de 80-100% (e, preferencialmente, cerca de 90-99%) do anticorpo na composição compreende uma estrutura de carboidrato de núcleo maduro que carece de fucose, ligado à região Fc da glicoproteína. Tais composições foram demonstradas no presente para exibir uma melhora surpreendente na ligação ao Fc γ R11A (F158), que não é tão eficaz quanto Fc γ R11A (V158) na interação com IgG humano. O Fc γ R11A (F158) é mais comum que o Fc γ R11A (V158) em africanos americanos e caucasianos saudáveis, normais. Vide, Lehrnbecher *et al.*, *Blood* 94:4220 (1999). Historicamente, os anticorpos produzidos em células de ovário de hamster chinês (CHO), um dos hospedeiros mais comumente utilizados na indústria, contêm cerca de 2 a 6% na população que são não fucosiladas. Entretanto, YB2/0 e Lec13, podem produzir anticorpos com 78 a 98% de espécies não fucosiladas. Shinkawa *et al.* *J Bio. Chem.* 278 (5), 3466-347 (2003), relataram que as células de anticorpos produzidos em YB2/0 e Lec13, possuem menos atividade FUT8, exibindo um aumento significativo na atividade ADCC *in vitro*. A produção de anticorpos com reduzido teor de fucose também está descrita em, por exemplo, Li *et al.*, (GlycoFi) "*Optimization of humanized*

IgGs in glycoengineered Pichia pastoris" na publicação online da *Nature Biology* de 22 de janeiro de 2006; Niwa R. *et al. Cancer res.* 64 (6) :2127-2133 (2004); US 2003/0157108 (Presta); US 6.602.684 e US 2003/0175884 (*Glycart Biotechnology*); US 2004/0093621, US 2004/0110704, US 2004/0132140 (todos de Kyowa Hakko Kogyo).

[0193] Um anticorpo 2H7 humanizado biespecífico engloba um anticorpo em que um braço do anticorpo tem pelo menos uma região de ligação ao antígeno da cadeia H e/ou L de um anticorpo 2H7 humanizado da invenção, e no outro braço tem uma região de ligação V com especificidade para um segundo antígeno. Em realiações específicas, o segundo o antígeno é selecionado a partir do grupo consistindo de CD3, CD64, CD32A, CD16, NKG2D ou outros ligantes ativadores de NK.

ANTICORPOS ANTI-HER2

[0194] Uma versão recombinante humanizada do anticorpo 4D5 murino HER2 (huMAb4D5-8, rhuMAb HER2, trastuzumab ou HERCEPTIN®; Patente US 5.821.337) é clinicamente ativa nos pacientes com cânceres de mama metastático que superexpressam HER2 e que receberam previamente extensiva terapia anti-câncer (Baselga *et al, J. Clin. Oncol* 14:737-744 (1996). O Trastuzumab recebeu a aprovação para ser comercializado pelo FDA em 25 de setembro de 1998 para o tratamento de pacientes com tumores de mama metastáticos que superexpressam a proteína HER2. Em novembro de 2006, o FDA aprovou o Herceptin como parte de um esquema de tratamento contendo doxorrubicina, ciclofosfamida e paclitaxel para o tratamento adjuvante de pacientes com HER2-positivo, câncer de mama nódulos-positivos.

[0195] Em uma realização, o anticorpo anti-HER2 compreende as seguintes sequências de domínios V_L e V_H:

V_L do anticorpo 2C4 humanizado versão 574 (SEQ ID N°: 16)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVSIGVAWYQQKPGKAPKLLIY

**SASYRYTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYYIYPYTFGQGT
KVEIK.**

e V_H do anticorpo 2C4 humanizado versão 574 (SEQ ID N^o: 17)

**EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYMMDWVRQAPGKGLE
WVADVNPNSGGSIYNQRFKGRFTLSVDRSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
NLGPSFYFDYWGQGTLVTVSS.**

[0196] Em outra realização, o anticorpo anti-HER2 compreende as sequências de domínio V_L (SEQ ID NO: 18) e V_H (SEQ ID NO: 19) do trastuzumab, como exibido na Figura 21 e Figura 22, respectivamente.

[0197] Outros anticorpos HER2 com várias propriedades foram descritos em Tagliabue *et al*, *Int. J. Cancer* 47:933-937 (1991); McKenzie *et al* *Oncogene* 4:543-548 (1989); Maier *et al. Cancer Res.* 51:5361-5369 (1991); Bacus *et al. Molecular Carcinogenesis* 3:350-362 (1990); Stancovski *et al. PNAS (USA)* 88:8691-8695 (1991); Bacus *et al. Cancer Research* 52:2580-2589 (1992); Xu *et al. Int. J. Cancer* 53:401-408 (1993); documento WO94/00136; Kasprzyk *et al. Cancer Research* 52:2771-2776 (1992); Hancock *et al. Cancer Res.* 51:4575-4580 (1991); Shawver *et al. Cancer Res.* 54:1367-1373 (1994); Arteaga *et al. Cancer Res.* 54:3758-3765 (1994); Harwerth *et al. J. Biol. Chem.* 267:15160-15167 (1992); Publicação US 5.783.186; e Klapper *et al. Oncogene* 14:2099-2109 (1997).

ANTICORPOS ANTI-VEGF

[0198] Os anticorpos anti-VEGF podem, por exemplo, compreender as seguintes sequências:

[0199] Em uma realização, o anticorpo anti-VEGF compreende as seguintes sequências de domínios V_L (SEQ ID No. 20):

**DIQMTQTTSS LSASLGDRVI ISCSASQDIS NYLNWYQQKP
DGTVKVLIYF TSSLHSGVPS RFSGSGSGTD YSLTISNLEP EDIATYYCQQ
YSTVPWTFGG GTKLEIKR; e**

a seguinte sequência V_H (SEQ ID No.: 21)

EIQLVQSGPE LKQPGETVRI SCKASGYTFT NYGMNWVKQA
PGKGLKWMGW INTYTGEPTY AADFKRRFTF SLETSASTAY LQISNLKNDD
TATYFCAKYP HYYGSSHWFYF DVWGAGTTVT VSS.

[0200] Em outra realização, o anticorpo anti-VEGF compreende as seguintes sequências V_L (SEQ ID No. 22):

DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCSASQDIS NYLNWYQQKP
GKAPKVLIF TSSLHSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ
YSTVPWTFGQ GTKVEIKR; and

a seguinte sequência V_H (SEQ ID No.: 23)

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGYTFT NYGMNWVRQA
PGKGLEWVGW INTYTGEPTY AADFKRRFTF SLDTSKSTAY LQMNSLRAED
TAVYYCAKYP HYYGSSHWFYF DVWGQGTLLVTVSS.

[0201] Em uma terceira realização, o anticorpo anti-VEGF compreende as seguintes sequências V_L (SEQ ID No. 24):

DIQLTQSPSS LSASVGDRVT ITCSASQDIS NYLNWYQQKP
GKAPKVLIF TSSLHSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ
YSTVPWTFGQ GTKVEIKR; and

a seguinte sequência V_H (SEQ ID No.: 25)

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGYDFT HYGMNWVRQA
PGKGLEWVGW INTYTGEPTY AADFKRRFTF SLDTSKSTAY LQMNSLRAED
TAVYYCAKYP YYYGTSHWFYF DVWGQGTLLVTVSS.

ANTICORPOS ANTI-CD11

[0202] O anticorpo anti-CD11a humanizado efalizumab ou Raptiva® (Publicação US 6.037.454) recebeu aprovação para comercialização da Food and Drug Administration (FDA) em 27 de outubro de 2003 para o tratamento da psoríase. Uma realização fornece um anticorpo anti-CD11a humano compreendendo as seguintes sequências V_L e V_H do HuM424:

V_L (SEQ ID NO:26):

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASKTISKYLAWYQQKPGKAP
KLLIYSGSTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQHNEYPLTF
GQGTKVEIKR; e

V_H (SEQ ID NO:27):

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYSFTGHWMNWVRQAP
GKGLEWVGMIHPSDSETRYNQKFKDRFTISVDKSKNTLYLQMNSLRAEDTAV
YYCARGIYFYGTTYFDYWGQGTLVTVSS.

[0203] O anticorpo anti-CD11a humano pode compreender o V_H da SEQ ID NO: 27 e a cadeia L de comprimento total da L HuMHM24 possuinda a sequência de:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASKTISKYLAWYQQKPGKAP
KLLIYS
GSTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQHNEY
PLTFGQ
GTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAK
VQWKV
DNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYA
CEVTHQG

LSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:28), or

a cadeia L acima com a cadeia H possuindo a sequência de:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYSFTGHWMNWVRQAP
GKGLEWVGM
IHPSDSETRYNQKFKDRFTISVDKSKNTLYLQMNSLRAEDTAVY
YCARGI
YFYGTTYFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT
AALGCLV
KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS

SSLGTQ

TYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPPELLGGPSV

FLFPPK

PKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT

KPREEQY

NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK

GQPREP

QVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN

NYKTTTP

VLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQK

SLSLSPG

K (SEQ ID NO:29).

[0204] Anticorpos para receptor DR5 (anti-DR5) também podem ser produzidos de acordo com a presente invenção. Tais anticorpos anti-DR5 incluem especificamente todas as variantes de anticorpos divulgadas na publicação PCT: WO2006/083971, tal como os anticorpos anti-DR5 designado como Apomabs 1,1; 2,1; 3,1; 4,1; 5,1; 5,2; 5,3; 6,1; 6,2; 6,3; 7,1; 7,2; 7,3; 8,1; 8,3; 9,1,2; 2,2; 3,2; 4,2; 5,2; 6,2; 7,2; 8,2; 9,2; 1,3; 2,2; 3,3; 4,3; 5,3; 6,3; 7,3; 8,3; 9,3 e 25,3, especialmente o Apomab 8,3 e Apomab 7,3, preferivelmente o Apomab 7,3. Todo o conteúdo do documento WO 2006/083971 está expressamente incorporado ao presente pela referência.

3. OUTRAS PROTEÍNAS CONTENDO DISSULFETO

[0205] Além de anticorpos, os métodos da presente invenção encontram utilidade na fabricação de outros polipeptídeos contendo pontes dissulfeto. Exemplos representativos de polipeptídeos incluem, sem se limitar, as seguintes proteínas terapêuticas: ativadores do plasminogênio tecidual (t-AP), tal como o ativador do plasminogênio tecidual humano (htPA, alteplase, ACTIVASE®), um agente trombolítico para o tratamento do infarto do miocárdio;

uma TNKase[®], um ht-PA variante com meia-vida estendida e especificidade à fibrina para a administração de um único *bolus*; hormônio de crescimento humano recombinante (rhGH, somatropina, NUTROPIN[®], PROTROPIN[®]) para o tratamento da deficiência de hormônio de crescimento em crianças e adultos, e deoxiribonuclease I humana recombinante (DNase I) para o tratamento da fibrose cística (CF).

[0206] Exemplos de proteínas contendo dissulfeto biologicamente importantes incluem hormônios de crescimento, incluindo hormônio do crescimento humano e hormônio do crescimento bovino; fator de liberação de hormônio do crescimento; hormônio paratireóide; hormônio estimulante da tireóide; lipoproteínas; alfa-1-antitripsina; cadeia A de insulina; cadeia B de insulina; proinsulina; hormônio estimulante das folicúlas; calcitonina; hormônio luteinizante; glucagon; fatores coagulantes tais como fator VIIIc, fator IX e fator de Von Willebrand; fatores anticoagulantes tais como Proteína C; fator natriurético atrial; tensoativo dos pulmões; ativador plasminogênio, tal como uroquinase, urina humana ou ativador plasminogênio do tipo tecido (t-PA); bombesina; trombina; fator de crescimento hemopoiético; fator de necrose tumoral alfa e beta; encefalinase; RANTES (regulada mediante a ativação, normalmente expressa por células T e segregada); proteína inflamatória de macrófagos humanos (MIP-1-alfa); albumina de soro, tal como albumina de soro humano; substância inibidora Muelleriana; cadeia A de relaxina; cadeia B de relaxina; pró-relaxina; peptídeo associado a gonadotropina de camundongo; proteína microbiana, tal como beta-lactamase; DNase; IgE; antígeno associado a linfócitos T citotóxicos (CTLA), tal como CTLA-4; inibina; activina; fator de crescimento endotelial vascular (VEGF); receptores para hormônios ou fatores do crescimento; proteína A ou D; fatores reumatóides; fator neurotrófico tal como fator neurotrófico derivado de ossos (BDNF), neurotrofina-3, 4, 5 ou 6 (NT-3, NT-4, NT-5 ou NT-6) ou fator de crescimento dos nervos tal como NGF-β; fator de

crescimento derivado de plaquetas (PDGF); fator de crescimento de fibroblastos, tal como aFGF e bFGF; fator de crescimento epidérmico (EGF); fator de transformação de crescimento (TGF) tal como TGF-alfa e TGF-beta, incluindo TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, TGF- β 4 ou TGF- β 5; fator de crescimento semelhante à insulina I e II (IGF-I e IGF-II); des (1-3)-IGF-I (IGF-I do cérebro), proteínas de união de fator de crescimento semelhante à insulina; proteínas CD tais como CD3, CD4, CD8, CD19, CD20, CD 34 e CD 40; eritropoietina; fatores osteoindutivos; imunotoxinas; proteína morfogenética dos ossos (BMP); interferona, tal como interferona-alfa, beta e gama; fatores estimulantes de colônias (CSFs), tais como M-CSF, GM-CSF e G-CSF; interleucinas (ILs), tais como IL-1 a IL-10; superóxido dismutase; receptores de células T; proteínas de superfície de membrana; fator de aceleração de deterioração; antígeno viral, tal como uma parte do coquetel contra a AIDS; proteínas de transporte; receptores de abrigo; adressinas; proteínas reguladoras, integrinas, tais como CD11a, CD11b, CD11c, CD18, ICAM, VLA-4 e VCAM; antígeno associado a tumor, tal como receptor de HER2, HER3 ou HER4; e fragmentos de quaisquer dos polipeptídeos relacionados acima.

4. MÉTODOS GERAIS PARA A PRODUÇÃO DE ANTICORPOS RECOMBINANTES

[0207] Os anticorpos e outras proteínas recombinantes da presente invenção podem ser produzidas por técnicas bem conhecidas da tecnologia do DNA recombinante. Dessa forma, além dos anticorpos específicos acima identificados, os técnicos hábeis no assunto poderão gerar anticorpos direcionados contra um antígeno de interesse, por exemplo, usando as técnicas descritas abaixo.

SELEÇÃO E PREPARAÇÃO DO ANTÍGENO

[0208] O anticorpo da presente invenção é direcionado contra um antígeno de interesse. Preferencialmente, o antígeno é um polipeptídeo biologicamente importante e a administração do anticorpo em um mamífero

sofrendo de uma doença ou distúrbio pode resultar em um benefício terapêutico neste mamífero. Entretanto, os anticorpos direcionados contra antígenos não polipeptídeo (tal como antígenos glicolipídeos associados a tumor; vide Publicação US 5.091.178) são também contemplados. Quando o antígeno é um polipeptídeo, este pode ser uma molécula transmembrana (por exemplo, receptor) ou ligante, como um fator de crescimento. Exemplos de antígenos incluem aquelas proteínas descritas na seção (3) abaixo. Alvos moleculares exemplares para a detecção de anticorpos abrangidos pela presente invenção incluem proteínas CD, tais como CD3, CD4, CD8, CD19, CD20, CD22, CD34, CD40; membros da família de receptores ErbB como o receptor do EGF, receptores HER2, HER3 ou HER4; moléculas de adesão celular, tais como LFA-1, Mac1, p150, 95, VLA-4, ICAM-1, VCAM e integrina $\alpha/\beta 3$ incluindo tanto as subunidades α ou β destas (por exemplo, anticorpos anti-CD11a, anti-CD18 ou anti-CD11b); fatores de crescimento como VEGF; IgE; antígenos do grupo sanguíneo; receptor flk2/flt3, receptor da obesidade (OB); receptor MPL; CTLA-4; proteína C, ou qualquer um dos outros antígenos mencionados no presente. Antígenos para os quais os anticorpos listados acima se ligam estão incluídos especificamente no escopo da presente invenção.

[0209] Antígenos solúveis ou fragmentos destes, opcionalmente, conjugados com outras moléculas, podem ser usados como imunógenos para a geração de anticorpos. Para moléculas transmembrana, tal como receptores, os fragmentos destes (por exemplo, o domínio extracelular do receptor) pode ser utilizado como imunógeno. Alternativamente, as células que expressam a molécula transmembrana podem ser usadas como imunógeno. Tais células podem ser derivadas de uma fonte natural (por exemplo, linhagens de células de câncer) ou podem ser células que foram transformadas por meio de técnicas de recombinação para expressar a molécula transmembrana.

[0210] Outros antígenos e formas destes úteis para a preparação

de anticorpos serão evidentes para os técnicos no assunto.

ANTICORPOS POLICLONAIS

[0211] Os anticorpos policlonais são, de preferência, elevados em animais através de múltiplas injeções subcutâneas (sc) ou intraperitoneais (ip) do antígeno relevante e um adjuvante. Pode ser útil conjugar o antígeno relevante a uma proteína que é imunogênica na espécie a ser imunizada, tal como, o conjugado de hemocianina (*keyhole limpet hemocyanin*), albumina de soro, tiroglobulina bovina, ou inibidor de tripsina de soja utilizando um agente bifuncional ou de derivatização, por exemplo, maleimidobenzoil sulfosucinimida éster (conjugação através de resíduos de cisteína), N-hidroxisucinimida (através de resíduos de lisina), glutaraldeído, anidrido succínico, SOCl_2 , ou $\text{R}^1\text{N}=\text{C}=\text{NR}$, onde R e R^1 são grupos alquila diferentes.

[0212] Animais são imunizados contra o antígeno, conjugados imunogênicos, ou derivados através da combinação de, *por exemplo*, 100 μg ou 5 μg da proteína ou conjugado (para coelhos ou camundongos, respectivamente) com 3 volumes de adjuvante completo de Freund e injeção da solução intradérmica em diversos locais. Aproximadamente um mês depois, os animais são sangrados com 1/5 a 1/10 da quantidade original de peptídeo ou conjugado no adjuvante completo de Freund através de injeção subcutânea em diversos locais. De 7 a 14 dias após os animais são sangrados e o soro é testado para título de anticorpo. Os animais são sangrados até o título platô. De preferência, os animais são sangrados com o conjugado do mesmo antígeno, mas conjugados a uma proteína diferente e/ou através de um reagente de reticulação diferente. Os conjugados também podem ser produzidos em cultura de células recombinantes como fusões de proteínas. Ainda, agentes de agregação tais como alúmen são utilizados de forma apropriada para melhorar a resposta imune.

ANTICORPOS MONOCLONAIS

[0213] Os anticorpos monoclonais podem ser fabricados através do

uso do método de hibridoma descrito primeiramente por Kohler *et al.*, *Nature* 256: 495 (1975) ou podem ser produzidos através de técnicas de DNA recombinante (Publicação US 4.816.567).

[0214] No método de hibridoma, um camundongo, ou outro animal hospedeiro apropriado, tal como hamster ou macaco é tipicamente imunizado como descrito acima para gerar linfócitos que produzem ou são capazes de produzir anticorpos que se ligam de forma específica a proteína utilizada para imunização. Alternativamente, linfócitos podem ser imunizados *in vitro*. Os linfócitos são fundidos em seguida com células de mieloma, utilizando um agente de fusão apropriado, tal como o polietilenoglicol, para formar uma célula de hibridoma (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, págs. 59 a 103 (Academic Press, 1986)).

[0215] As células de hibridoma assim preparadas podem ser semeadas e cultivadas em um meio de cultura apropriado que contém uma ou mais substâncias que inibem o crescimento ou a sobrevivência das células de mieloma parentais não-fundidas. Por exemplo, se as células de mieloma parentais não contêm a enzima hipoxantina-guanina-fosforribosiltransferase (HGPRT ou HPRT), o meio de cultura para os hibridomas incluirá tipicamente hipoxantina, aminopterina e timidina (meio HAT), substâncias que evitam o crescimento de células com deficiência em HGPRT.

[0216] Células de mieloma preferidas são aquelas que se fundem eficientemente, suportam a produção estável em alto nível de anticorpos pelas células produtoras de anticorpos selecionadas e são sensíveis a um meio, tal como meio HAT. Entre estas, as linhagens de células de mieloma mais preferidas são linhagens de mieloma murino, tais como as derivadas de tumores de camundongos MOPC-21 e MPC-11 que podem ser obtidas no *Salk Institute Cell Distribution Center*, San Diego, Califórnia, Estados Unidos, células SP-2 ou X63-Ag8-653 disponíveis a pelo *American Type Culture Collection*, Rockville,

Maryland USA. Linhagens celulares de mieloma humano e heteromieloma humano/camundongo também foram descritas para a produção de anticorpos monoclonais humanos (Kozbor, *J. Immunol.*, 133:3001 (1984); e Brodeur *et al.*, *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, págs. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)).

[0217] O meio de cultura em que são cultivadas células de hibridoma é testado para determinar a produção de anticorpos monoclonais dirigidos contra o antígeno. Preferencialmente, a especificidade de ligação de anticorpos monoclonais produzidos por células de hibridoma é determinada através de imunoprecipitação ou de um ensaio de ligação *in vitro*, tais como radioimunoensaio (RIA) ou ensaio imunoenzimático (ELISA).

[0218] Após a identificação de células de hibridoma que produzem anticorpos da especificidade, afinidade e/ou atividade desejadas, os clones podem ser subclonados através da limitação de procedimentos de diluição e cultivados através de métodos padrão (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, págs.59-103 (Academic Press, 1986)). Meios de cultura apropriados para este propósito incluem, por exemplo, meio D-MEM ou RPMI-1640. Além disso, as células de hibridoma podem ser cultivadas *in vivo* na forma de tumores ascíticos em mamíferos.

[0219] Os anticorpos monoclonais secretados pelos subclones são apropriadamente separados do meio de cultura, líquido ascítico ou soro por meio de procedimentos convencionais de purificação de imunoglobulina, tais como, por exemplo, proteína A-Sefarose, cromatografia de hidroxilapatita, eletroforese em gel, diálise ou cromatografia por afinidade. É preferencialmente utilizado a cromatografia em Proteína A descrita no presente.

[0220] O DNA codificador dos anticorpos monoclonais da invenção é facilmente isolado e seqüenciado utilizando procedimentos convencionais (utilizando, por exemplo, sondas de oligonucleotídeos que sejam capazes de se

ligar, especificamente, a genes codificadores das cadeias pesada e leve de anticorpos monoclonais). As células de hibridoma servem de fonte preferida de tal DNA. Uma vez isolado, o DNA pode ser colocado em vetores de expressão, que são transfectados em seguida para células hospedeiras, tais como células de *E. coli*, células COS de símios, células de ovário de hamster chinês (CHO) ou células de mieloma que, de outra forma, não produzem proteína de imunoglobulina para obter a síntese de anticorpos monoclonais nas células hospedeiras recombinantes.

[0221] O DNA pode também ser modificado, por exemplo, pela substituição da sequência de codificação humana do domínio constante das cadeias leve e pesada pelas sequências murinas homólogas (publicação US 4.816.567; e Morrison *et al.*, 1984, *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 81:6851) ou por meio de ligação covalente da sequência codificadora de imunoglobulina, no todo ou em parte, com a sequência codificadora para um material não-imunoglobulina.

[0222] Tipicamente, tais polipeptídeos que não são imunoglobulina são substituídos pelos domínios constantes de um anticorpo, ou são substituídos pelos domínios variáveis de um sítio de combinação do antígeno de um anticorpo para criar um anticorpo bivalente quimérico que compreende um sítio de combinação ao antígeno que possui especificidade para um antígeno e outro sítio de combinação ao antígeno que possui especificidade para um antígeno diferente.

[0223] Em uma realização adicional, os anticorpos ou fragmentos de anticorpos podem ser isolados a partir de bibliotecas de fagos de anticorpos gerados através das técnicas descritas em McCafferty *et al.*, *Nature*, 348:552-554 (1990). Clackson *et al.*, *Nature*, 352:624-628 (1991), e Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991) descrevem o isolamento de anticorpos humanos e murinos, respectivamente, utilizando bibliotecas de fago. Publicações

subseqüentes descrevem a produção de alta afinidade (na faixa de nM) de anticorpos humanos através da combinação de cadeias (Marks *et al.*, *Bio/Technology*, 10:779-783 (1992)), bem como a infecção combinatória e recombinação *in vivo* como uma estratégia para a construção de bibliotecas de fago muito grandes (Waterhouse *et al.*, *Nuc. Acids. Res.*, 21:2265-2266 (1993)). Desta forma, ditas técnicas são alternativas viáveis para técnicas de hibridoma de anticorpo monoclonal tradicionais para o isolamento de anticorpos monoclonais.

ANTICORPOS HUMANOS E HUMANIZADOS

[0224] Um anticorpo humanizado contém um ou mais resíduos de aminoácidos introduzidos nele a partir de uma fonte que não é humana. Esses resíduos de aminoácidos não-humanos são muitas vezes denominados resíduos “importados”, que são tipicamente retirados de um domínio variável “importado”. A humanização pode ser essencialmente realizada seguindo-se o método de Winter e colaboradores (Jones *et al.*, *Nature*, 321:522-525 (1986); Riechmann *et al.*, *Nature*, 332:323-327 (1988); Verhoeyen *et al.*, *Science*, 239:1534-1536 (1988)), por meio de substituição de sequências CDR ou CDRs pelas sequências correspondentes de anticorpo humano. Conseqüentemente, tais anticorpos “humanizados” são anticorpos quiméricos (US 4.816.567), em que substancialmente menos de um domínio variável humano intacto tenha sido substituído pela sequência correspondente de uma espécie não-humana. Na prática, os anticorpos humanizados são tipicamente anticorpos humanos, em que alguns resíduos de CDR e, possivelmente, alguns resíduos de FR são substituídos por resíduos de sítios análogos em anticorpos de roedores.

[0225] A seleção de domínios variáveis humanos, tanto leves quanto pesados, a serem utilizados na fabricação dos anticorpos humanizados é muito importante para reduzir a antigenicidade. De acordo com o então chamado método de “melhor adequação”, a sequência do domínio variável de

um anticorpo de roedor é selecionada em comparação com toda a biblioteca de sequências de domínio variável humano conhecido. A sequência humana mais próxima da sequência do roedor é então aceita como a região de estrutura humana (FR) para o anticorpo humanizado (Sims *et al.*, *J. Immunol.*, 151:2296 (1993). Outro método utiliza uma região de estrutura específica derivada da sequência de consenso de todos os anticorpos humanos de um subgrupo específico de cadeias leve ou pesada. A mesma estrutura pode ser utilizada para vários anticorpos humanizados diferentes (Carter *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285 (1992); Presta *et al.*, *J. Immunol.*, 151:2623 (1993)).

[0226] É adicionalmente importante que os anticorpos sejam humanizados com retenção de alta afinidade para o antígeno e outras propriedades biológicas favoráveis. Para atingir este objetivo, de acordo com um método preferido, os anticorpos humanizados são preparados por meio de um processo de análise das sequências parentais e diversos produtos humanizados conceituais, utilizando modelos tridimensionais das sequências parentais e humanizadas. Modelos de imunoglobulina tridimensionais são comumente disponíveis e são familiares para os técnicos no assunto. Estão disponíveis programas de computador que ilustram e exibem prováveis estruturas de conformação tridimensional de possíveis sequências de imunoglobulina selecionadas. A inspeção dessas exposições permite a análise da provável função dos resíduos no funcionamento da possível sequência de imunoglobulina, isto é, a análise de resíduos que influenciam a capacidade da imunoglobulina candidata de se ligar ao seu antígeno. Desta forma, os resíduos FR podem ser selecionados e combinados a partir das sequências receptora e importada, de forma que seja atingida a característica de anticorpo desejada, tal como maior afinidade para o(s) antígeno(s) alvo(s). Geralmente, os resíduos CDR estão diretamente e mais substancialmente envolvidos na influência da ligação de antígenos.

[0227] Como uma alternativa, é agora possível produzir animais transgênicos (por exemplo, camundongos) que são capazes, mediante imunização, de produzir um repertório completo de anticorpos humanos na ausência da produção de imunoglobulina endógena. Descreveu-se, por exemplo, que a deleção homozigótica do gene da região de ligação de cadeia pesada de anticorpos (J_H) em camundongos quiméricos e mutantes de linhagem germinativa resulta na completa inibição da produção de anticorpos endógenos. A transferência do conjunto de genes de imunoglobulina da linhagem germinativa humana em tais linhagens germinativa resultará na produção de anticorpos humanos mediante desafio de antígenos. Vide, por exemplo, Jakobovits *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:2551 (1993); Jakobovits *et al.*, *Nature*, 362:255-258 (1993); Bruggermann *et al.*, *Year in Immuno.*, 7:33 (1993); e Duchosal *et al.*, *Nature* 355:258 (1992). Anticorpos humanos também podem ser derivados de bibliotecas de exibição por fago (Hoogenboom *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 227:381 (1991); Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.* 222:581-597 (1991); Vaughan *et al.*, *Nature Biotech* 14:309 (1996)).

FRAGMENTOS DE ANTICORPOS

[0228] Foram desenvolvidas diversas técnicas para a produção de fragmentos de anticorpos. Tradicionalmente, estes fragmentos foram derivados por meio da digestão proteolítica de anticorpos intactos (vide por exemplo, Morimoto *et al.*, *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 24:107-117 (1992); e Brennan *et al.*, *Science* 229:81 (1985)). Entretanto, esses fragmentos podem ser agora produzidos diretamente por células hospedeiras recombinantes. Os fragmentos de anticorpos podem ser isolados, por exemplo, a partir das bibliotecas de fagos de anticorpos discutidas acima. Alternativamente, fragmentos Fab'-SH podem ser recuperados diretamente de *E. coli* e acoplados quimicamente para formar fragmentos F(ab')₂ (Carter *et al.*, *Bio/Technology* 10:163-167 (1992)). De acordo com outra abordagem,

fragmentos F(ab')₂ podem ser isolados diretamente a partir da cultura de células hospedeiras recombinantes. Outras técnicas para a produção de fragmentos de anticorpos serão evidentes para os técnicos no assunto. Em outras realizações, o anticorpo selecionado é um fragmento Fv de cadeia única (scFv) (Vide o documento WO 93/16185).

ANTICORPOS MULTIESPECÍFICOS

[0229] Anticorpos multiespecíficos possuem especificidades de ligação para pelo menos dois antígenos diferentes. Apesar de ditas moléculas se ligar normalmente a apenas dois antígenos (tais como anticorpos biespecíficos, BsAbs), anticorpos com especificidades adicionais tais como anticorpos triespecíficos são englobados por esta expressão quando utilizados no presente.

[0230] Métodos para a produção de anticorpos biespecíficos são conhecidos no estado da técnica. A produção tradicional de anticorpos biespecíficos de comprimento total é baseada na co-expressão de dois pares de cadeia leve-cadeia pesada de imunoglobulina, em que as duas cadeias possuem especificidades diferentes (Millstein *et al.*, *Nature*, 305:537-539 (1983)). Devido a classificação aleatória de cadeias pesadas e leves de imunoglobulinas, ditos hibridomas (quadromas) produzem uma mistura potencial de 10 moléculas de anticorpo diferentes, das quais apenas uma possui a estrutura biespecífica correta. A purificação da molécula correta, que normalmente é realizada por cromatografia de afinidade, é inconveniente e produz rendimentos baixos. Procedimentos similares são descritos no documento WO 93/08829, e em Traunecker *et al.*, *EMBO J.*, 10:3655-3659 (1991).

[0231] De acordo com um aspecto descrito no documento W096/27011, a interface entre um par de moléculas de anticorpos pode ser elaborada para maximizar o percentual de heterodímeros que são recuperados da cultura de célula recombinante. A interface preferida compreende pelo menos

uma parte do domínio C_H3 de um anticorpo de domínio constante. Neste método, uma ou mais das cadeias laterais de aminoácidos pequenas da interface da primeira molécula de anticorpo são substituídas por cadeias laterais maiores (por exemplo, tirosina ou triptofano). “Cavidades” compensatórias de tamanho similar ou idêntico para cadeia(s) lateral(is) grande(s) são criadas na interface da segunda molécula de anticorpo através da substituição de cadeias laterais de aminoácidos grandes com cadeias menores (tal como alanina ou treonina). Esta realização fornece um mecanismo para o aumento no rendimento do heterodímero sobre outros produtos finais indesejados, tais como homodímeros.

[0232] Anticorpos biespecíficos incluem anticorpos “heteroconjugados” ou reticulados. Por exemplo, um dos anticorpos no heteroconjugado pode ser acoplado a avidina, e outro a biotina. Ditos anticorpos, por exemplo, foram propostos para dirigir células do sistema imune a células indesejadas (publicação US 4.676.980), e para o tratamento de infecção por HIV (WO 91/00360, WO 92/200373, e EP 03089). Anticorpos heteroconjugados podem ser fabricados através do uso de quaisquer métodos de reticulação convenientes. Agentes de reticulação apropriados são conhecidos no estado da técnica, e são descritos, por exemplo, na publicação US 4.676.980, dentre uma série de técnicas de reticulação.

[0233] Técnicas para a geração de anticorpos biespecíficos a partir de fragmentos de anticorpos também foram descritas na literatura. Anticorpos biespecíficos podem ser preparados, por exemplo, utilizando ligações químicas. Brennan et al., *Science*, 229:81 (1985) descrevem um procedimento em que anticorpos intactos são clivados proteoliticamente para gerar fragmentos F(ab')₂. Estes fragmentos são reduzidos na presença do agente complexante de ditiol arsenito de sódio para estabilizar ditióis vicinais e evitar a formação de dissulfeto intermolecular. Os fragmentos Fab' gerados são, então, convertidos em derivados de tionitrobenzoato (TNB). Um dos derivados de Fab'-TNB é então

reconvertido no Fab'-tiol por meio da redução com mercaptoetilamina e é misturado com uma quantidade eqüimolar do outro derivado de Fab'-TNB para formar o anticorpo biespecífico. Os anticorpos biespecíficos produzidos podem ser utilizados como agentes para a imobilização seletiva de enzimas.

[0234] Progressos recentes possibilitaram a recuperação direta dos fragmentos Fab'-SH de *E. coli*, que podem ser acoplados quimicamente para formar anticorpos biespecíficos. Shalaby *et al.*, *J. Exp. Med.*, 175: 217-225 (1992) descrevem a produção de uma molécula F(ab')₂ de anticorpo biespecífico totalmente humanizado. Cada fragmento Fab' foi secretado da *E. coli* separadamente e submetido ao acoplamento químico dirigido *in vitro* para formar o anticorpo biespecífico. O anticorpo biespecífico assim formado foi capaz de ligar-se a células que superexpressam o receptor ErbB2 e células T humanas normais, bem como iniciar a atividade lítica de linfócitos citotóxicos humanos contra alvos de tumor de mama humano.

[0235] Diversas técnicas de produção e isolamento de fragmentos de anticorpos biespecíficos diretamente a partir de cultura de células recombinante também foram descritas. Anticorpos biespecíficos foram produzidos, por exemplo, utilizando zíperes de leucina. Kostelny *et al.*, *J. Immunol.*, 148(5): 1547-1553 (1992). Os peptídeos de zíper de leucina das proteínas Fos e Jun foram ligados às porções Fab' de dois anticorpos diferentes por meio de fusão gênica. Os homodímeros de anticorpos foram reduzidos na região de articulação para formar monômeros e, em seguida, novamente oxidados para formar os heterodímeros de anticorpos. Este método pode também ser utilizado para a produção de homodímeros de anticorpos. A tecnologia de "diacorpo" descrita por Hollinger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 6444-6448 (1993) forneceu um mecanismo alternativo para a fabricação de fragmentos de anticorpos biespecíficos. Os fragmentos compreendem um domínio variável de cadeia pesada (V_H) conectado a um domínio variável de

cadeia leve (V_L) por um ligante que é curto demais para permitir o emparelhamento entre os dois domínios sobre a mesma cadeia. Conseqüentemente, os domínios V_H e V_L de um fragmento são forçados a emparelhar-se com os domínios V_L e V_H complementares de outro fragmento, de maneira a formar dois sítios de ligação de antígenos. Também foi relatada outra estratégia para a fabricação de fragmentos de anticorpos biespecíficos utilizando dímeros Fv de cadeia simples (sFv). Vide Gruber *et al.*, *J. Immunol.*, 152: 5368 (1994). Alternativamente, o anticorpo biespecífico pode ser “anticorpo linear” produzido conforme descrito em Zapata *et al.*, *Protein Eng.*, 8 (10): 1057-1062 (1995). Resumidamente, esses anticorpos incluem um par de segmentos Fd tandem ($V_H-C_{H1}-V_H-C_{H1}$), que, juntamente com os polipeptídeos da cadeia leve complementar, forma um par de regiões de ligação ao antígeno. Anticorpos lineares podem ser mono ou biespecíficos.

[0236] Anticorpos com mais de duas valências também são contemplados. Por exemplo, anticorpos triespecíficos podem ser preparados. Tutt *et al.*, *J. Immunol.* 147: 60 (1991).

IMUNOADESINAS

[0237] O projeto de imunoadesina mais simples e direto combina o(s) domínio(s) de ligação da adesina (por exemplo, o domínio extracelular (ECD) de um receptor), com as regiões de dobradiça e Fc de uma imunoglobulina de cadeia pesada. Ordinariamente, ao preparar as imunoadesinas da presente invenção, o ácido nucléico que codifica o domínio de ligação da adesina será fundido pelo C-terminal ao ácido nucléico que codifica o N-terminal de uma sequência do domínio constante da imunoglobulina, porém, fusões no N-terminal também são possíveis.

[0238] Tipicamente, em tais fusões o polipeptídeo quimérico codificado reterá pelo menos a região de articulação funcionalmente ativa, os domínios C_{H2} e C_{H3} da região constante de uma cadeia pesada de

imunoglobulina. As fusões são feitas também na extremidade C-terminal da fração Fc de um domínio constante, ou imediatamente no N-terminal ao C_{H1} da cadeia pesada ou à região correspondente da cadeia leve. O local preciso em que a fusão é feita não é crítico; os locais específicos são bem conhecidos e podem ser selecionados a fim de otimizar a atividade biológica, a secreção ou as características de ligação da imunoadesina.

[0239] Em um exemplo de realização preferido, a sequência do adesina é fundida ao N-terminal da região Fc da imunoglobulina G₁ (IgG₁). É possível fundir a região constante da cadeia pesada inteira à sequência da adesina. Entretanto, mais preferivelmente, uma sequência que começa na região de articulação apenas a montante do local de clivagem da papaína que define quimicamente a Fc do IgG (isto é, resíduo 216, ligado ao primeiro resíduo da região constante da cadeia pesada para a Ser 114), ou locais análogos de outras imunoglobulinas são usados na fusão. Em uma realização específica da presente invenção, a sequência de aminoácido da adesina é fundida a: (a) a região de articulação e o C_{H2} e o C_{H3} ou (b) domínios C_{H1}, região de articulação, C_{H2} e C_{H3}, de uma cadeia pesada de IgG.

[0240] Para imunoadesinas biespecíficas, as imunoadesinas são montadas como múltimeros, e particularmente como heterodímeros ou heterotetrâmeros. Geralmente, estas imunoglobulinas montadas terão unidades estruturais conhecidas. Uma unidade estrutural básica de quatro cadeias é a forma encontrada em IgG, IgD, e IgE. Uma unidade de quatro cadeias é repetida nas imunoglobulinas que possuem peso molecular mais elevado; a IgM existe geralmente como um pentâmero de quatro unidades básicas unidas por pontes dissulfeto. A globulina de IgA, e ocasionalmente a globulina IgG, pode também existir na forma multimérica no soro. No exemplo do múltímero, cada uma das quatro unidades pode ser a mesma ou diferentes.

[0241] Várias imunoadesinas montadas exemplarmente dentro do

escopo da presente invenção são diagramadas esquematicamente abaixo:

AC_L-AC_L ;

$AC_H-(AC_H, AC_L-AC_H, AC_L-V_HCH, \text{ ou } V_LC_L-AC_H)$;

$AC_L-AC_H-(AC_L-AC_H, AC_L-V_HCH, V_LC_L-AC_H, \text{ ou } V_LC_L-V_HCH)$

$AC_L-V_HCH-(AC_H, \text{ ou } AC_L-V_HCH, \text{ ou } V_LC_L-AC_H)$;

$V_LC_L-AC_H-(AC_L-V_HCH, \text{ ou } V_LC_L-AC_H)$; e

$(A-Y)_n-(V_LC_L-V_HCH)_2$,

em que, cada A representa sequências idênticas ou diferentes do aminoácido da adesina;

V_L é um domínio variável da cadeia leve da imunoglobulina;

V_H é um domínio variável da cadeia pesada da imunoglobulina;

C_L é um domínio constante da cadeia leve da imunoglobulina;

C_H é um domínio constante da cadeia pesada da imunoglobulina;

n é um inteiro maior que 1;

Y designa o resíduo de um agente reticulante covalente

[0242] Nos interesses da presente invenção, as estruturas apresentadas mostram somente as características chaves; elas não indicam junções (J) ou outros domínios de imunoglobulinas, nem exibem as pontes dissulfeto. Entretanto, quando esses domínios são necessários para a atividade de ligação, eles devem ser construídos de modo a estar presentes nos locais que normalmente ocupam nas moléculas de imunoglobulina.

[0243] Alternativamente, as sequências da adesina podem ser introduzidas entre a cadeia pesada da imunoglobulina e as sequências da cadeia leve, de modo que seja obtida uma imunoglobulina que compreende uma cadeia pesada quimérica. Nesta realização, as sequências da adesina são fundidas a extremidade 3' de uma cadeia pesada de imunoglobulina em cada braço de uma imunoglobulina, tanto entre a região de articulação e o domínio C_{H2} , quanto entre os domínios C_{H2} e C_{H3} . Construções similares foram divulgadas por

Hoogenboom *et al.*, *Mol. Immunol.*, 28:1027-1037 (1991).

[0244] Embora a presença de uma cadeia leve da imunoglobulina não fosse necessária nas imunoadesinas da presente invenção, uma cadeia leve de imunoglobulina pode estar presente tanto em associação covalente a um polipeptídeo da cadeia pesada da fusão adesina-imunoglobulina, quanto fundida diretamente à adesina. No caso anterior, o DNA que codifica a cadeia leve da imunoglobulina é tipicamente co-expresso com o DNA que codifica a proteína de cadeia de fusão de cadeia pesada adesina-imunoglobulina. Sobre a secreção, a cadeia pesada híbrida e a cadeia leve serão covalentemente associadas para fornecer uma estrutura parecida com a imunoglobulina que compreende duas cadeias pesadas de imunoglobulina ligadas por pontes dissulfeto. Os métodos apropriados para a preparação de tais estruturas são divulgados, por exemplo, na publicação US 4.816.567 emitida em 28 de março de 1989.

[0245] Imunoadesinas são mais convenientemente construídas pela fusão das sequências de cDNA que codificam a porção *in-frame* da adesina para uma sequência de cDNA da imunoglobulina. Entretanto, a fusão de fragmentos genômicos da imunoglobulina pode também ser usada (vide, por exemplo Aruffo *et al.*, *Cell*, 61:1303-1313 (1990); e Stamenkovic *et al.*, *Cell*, 66:1133-1144 (1991)). O último tipo de fusão requer a presença de sequências regulatórias de Ig para a expressão. Os cDNAs que codificam as regiões constantes da cadeia pesada de IgG podem ser isoladas baseadas em sequências publicadas das bibliotecas do cDNA derivadas do baço ou dos linfócitos do sangue periféricos, por hibridização ou pela técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR). Os cDNAs que codificam a “adesina” e as partes de imunoglobulina da imunoadesina são introduzidos no tandem em um vetor de plasmídeo que direciona a expressão eficiente nas células hospedeiras escolhidas.

[0246] Os exemplos a seguir são oferecidos apenas para fins

ilustrativos, e não se destinam, de forma alguma, a limitar o escopo da presente invenção.

[0247] Todas as publicações e referências bibliográficas citadas no presente relatório descritivo são incorporadas ao presente pela referência em sua totalidade.

EXEMPLOS

[0248] Reagentes comercialmente disponíveis referidos nos exemplos foram utilizados de acordo com as instruções do fabricante, salvo quando indicado ao contrário. A fonte das células identificadas nos exemplos a seguir, e em todo o relatório descritivo, pelos números de acesso ATCC é da *American Type Culture Collection*, Manassas, Virgínia.

EXEMPLO 1

DESCRIÇÃO DOS MATERIAIS E MÉTODOS

[0249] Os seguintes materiais e métodos foram utilizados nos Exemplos 2-8, a seguir.

MATERIAIS

[0250] Materiais e dispositivos utilizados nas experiências descritas nos exemplos experimentais incluem: frascos de aço inoxidável (mini-tanques, *Flow Components*, Dublin, CA; curtos (50 cc) e profundos (cc 55)); tubo de diálise (Spectra/Por, 6 -8000 MWCO, cat. #132645), filtro de 0,22 µm (Millipore Millipak Gamma Gold Cat. # MPGL04GH2); fosfato salina (PBS, EMD, cat. #6506), ácido etilenodiaminotetracético (EDTA, Sigma, cat. # E4884); α -nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH, Calbiochem, cat. # 481973); deidroepiandrosterona (DHEA, TCI, cat. # D0044); sulfato cúprico (Sigma, cat. # C8027), glicose-6-fosfato (G6P, Calbiochem, cat. # 346764); aurotioglicose (ATG, USP, cat. # 1045508); aurotiomalato (ATM, Alfa Aesar, cat. # 39740); glutationa reduzida (GSH, JT Baker, cat. # M770-01); monobromobimano (MBB, Fluka, cat. # 69898); histidina (JT Baker, cat. # 2080-05), sulfato de sódio (JT

Baker, cat. # 3897-05); Trx (Sigma, cat. # T8690); TrxR (Sigma, cat. # T9698). Todos os produtos químicos e reagentes foram usados da forma como recebidos, sem purificação adicional. As soluções de estoque de EDTA (250 mM, pH 7,5), CuSO₄ (10 mM), ATG (30 mM), ATM (30 mM), NADPH (75 mM), G6P (300 mM) foram preparadas para serem utilizadas durante os estudos no mini-tanque.

PRODUÇÃO DO FLUIDO DE CULTURA CELULAR (CCF)

[0251] A fim de gerar CCF ocrelizumab para diversos estudos de redução, um processo de fermentação representativo em pequena escala foi utilizado de maneira semelhante aos métodos descritos anteriormente (Chaderjian *et al.*, 2005). Resumidamente, biorreatores com tanques de agitação de vidro de 3 litros Applikon® equipado com rotores com pás inclinadas foram utilizadas para a série de inóculo e a produção de cultura com os componentes do meio ocrelizumab. Os biorreatores foram equipados com sondas de oxigênio dissolvido calibrado (OD), de pH e temperatura. As taxas de DO, pH, temperatura e agitação foram controladas utilizando unidades de controle digital para os parâmetros definidos do processo de fabricação do ocrelizumab. O volume de trabalho, tanto para a série de inóculo quanto para a produção de cultura foi de 1,5 L. As amostras foram analisadas diariamente em um analisador de gases “NOVA Bioprofile blood gas analyzer” para garantir a precisão das do valor em execução de pH e oxigênio dissolvido, bem como controlar as concentrações de glicose, lactato, amônio, glutamina, glutamato e sódio nas culturas. Diariamente as amostras também foram coletadas para controlar o crescimento celular, viabilidade e título. O crescimento celular foi medido tanto pela contagem de células viáveis através de um sistema ViCell, bem como com base em um volume globular (VG). A viabilidade da cultura foi determinada pela exclusão do corante azul tripan em um instrumento ViCell. O sobrenadante das amostras foram analisados por um método baseado em HPLC para mensurar os valores

de titulação do ocrelizumab.

PREPARAÇÃO DO FLUIDO DE CULTURA CELULAR COLETADO (HCCF)

[0252] A Lise completa do CCF foi alcançada pela homogeneização em alta pressão com um homogeneizador microfluídico HC-8000. O regulador de pressão do instrumento foi ajustado para 4000-8000 psi, e o CCF foi obtido através do homogeneizador para se obter a lise celular completa (ruptura da membrana), após uma única passagem. O homogenato de CCF foi coletado uma vez e a água foi removida através do sistema. O homogenato foi transferido para frascos de centrifugação e foram centrifugados em um rotor de centrifugação "Sorval RC-3B" a 4.500 rpm durante 30 minutos a 20 °C. O concentrado foi decantado e então filtrado seguido pela filtração estéril em filtro de 0,22 µm, usando uma bomba peristáltica com tubo de silicone para gerar o HCCF final a partir do CCF homogeneizado (100% de lise celular). Alternativamente, o CCF foi centrifugado diretamente a partir do fermentador sem a homogeneização e, em seguida, o concentrado foi filtrado com um filtro de estéril de 0,22 µm para gerar o HCCF.

MANIPULAÇÃO DO MINI-TANQUE

[0253] Uma capela de fluxo laminar foi utilizada no tratamento de todos os mini-tanques e todos os materiais utilizados nos experimentos de incubação do HCCF foram autoclavados ou lavados utilizando isopropanol 70% para minimizar a contaminação bacteriana.

ENSAIO DA LACTATO DESIDROGENASE

[0254] Para o ensaio da lactato desidrogenase, consulte Babson & Babson (1973) e Legrand *et al.*, (1992), que são incorporados ao presente pela referência.

EXPERIMENTO DE DIÁLISE

[0255] Um experimento de diálise foi realizado a fim de determinar se os componentes causando redução do ocrelizumab foram pequenas

moléculas ou macromoléculas (enzimas por exemplo). Uma amostra de 3 ml de ocrelizumab purificado e formulado (30,2 mg/mL) foi dialisada contra 1 L de solução salina tamponada com fosfato (PBS, 10 mM pH 7,2) por 24 horas e o PBS foi alterado depois de 8 horas. A concentração da amostra de ocrelizumab foi então ajustada para 1 mg/mL utilizando uma absorbância de 280 nm. Alíquotas foram armazenadas a -70 °C antes do uso. O tubo de diálise foi hidratado durante a noite em uma solução de azida 0,05% e lavado com água estéril antes do uso. O HCCF obtido a partir da homogeneização do CCF de um fermentador de 3-L foi descongelado e filtrado através de um filtro de 0,22 µm Millipak usando uma bomba peristáltica. Seis mini-tanques curtos foram preenchidos com 30 mL de HCCF cada. Para cada mini-tanque, 500 µL de amostra de ocrelizumab em tubos de diálise selado foi adicionado. Os mini-tanques foram fechados e carregados em um misturador de bancada (Barnstead Lab-Line MAX Q 4000) operando a 35 rpm em temperatura ambiente. Para cada ponto de tempo, um mini-tanque foi removido do misturador, e as alíquotas do HCCF (no mini-tanque) e amostra de ocrelizumab (na bolsa de diálise), que foram armazenadas a -70 °C foram analisadas com o ensaio de tiol livre e o ensaio por Bioanalisador (descrito abaixo).

TESTE DE INIBIDORES PARA A REDUÇÃO EM UM SISTEMA IN-VITRO EM PEQUENA

ESCALA

[0256] Um mini-tanque alto foi preenchido com 27 mL de HCCF. Dependendo do desenho experimental, diversos reagentes (NADPH, G6P, inibidores da G6PD ou TrxR) foram adicionados na concentração desejada, e o volume final do mini-tanque foi completo para 30 mL com PBS (10 mM pH 7,2). Os mini-tanques foram fechados e carregados em um misturador de bancada a 35 rpm e em temperatura ambiente. Em cada ponto de tempo de amostragem, os exteriores dos mini-tanques foram esterilizados com IPA 70% e abertos em uma capela de fluxo laminar para a remoção de uma alíquota. Os mini-tanques

foram então re-lacrados e carregados de volta para o misturador de bancada. Todas as alíquotas foram armazenadas a -70 °C até serem analisadas com o ensaio de tiol livre e o ensaio por Bioanalisador (descrito abaixo).

ESTUDOS *IN VITRO* DE TRX/TRXR REDUTASE

[0257] Uma solução de TrxR comercial (fígado de rato) (4 µM) foi diluída com água para produzir uma solução de 2,86 mM. Trx liofilizado (humana) foi reconstituído com PBS (10 mM, pH 7,2) gerando uma solução de 500 mM. Uma solução de NADPH 20 mM e ATG 10 mM e soluções de ATM foram preparadas em água.

[0258] Em um tubo de microcentrífuga de polipropileno escuro de 1,5 mL, 437 µL de PBS, 25 µL de NADPH, 16 µL de solução ocrelizumab formulada (30,2 mg/mL) e 5 µL de Trx foram gentilmente misturados. A reação foi iniciada pela adição de 17,5 µL de TrxR. A reação foi incubada em temperatura ambiente por 24 horas. Alíquotas de 20 µL foram coletadas em cada ponto de tempo da amostragem e armazenadas a -70 °C até serem analisadas pelo ensaio por Bioanalisador (vide abaixo). Os controles foram realizados para determinar se a via enzimática estava ativa quando uma enzima foi omitida pela substituição de um volume igual de PBS para ambos Trx e/ou TrxR na mistura da reação.

[0259] Inibição do sistema Trx foi demonstrada utilizando as mesmas condições de reação descritas acima, com a adição de 5 µL de ATG ou ATM. Para demonstrar a inibição do sistema Trx por Cu²⁺, 2,5 µL de CuSO₄ (10 mM) foi adicionado à mistura de reação, utilizando as mesmas enzimas, mas um tampão diferente (histidina 10 mM, Na₂SO₄ 10 mM, NaCl 137 mM, KCl 2,5 mM, pH 7,0) para evitar a formação de Cu³(PO₄)₂ insolúvel.

ENSAIO DE TIOL LIVRE

[0260] Uma curva padrão utilizando GSH foi gerada em PBS (10 mM, pH 6,0 ± 0,05). A partir de uma solução de GSH 110 mM, os padrões foram

preparados nas concentrações de 0, 5,5, 11, 22, 44, 55, 110 e 550 mM através de diluição seriada. De uma solução estoque de acetonitrila de mBB (10 mM armazenadas a -20 °C), uma solução de mBB 100 mM foi preparada em PBS (10 mM, pH 10,0 ± 0,05) e armazenados longe da luz.

[0261] Em uma placa de 96 poços de fundo preto, 100 µL de mBB foi dispensado em cada poço. Para a curva padrão, 10 µL de solução GSH padrão foi adicionado rendendo um pH de trabalho de 8,0 ± 0,2. Para as amostras, 10 µL de amostra foi adicionado aos poços. Todos os poços foram preparados em triplicata. A placa foi incubada em temperatura ambiente por 1 hora no escuro, em seguida, foi realizada a leitura usando um leitor de placas de fluorescência (*Molecular Devices SpectraMax® Gemini XS*) com um comprimento de onda de excitação de 390 nm e um comprimento de onda de emissão de 490 nm. Uma curva padrão linear foi gerada utilizando a média dos resultados de três poços plotados em função da concentração de GSH padrão. Níveis de tiol em amostras foram calculados a partir da equação linear da curva padrão, utilizando o valor médio dos três poços da amostra.

ENSAIO POR BIOANALISADOR

[0262] Medições de eletroforese capilar foram adquiridas pelo bioanalizador *Agilent 2100*. A preparação das amostras foi realizada conforme descrito no protocolo de ensaio "*Protein 230 Assay Protocol*" (número do manual G2938-90052) com pequenas alterações. As amostras de HCCF foram diluídas 1:4 e as amostras de proteína A foram diluídas a 1,0 g/L com água antes da preparação. Para amostras HCCF na etapa de desnaturação, 24 µL de iodoacetamida 50 mM (IAM), 0,5% de solução de SDS foi adicionado, além de 2 µL de solução de desnaturação fornecida. Para as amostras de proteína A, foi utilizado 0,5% de SDS sem IAM e 2 µL de solução de desnaturação. Imagens digitais similares a gel foram geradas usando o programa de computador "*Agilent 2100 software Expert*".

SOLUÇÕES DE ESTOQUE PARA ESTUDOS DE TEMPO DE ESTOCAGEM COM HCCF

[0263] Três soluções estoque separadas foram usadas na escala de laboratório HCCF realizar estudos de tempo de estocagem: (1) 250 mM de solução de EDTA (pH 7,4) preparada com EDTA dissódico di-hidratado (Mallinckrodt, cat. # 7727-06 ou Sigma, cat. # E -5134 tetrasódio hidratado) e EDTA (Sigma, cat. # E-6511), (2) 50 mM de solução de sulfato cúprico pentahidratado (CuSO_4 , Sigma, cat. # C-8027), e (3) 1 M de solução de ácido acético (Mallinckrodt, cat. # V193).

ADIÇÕES DE INIBIDORES E MISTURA DA FLUIDO DE CULTURA CELULAR (CCF)

[0264] Uma solução estoque de 250 mM de EDTA, 50 mM de CuSO_4 foi adicionada ao CCF antes da homogeneização para avaliar uma série de concentrações finais para evitar redução de dissulfeto dos anticorpos. Uma vez que o HCCF final foi gerado a partir do CCF homogeneizado, estas soluções foram, então, misturadas com o HCCF gerado a partir do CCF não homogeneizado (também contendo EDTA ou CuSO_4), a fim de diluir e diminuir o nível total da lise celular, abaixo dos 100% máximos. Alternativamente, uma solução estoque de ácido acético 1 M foi adicionado a uma solução final do HCCF misturado (CCF homogeneizado e CCF não homogeneizado) para diminuir o pH da solução e evitar a redução de dissulfeto dos anticorpos.

[0265] Aproximadamente 30 - 50 ml de cada solução HCCF (contendo EDTA, CuSO_4 , ácido acético, ou sem adição para o controle) foi mantida em um frasco de 50 ml de aço inoxidável 316L. O frasco foi fechado com uma braçadeira, e a solução não foi ventilada ou agitada. O frasco foi armazenado à temperatura ambiente (18 - 22 °C). Em pontos de tempo pré-determinados, a solução foi removida e purificada sob uma resina de afinidade à Proteína A em escala laboratorial.

[0266] Resultados semelhantes podem ser obtidos com outros agentes oxidantes, como, por exemplo, cistina e glutatona oxidada.

DIFUSÃO DE AR

[0267] Para avaliar a difusão de ar do HCCF gerado a partir do CCF homogeneizado para evitar a redução de dissulfeto dos anticorpos, recipientes de vidro de 3 L ou de aço inoxidável de 15L foram utilizados. Cerca de 1-5 L de HCCF foi filtrado através de um filtro estéril de 0,22 µm para cada recipiente esterilizado. Condições experimentais foram mantidas a 18-22 °C e agitação de 50 rpm (fermentador de 15 L) ou 275 rpm (fermentador de 3 L), com ou sem controle de pH através da adição de dióxido de carbono. As soluções foram ou injetadas tanto com ar para aumentar o nível de saturação oxigênio dissolvido do ar quanto com nitrogênio (controle) para remover todo o oxigênio dissolvido na solução. Fluxo de gás para cada recipiente era variável dependendo se uma taxa de aeração constante foi utilizada ou se um nível mínimo de oxigênio dissolvido foi mantido. Em pontos de tempo pré-determinados, 25-50 mL foram retirados das amostras de ambos os recipientes e purificada sob uma resina de afinidade à Proteína A em escala laboratorial antes da análise.

PROCESSAMENTO DA PROTEÍNA A

[0268] Anticorpos em amostras de fluido de cultura celular coletado podem ser capturados e tratados com uma resina específica de cromatografia por afinidade. A resina de Proteína A (Millipore, Prosep-VA High Capacity) foi selecionada como a resina de afinidade para purificação de anticorpos. A resina foi embalada em uma coluna de vidro, com 0,66 centímetros de diâmetro interior (Omnifit ®) com um leito de de 14 centímetros de altura, resultando em uma coluna de 4,8 mL de volume final. A cromatografia foi realizada utilizando um sistema de cromatografia *AKTA Explorer 100* (GE Healthcare).

[0269] A resina foi exposta a tampões e HCCF a uma velocidade de fluxo linear entre 350-560 cm/hr. A resina foi equilibrada, com Tris 25 mM, NaCl 25 mM, 5 mM EDTA, pH 7,1. Para cada purificação, a resina foi carregada entre 5-15 mg de anticorpo por ml de resina. A concentração de

anticorpos no HCCF foi determinada usando uma coluna de HPLC de proteína A imobilizada (Applied Biosystems, POROS A). Após o carregamento, a resina foi lavada com Tris 25 mM, NaCl 25 mM, EDTA 5 mM, TMAC 0,5 M, em pH 7,1, e em seguida o anticorpo foi eluído com ácido acético 0,1 M, pH 2,9. O conjunto de eluição foi baseado na absorvância em UV a 280 nm mensurado em linha após a coluna. Os conjuntos de eluição (*pools*) purificados tiveram o pH ajustado usando 1 M de HEPES sódico para pH 5,0-5,5. Após a regeneração da resina com 0,1 M de ácido fosfórico, as mesmas resinas ou resinas embaladas similares foram usadas para a purificação subsequente de outras soluções HCCF.

[0270] A concentração de anticorpos no conjunto purificado em proteína A foi mensurado utilizando a espectrometria em UV a 280 nm. Os conjuntos de eluição purificados em proteína A foram analisados pelo ensaio com o Bioalisador para quantificar a porcentagem de anticorpos intactos com peso molecular de 150 kDa.

EXEMPLO 2

EXPERIMENTO DE DIÁLISE

[0271] Um experimento de diálise foi concebido e realizado para determinar se a redução do ocrelizumab foi causado pela redução de pequenas moléculas ou macromoléculas (por exemplo, enzimas). Neste experimento de diálise, o ocrelizumab purificado intacto foi colocado em uma bolsa de diálise com um valor de corte (*cut off*) de peso molecular (MWCO) de 7000 e a bolsa de diálise incubada em HCCF contendo ocrelizumab em um mini-tanque de aço inoxidável. Como exibido nas Figuras 1 e 2, o ocrelizumab no interior da bolsa não foi reduzido após o período de incubação (Figura 1), enquanto que o ocrelizumab fora da bolsa no HCCF foi significativamente reduzido logo após o início da incubação.

[0272] A medição de livre tiol mostrou que não estavam presentes

tióis livres dentro da bolsa de diálise no início da incubação, entretanto, os níveis de tióis livres dentro e fora da bolsa de diálise tornaram-se comparáveis em menos de cinco horas após o início da incubação, indicando que os componentes de moléculas pequenas no HCCF estão totalmente equilibradas dentro e fora da bolsa de diálise (Figura 3). Uma vez que a redução foi observada somente no exterior, mas não dentro da bolsa de diálise com um MWCO de 7000 Da, o peso molecular da(s) molécula(s) reduzidas deve(m) ser maior(es) que 7000 Da. Portanto, uma reação enzimática é responsável pela redução do ocrelizumab.

EXEMPLO 3

REDUÇÃO DO OCRELIZUMAB (RHUMAB 2H7, VARIANTE A) POR TRX/TRXR *IN VITRO*

[0273] O sistema Trx foi testado para sua capacidade de reduzir o ocrelizumab, *in vitro*, incubando o ocrelizumab intacto com Trx, TrxR e NADPH. Os resultados do Bioanalizador indicam que o ocrelizumab foi reduzido *in vitro* pelo sistema Trx (Figura 5). A taxa de redução neste sistema *in vitro* parece ser mais lenta do que no HCCF (por exemplo, quando comparado com a redução exibida na Figura 2). Isto é provavelmente devido à menor concentração de enzimas (Trx e Trx-R) e/ou o sistema tampão utilizado na reação *in vitro*, pois a taxa de reação do sistema Trx é dependente tanto da concentração de enzimas quanto do sistema tampão.

EXEMPLO 4

INIBIDORES DO SISTEMAS TRX

(I) INIBIÇÃO DA REDUÇÃO DE ANTICORPO RECOMBINANTE POR SULFATO CÚPRICO

[0274] Sulfato cúprico é conhecido pela sua capacidade de fornecer potencial redox oxidante e tem sido utilizado nos processos de cultura de células para minimizar os níveis de tiol livre (isto é, minimizar cisteína não pareadas) de moléculas de anticorpos recombinantes (Chaderjian *et al.* 2005, *supra*). O sulfato cúprico foi testado para a eficácia no sistema de inibição Trx *in vitro* e subsequente redução do ocrelizumab.

Neste experimento de redução *in vitro*, o sistema tampão foi modificado de PBS para sulfato de histidina para evitar a formação de $\text{Cu}^3(\text{PO}_4)_2$ insolúvel. A Figura 8 mostra que o ocrelizumab foi rapidamente reduzido pelo sistema Trx em tampão sulfato de histidina (ainda mais rápido do que em tampão PBS). A adição do CuSO_4 a esta reação inibe claramente a redução do ocrelizumab (Figura 9).

(II) INIBIÇÃO DA REDUÇÃO DO ANTICORPO RECOMBINANTE EM HCCF POR ATG E

ATM

[0275]Dois inibidores específicos comercialmente disponíveis da TrxR, aurotioglicose (ATG) e aurotiomalato (ATM), foram testados quanto à sua capacidade de inibir o sistema Trx *in vitro* e reduzir o ocrelizumab. Ambos ATG e ATM podem efetivamente inibir a redução do ocrelizumab no ensaio descrito acima (vide figuras 6 e 7). A adição de aurotioglicose ou aurotiomalato, na concentração de 1 mM para a mistura da reação, conforme descrito na legenda da Figura 5, inibiu de maneira efetiva a redução do ocrelizumab, como exibido na imagem digital similar a gel a partir da análise obtida pelo Bioanalisador.

[0276]Se o sistema Trx estava ativo no HCCF e o ocrelizumab reduzido, como observado no processo de fabricação, resultando em moléculas de anticorpos reduzidas ou nas experiências em escala laboratorial, ambos compostos de ouro (ATG e ATM) devem ser capazes de inibir a redução do ocrelizumab no HCCF. A Figura 10 mostra que o ocrelizumab foi rapidamente reduzido em HCCF do CCF homogeneizado gerado a partir de um fermentador de 3L, após um período de incubação. No entanto, a redução do ocrelizumab foi completamente inibida quando foi adicionado 1 mM tanto de ATG quanto ATM no HCCF (Figuras 11 e 12). Estes resultados demonstram que o sistema Trx está ativa no HCCF e é diretamente responsável pela redução do ocrelizumab.

EXEMPLO 5**A FONTE DE NADPH PARA A ATIVIDADE DO SISTEMA TRX E AS FUNÇÕES DO G6P****E GLICOSE NO MECANISMO DE REDUÇÃO**

[0277] A redução de dissulfetos pelo sistema Trx exige a redução equivalente da NADPH (Figura 4). A principal via metabólica celular que fornece NADPH para todas as reações de biossíntese redutora é a via da pentose fosfato. Para ocorrer o evento de redução de anticorpos, as enzimas nesta via devem estar ainda ativas no HCCF, a fim de manter o sistema Trx ativo. No mínimo, a primeira etapa da via da pentose fosfato (catalisada pela G6PD) deve estar ativa para reduzir NADP^+ em NADPH durante a conversão G6P a 6-fosfogluconolactona. Além disso, a G6P é mais provavelmente produzida a partir da glicose e adenosina 5'-trifosfato (ATP) pela atividade da hexoquinase no HCCF. O mecanismo completo de redução do ocrelizumab está resumido na Figura 4.

[0278] A atividade de redução no HCCF parece ser transitória, em alguns casos e pode ser inibida ao longo do tempo sob determinadas condições de conservação ou após vários ciclos de congelamento/descongelamento. O HCCF que perdeu totalmente a atividade de redução proporcionou a oportunidade de explorar o papel da NADPH e G6P na redução do ocrelizumab pelo sistema Trx.

[0279] Um HCCF a partir de uma das corridas de produção de larga escala (a corrida "beta"), foi submetida a vários ciclos de congelamento/descongelamento e utilizada em um experimento destinado a mensuração da redução; não foi observada redução do ocrelizumab (Figura 13) apesar da sua capacidade de realizar a redução de anticorpos, tal como visto anteriormente no HCCF recém-descongelado desta mesma fermentação. O NADPH foi adicionado a este HCCF não-redutor na concentração de 5 mM e o evento de redução retornou (Figura 14). Portanto, o sistema Trx ainda está

intacto e ativo no HCCF onde a redução não ocorre mais, e é capaz de reduzir a proteína e/ou anticorpos se fornecido juntamente com co-fatores. Além disso, a atividade de redução foi perdida ao longo do tempo pelo fato de que a fonte de NADPH foi sendo depletada (provavelmente devido à oxidação do NADPH por todas as reações redutoras que competem pelo NADPH), e não pelo fato do sistema Trx ter sido degradado ou inativado.

[0280] Essa constatação foi feita por outro experimento. G6P a 10 mM foi adicionado a um HCCF que foi repetidamente congelado e descongelado a partir da corrida beta. Esta adição de G6P reativou o sistema Trx que subsequente reduziu o ocrelizumab no experimento de incubação do HCCF (Figura 15). Isto demonstrou que a redução do ocrelizumab no HCCF foi causada pelas atividades, tanto do sistema Trx quanto do G6PD. Além disso, a G6PD ainda está ativa em um HCCF que foi repetidamente submetido ao congelamento/descongelamento a partir de uma corrida beta; a perda da atividade de redução deste HCCF submetida repetidamente ao congelamento/descongelamento a partir da corrida beta parece ser devido ao esgotamento de G6P, que desse modo, eliminou a conversão de NADP⁺ em NADPH.

[0281] Em nossos estudos, observamos que o EDTA pode inibir efetivamente a redução do ocrelizumab no experimento de incubação em HCCF. Como mostra a Figura 16, o ocrelizumab foi reduzido após a incubação em HCCF a partir de uma corrida de produção de ocrelizumab em uma escala de 12.000 L (sem ser repetidamente submetida ao congelamento/descongelamento e sem a perda da atividade de redução), em temperatura ambiente por mais de 19 horas. Entretanto, a redução foi completamente inibida quando 20 mM de EDTA foi adicionado ao HCCF 12 kL e mantido em um mini-tanque de aço inoxidável separado (Figura 17). Na primeira etapa da glicólise, a hexoquinase catalisa a transferência do grupo fosfato do Mg²⁺-ATP para a glicose, uma reação

que requer a complexação do Mg^{2+} com o ATP (Hammes & Kochavi, 1962a e 1962b, *supra*). Uma vez que o EDTA é um quelante de íons metálicos, especialmente para Mg^{2+} , ele pode ser um inibidor eficaz da hexoquinase. A observação de que uma quantidade excessiva de EDTA pode bloquear eficazmente a redução indica o envolvimento da hexoquinase (ou seja, fornecendo G6P) no mecanismo de redução do ocrelizumab. Sem se vincular a esta ou qualquer outra teoria, o EDTA impede a redução do ocrelizumab, eliminando a atividade da hexoquinase e reduzindo assim o nível G6P disponível para G6PD e, subseqüentemente, o nível de NADPH disponível para o sistema Trx.

[0282] Embora o EDTA seja eficaz no bloqueio da redução do ocrelizumab no HCCF fresco, ele foi incapaz de evitar a redução do ocrelizumab no HCCF da corrida beta em que a atividade do sistema Trx foi perdida, e em seguida reativada pela adição de G6P. Por exemplo, a redução do ocrelizumab foi observada em um experimento de incubação em HCCF em que 5 mM de G6P e 20 mM de EDTA (concentração final) foram adicionados na corrida beta em HCCF que havia perdido totalmente a atividade de redução (Figura 18). No entanto, nenhuma redução foi observada no experimento de incubação controle no qual não foram adicionados G6P e EDTA. Sem estar ligado a esta, ou qualquer outra teoria, o EDTA utilizado desta forma não pode, portanto, inibir o sistema Trx nem o G6PD, e pode funcionar como um inibidor da hexoquinase, que produz a G6P para a G6PD. Sem G6P, o sistema Trx não seria fornecido com a enzima NADPH necessária para a atividade.

EXEMPLO 6

INIBIÇÃO DA REDUÇÃO DE ANTICORPO RECOMBINANTE POR DHEA

[0283] A dehidroepiandrosterona (DHEA), bem como outros inibidores da G6PD semelhantes, bloqueia efetivamente a atividade da G6PD (Gordon *et al.* 1995, *supra*). Os inibidores da G6PD também previnem a redução

de um anticorpo em HCCF, por exemplo, o ocrelizumab, ao bloquear a produção de NADPH. A capacidade da DHEA em inibir a redução do ocrelizumab é demonstrada em um experimento de incubação em HCCF. A adição de DHEA no HCCF impede uma redução de anticorpos.

[0284] A DHEA é normalmente utilizada na faixa de concentração de aproximadamente 0,05 mM a cerca de 5 mM. A DHEA também é tipicamente utilizada na faixa de concentração de aproximadamente 0,1 mM a cerca de 2,5 mM.

EXEMPLO 7

INIBIÇÃO DA REDUÇÃO DE ANTICORPO RECOMBINANTE PELA ADIÇÃO DE (I) EDTA,

(II) SULFATO CÚPRICO , E (III) ÁCIDO ACÉTICO

[0285] Quatro HCCFs diferentes foram armazenadas e mantidas em frascos de aço inoxidável. As soluções foram similares quanto a quantidade de lisado celular, que foram geradas pela diluição do HCCF a partir do CCF homogeneizado com HCCF de CCF não-homogeneizado. Por exemplo, 150 mL da primeira solução de lisado foram misturadas com 50 mL da segunda solução, respectivamente. As quatro misturas de HCCF avaliadas neste estudo continham: (1) 20 mM de EDTA, (2) 30 mM de CuSO_4 , (3) 15 mM de ácido acético (pH 5,5) e (4) nenhum inibidor químico foi adicionado para a solução controle. O anticorpo ocrelizumab de todas as quatro misturas foi purificado imediatamente ($t = 0$ h), utilizando cromatografia por proteína A e novamente após 20 horas e 40 horas de armazenagem em tubos de aço inoxidável. Os conjuntos de eluição de proteína purificada foram analisados pelo ensaio por Bioanalizador para quantificar a porcentagem de anticorpos intactos (150 kDa). Os resultados mostraram que mais de 90% de anticorpos intactos estavam presentes em todas as quatro misturas no ponto de tempo inicial (Figura 19). No entanto, no ponto de tempo 20 h, o anticorpo intato não foi detectado na mistura controle (sem qualquer adição), indicando a redução das pontes dissulfeto dos anticorpos. Nos três outros casos, mais de 90% de anticorpos intactos ainda

foram detectados tanto no tempo 20 hr quanto no tempo 40 hr, demonstrando a prevenção da redução das pontes dissulfeto em todos os três inibidores testados.

EXEMPLO 8

INIBIÇÃO DA REDUÇÃO DE ANTICORPO RECOMBINANTE PELA DIFUSÃO DE AR NO

HCCF

[0286] Uma mistura de HCCF gerado a partir do CCF homogeneizado foi armazenada e mantida em dois fermentadores de aço inoxidável de 10 L separados. Um recipiente foi difundido com ar, enquanto o outro recipiente foi difundido com gás nitrogênio. O anticorpo ocrelizumab foi purificado imediatamente ($t = 0$ h) a partir da mistura inicial, utilizando cromatografia em proteína A. Nos pontos de tempo selecionados, 50 mL foram retiradas das amostras de cada recipiente e o anticorpo foi purificado utilizando cromatografia em proteína A. Os conjuntos de eluição purificados foram então analisados pelo Bioanalisador para quantificar a porcentagem de anticorpos intactos de 150 kDa. Os resultados mostraram que cerca de 85% de anticorpos intactos estavam presentes na solução inicial (Figura 20), indicando uma certa redução precoce das pontes dissulfeto dos anticorpos antes da exposição ao oxigênio (ou seja, pulverização de ar no fermentador). Uma vez que a mistura foi injetada com de ar por duas horas, mais de 90% de anticorpos intactos foram mensurados para as 36 hrs restante do estudo. Em contraste, quando a mistura foi difundida com gás nitrogênio, o evento de redução de anticorpos continuou conforme mensurado em 2 h (28% pico de 150 kDa) e 6 h (5% pico de 150 kDa). Estes resultados demonstram a prevenção da redução de pontes dissulfeto no anticorpo quando a mistura de HCCF gerado a partir de CCF homogeneizado foi exposto ao oxigênio.

EXEMPLO 9

PROJETO DE siRNA DIRECIONADO OU NUCLEOTÍDEO ANTISENSE INIBIDOR DE TRX

[0287] O projeto de siRNAs direcionados ou nucleotídeos antisense

para os genes como encontrado em células CHO podem ser realizados usando sequências publicamente disponíveis, tais como da tioredoxina TrxA da *E. coli* (SEQ ID NO: 30), tioredoxina redutase TrxB da *E. coli* (SEQ ID NO: 31); tioredoxina 1 de rato (SEQ ID NO: 32), tioredoxina 2 de camundongo (SEQ ID NO: 33), tioredoxina redutase 1 de camundongo (SEQ ID NO: 34) e tioredoxina redutase 2 de camundongo (SEQ ID NO: 35). Os técnicos hábeis no assunto podem usar estas sequências para selecionar sequências para projetar inibidores da Trx para o direcionamento de enzimas em diferentes organismos e/ou células, tal como células CHO.

[0288] A sequência da Tioredoxina TrxA da *E. coli* é:

ATG TTA CAC CAA CAA CGA AAC CAA CAC GCC AGG CTT ATT
 CCT GTG GAG TTA TAT ATG AGC GAT AAA ATT ATT CAC CTG ACT GAC
 GAC AGT TTT GAC ACG GAT GTA CTC AAA GCG GAC GGG GCG ATC CTC
 GTC GAT TTC TGG GCA GAG TGG TGC GGT CCG TGC AAA ATG ATC GCC
 CCG ATT CTG GAT GAA ATC GCT GAC GAA TAT CAG GGC AAA CTG ACC
 GTT GCA AAA CTG AAC ATC GAT CAA AAC CCT GGC ACT GCG CCG AAA
 TAT GGC ATC CGT GGT ATC CCG ACT CTG CTG CTG TTC AAA AAC GGT
 GAA GTG GCG GCA ACC AAA GTG GGT GCA CTG TCT AAA GGT CAG TTG
 AAA GAG TTC CTC GAC GCT AAC CTG GCG TAA (SEQ ID NO:30).

[0289] A sequência da Tioredoxina TrxB da *E. coli* é:

ATG GGC ACG ACC AAA CAC AGT AAA CTG CTT ATC CTG
 GGT TCA GGC CCG GCG GGA TAC ACC GCT GCT GTC TAC GCG GCG CGC
 GCC AAC CTG CAA CCT GTG CTG ATT ACC GGC ATG GAA AAA GGC GGC
 CAA CTG ACC ACC ACC ACG GAA GTG GAA AAC TGG CCT GGC GAT CCA
 AAC GAT CTG ACC GGT CCG TTA TTA ATG GAG CGC ATG CAC GAA CAT
 GCC ACC AAG TTT GAA ACT GAG ATC ATT TTT GAT CAT ATC AAC AAG
 GTG GAT CTG CAA AAC CGT CCG TTC CGT CTG AAT GGC GAT AAC GGC
 GAA TAC ACT TGC GAC GCG CTG ATT ATT GCC ACC GGA GCT TCT GCA

CGC TAT CTC GGC CTG CCC TCT GAA GAA GCC TTT AAA GGC CGT GGG
GTT TCT GCT TGT GCA ACC TGC GAC GGT TTC TTC TAT CGC AAC CAG
AAA GTT GCG GTC ATC GGC GGC GGC AAT ACC GCG GTT GAA GAG GCG
TTG TAT CTG TCT AAC ATC GCT TCG GAA GTG CAT CTG ATT CAC CGC
CGT GAC GGT TTC CGC GCG GAA AAA ATC CTC ATT AAG CGC CTG ATG
GAT AAA GTG GAG AAC GGC AAC ATC ATT CTG CAC ACC AAC CGT ACG
CTG GAA GAA GTG ACC GGC GAT CAA ATG GGT GTC ACT GGC GTT CGT
CTG CGC GAT ACG CAA AAC AGC GAT AAC ATC GAG TCA CTC GAC GTT
GCC GGT CTG TTT GTT GCT ATC GGT CAC AGC CCG AAT ACT GCG ATT
TTC GAA GGG CAG CTG GAA CTG GAA AAC GGC TAC ATC AAA GTA CAG
TCG GGT ATT CAT GGT AAT GCC ACC CAG ACC AGC ATT CCT GGC GTC
TTT GCC GCA GGC GAC GTG ATG GAT CAC ATT TAT CGC CAG GCC ATT
ACT TCG GCC GGT ACA GGC TGC ATG GCA GCA CTT GAT GCG GAA CGC
TAC CTC GAT GGT TTA GCT GAC GCA AAA TAA (SEQ ID NO:31).

[0290] A sequência da Tioredoxina 1 do camundongo é:

ATGGTGAAGCTGATCGAGAGCAAGGAAGCTTTTCAGGAGGC
CCTGGCCGCCGCGGGAGACAAGCTTGTCGTGGTGGACTTCTCTGCTACGT
GGTGTGGACCTTGCAAATGATCAAGCCCTTCTTCCATTCCCTCTGTGACA
AGTATTCCAATGTGGTGTTCCTTGAAGTGGATGTGGATGACTGCCAGGATG
TTGCTGCAGACTGTGAAGTCAAATGCATGCCGACCTTCCAGTTTTATAAAA
AGGGTCAAAGGTGGGGGAGTTCTCCGGTGCTAACAAGGAAAAGCTTGAA
GCCTCTATTACTGAATATGCCTAA (SEQ ID NO:32).

[0291] A sequência da Tioredoxina 2 do camundongo é:

ATGGCTCAGCGGCTCCTCCTGGGGAGGTTCCCTGACCTCAGTC
ATCTCCAGGAAGCCTCCTCAGGGTGTGTGGGCTTCCCTCACCTCTAAGAC
CCTGCAGACCCCTCAGTACAATGCTGGTGGTCTAACAGTAATGCCAGCC
CAGCCCGGACAGTACACACCACAGAGTCTGTTTGACGACCTTTAACGTC
CAGGATGGACCTGACTTTCAAGACAGAGTTGTCAACAGTGAGACACCAGT

TGTTGTGGACTTTCATGCACAGTGGTGTGGCCCCTGCAAGATCCTAGGAC
CGCGGCTAGAGAAGATGGTCGCCAAGCAGCACGGGAAGGTGGTCATGGC
CAAAGTGGACATTGACGATCACACAGACCTTGCCATTGAATATGAGGTGTC
AGCTGTGCCTACCGTGCTAGCCATCAAGAACGGGGACGTGGTGGACAAGT
TTGTGGGGATCAAGGACGAGGACCAGCTAGAAGCCTTCCTGAAGAAGCTG
ATTGGCTGA (SEQ ID NO:33).

[0292] A sequência da Tioredoxina redutase 1 do camundongo é:

ATGAATGGCTCCAAAGATCCCCCTGGGTCTATGACTTCGAC
CTGATCATCATTGGAGGAGGCTCAGGAGGACTGGCAGCAGCTAAGGAGG
CAGCCAAATTTGACAAGAAAGTGCTGGTCTTGGATTTTGTACACCGACTC
CTCTTGGGACCAGATGGGGTCTCGGAGGAACGTGTGTGAATGTGGGTTGC
ATACCTAAGAAGCTGATGCACCAGGCAGCTTTGCTCGGACAAGCTCTGAA
AGACTCGCGCAACTATGGCTGGAAAGTCGAAGACACAGTGAAGCATGACT
GGGAGAAAATGACGGAATCTGTGCAGAGTCACATCGGCTCGCTGAACTGG
GGCTACCGCGTAGCTCTCCGGGAGAAAAAGGTCGTCTATGAGAATGCTTA
CGGGAGGTTTCATTGGTCCTCACAGGATTGTGGCGACAAATAACAAAGGTA
AAGAAAAAATCTATTCAGCAGAGCGGTTCTCATCGCCACAGGTGAGAGG
CCCCGCTACCTGGGCATCCCTGGAGACAAAGAGTACTGCATCAGCAGTGA
TGATCTTTTCTCCTTGCCTTACTGCCCGGGGAAGACCCTAGTAGTTGGTGC
ATCCTATGTCGCCTTGAATGTGCAGGATTTCTGGCTGGTATCGGCTTAGA
CGTCACTGTAATGGTGCGGTCCATTCTCCTTAGAGGATTTGACCAAGACAT
GGCCAACAAAATCGGTGAACACATGGAAGAACATGGTATCAAGTTTATAAG
GCAGTTCGTCCCAACGAAAATTGAACAGATCGAAGCAGGAACACCAGGCC
GACTCAGGGTGACTGCTCAATCCACAAACAGCGAGGAGACCATAGAGGGC
GAATTTAACACAGTGTTGCTGGCGGTAGGAAGAGATTCTTGTACGAGA
ACTATTGGCTTAGAGACCGTGGGCGTGAAGATAAACGAAAAACCGGAAAGAT
ACCCGTCACGGATGAAGAGCAGACCAATGTGCCTTACATCTACGCCATCG
GTGACATCCTGGAGGGGAAGCTAGAGCTGACTCCCGTAGCCATCCAGGC

GGGGAGATTGCTGGCTCAGAGGCTGTATGGAGGCTCCAATGTCAAATGTG
ACTATGACAATGTCCCAACGACTGTATTTACTCCTTTGGAATATGGCTGTTG
TGGCCTCTCTGAAGAAAAAGCCGTAGAGAAATTTGGGGAAGAAAATATTGA
AGTTTACCATAGTTTCTTTTGGCCATTGGAATGGACAGTCCCATCCCGGGA
TAACAACAAATGTTATGCAAAAATAATCTGCAACCTTAAAGACGATGAACGT
GTCGTGGGCTTCCACGTGCTGGGTCCAACGCTGGAGAGGTGACGCAGG
GCTTTGCGGCTGCGCTCAAGTGTGGGCTGACTAAGCAGCAGCTGGACAG
CACCATCGGCATCCACCCGGTCTGTGCAGAGATATTCACAACGTTGTCAG
TGACGAAGCGCTCTGGGGGAGACATCCTCCAGTCTGGCTGCTGA (SEQ ID
NO:34)

[0293] A sequência da Tioredoxina redutase 2 do camundongo é:

ATGGCGGCGATGGTGGCGGCGATGGTGGCGGCGCTGCG
TGGACCCAGCAGGCGCTTCCGGCCGCGGACACGGGCTCTGACACGCGG
GACAAGGGGCGCGGCGAGTGCAGCGGGAGGGCAGCAGAGCTTTGATCTC
TTGGTGATCGGTGGGGGATCCGGTGGCCTAGCTTGTGCCAAGGAAGCTG
CTCAGCTGGGAAAGAAGGTGGCTGTGGCTGACTATGTGGAACCTTCTCCC
CGAGGCACCAAGTGGGGCCTTGGTGGCACCTGTGTCAACGTGGGTTGCA
TACCCAAGAAGCTGATGCATCAGGCTGCACTGCTGGGGGGCATGATCAGA
GATGCTCACC ACTATGGCTGGGAGGTGGCCCAGCCTGTCCAACACA ACTG
GAAGACAATGGCAGAAGCCGTGCAAAACCATGTGAAATCCTTGA ACTGGG
GTCATCGCGTCCA ACTGCAGGACAGGAAAGTCAAGTACTTTAACATCAAAG
CCAGCTTTGTGGATGAGCACACAGTTCGCGGTGTGGACAAAGGCGGGAA
GGCGACTCTGCTTTCAGCTGAGCACATTGTCATTGCTACAGGAGGACGGC
CAAGGTACCCACACAAGTCAAAGGAGCCCTGGAATATGGAATCACAAGT
GACGACATCTTCTGGCTGAAGGAGTCCCCTGGGAAAACGTTGGTGGTTGG
AGCCAGCTATGTGGCCCTAGAGTGTGCTGGCTTCTCACTGGAATTGGAC
TGGATA CCACTGTCATGATGCGCAGCATCCCTCTCCGAGGCTTTGACCAG
CAAATGTCATCTTTGGTCACAGAGCACATGGAGTCTCATGGCACCCAGTTC

CTGAAAGGCTGTGTCCCCTCCCACATCAAAAACTCCCAACTAACCAGCTG
CAGGTCACCTTGGGAGGATCATGCTTCTGGCAAGGAAGACACAGGCACCTT
TGACACTGTCCTGTGGGCCATAGGGCGAGTTCCAGAAACCAGGACTTTGA
ATCTGGAGAAGGCTGGCATCAGTACCAACCCTAAGAATCAGAAGATTATTG
TGGATGCCCAGGAGGCTACCTCTGTTCCCCACATCTATGCCATTGGAGAT
GTTGCTGAGGGGCGGCCTGAGCTGACGCCACAGCTATCAAGGCAGGAA
AGCTTCTGGCTCAGCGGCTCTTTGGGAAATCCTCAACCTTAATGGATTACA
GCAATGTTCCCACAACCTGTCTTTACACCACTGGAGTATGGCTGTGTGGGG
CTGTCTGAGGAGGAGGCTGTGGCTCTCCATGGCCAGGAGCATGTAGAGG
TTTACCATGCATATTATAAGCCCCTAGAGTTCACGGTGGCGGATAGGGATG
CATCACAGTGCTACATAAAGATGGTATGCATGAGGGAGCCCCCACAACCTG
GTGCTGGGCCTGCACTTCCTTGGCCCCAACGCTGGAGAAGTCACCCAAG
GATTTGCTCTTGGGATCAAGTGTGGGGCTTCATATGCACAGGTGATGCAG
ACAGTAGGGATCCATCCCACCTGCTCTGAGGAGGTGGTCAAGCTGCACAT
CTCCAAGCGCTCCGGCCTGGAGCCTACTGTGACTGGTTGCTGA (SEQ ID
NO:35).

EXEMPLO 10

ESTUDOS *IN VITRO* DA REDUTASE TRX/TRX

MATERIAIS E MÉTODOS

[0294] Uma solução comercial de TrxR (fígado de rato) (4 mM) foi diluída com água para produzir uma solução de 2,86 mM. O Trx liofilizado (humano) foi reconstituído com PBS (10 mM, pH 7,2) gerando uma solução de 500 mM. Uma solução de 20 mM de NADPH e soluções de 10 mM de ATG e ATM foram preparadas em água.

[0295] Em um tubo de microcentrífuga de polipropileno escuro de 1,5 mL, 437 µL de tampão da reação (histidina 10 mM, Na₂SO₄ 10 mM, NaCl 137 mM, KCl 2,5 mM, pH 7,0) e 5 µL de Trx foram gentilmente misturados. A reação foi iniciada pela adição de 17,5 µL de TrxR. A reação foi incubada em

temperatura ambiente por 24 horas. Alíquotas de 20 µL foram coletadas em cada ponto de tempo de amostragem e armazenadas a -70 °C até serem analisadas pelo ensaio no Bioanalisador.

[0296] Inibição do sistema Trx foi demonstrada utilizando as mesmas condições de reação descritas acima, com a adição de vários inibidores.

1. ATIVIDADE *IN VITRO* DO SISTEMA TIOREDOXINA

[0297] A Figura 24 exibe uma imagem digital similar a gel obtida a partir de análise obtida pelo Bioanalisador (cada faixa representando um ponto de tempo) demonstrando que a incubação do ocrelizumab intacto (“2H7”, um anticorpo anti-CD20 humanizado, referido acima como “Variante A”) (1 mg/mL) com 0,1 µM de TrxR (fígado de rato), 5 µM de Trx (humano) e 1 mM de NADPH em 10 mM de tampão sulfato de histidina resultou na redução do ocrelizumab em menos de uma hora.

2. ATIVIDADE *IN VITRO* DO SISTEMA TIOREDOXINA INIBIDA POR AUROTIOLGICOSE

[0298] A aurotioglicose (ATG) foi adicionada à mistura de ocrelizumab descrita acima, nas seguintes concentrações: 1 mM, 0,6 mM (6:1 ATG:TrxR), 0,4 mM (4:1 ATG:TrxR) e 0,2 mM (2:1 ATG:TrxR).

[0299] Como atestado pela imagem digital similar a gel a partir da análise utilizando o Bioanalisador exibidas nas Figuras 25-27, a aurotioglicose adicionada em concentrações de 1 mM, 0,6 mM e 0,4 mM inibiram efetivamente a redução do ocrelizumab pelo sistema tioredoxina. No entanto, como exibido na Figura 28, sob estas condições experimentais a aurotioglicose adicionada a uma concentração de 0,2 mM não pode inibir a redução do ocrelizumab após 24 horas.

3. ATIVIDADE *IN VITRO* DO SISTEMA TIOREDOXINA INIBIDA POR AUROTIOMALATO

[0300] O aurotiomalato (ATM) foi adicionado à mistura de ocrelizumab descrita acima, nas concentrações de 0,1 mM e 0,01 mM. Como

atestado pelas imagens digitais similares a gel a partir da análise utilizando o Bioanalisador exibidas nas Figuras 29 e 30, A ATM inibe de maneira eficaz a redução DO ocrelizumab pelo sistema tioredoxina em ambas as concentrações testadas.

4. ATIVIDADE *IN VITRO* DO SISTEMA TIOREDOXINA INIBIDA POR CuSO_4

[0301] O CuSO_4 foi adicionado à mistura de ocrelizumab descrita acima, nas concentrações de 20 mM (4:1 Cu^{2+} :Trx); 10 mM (2:1 Cu^{2+} :Trx) e 5 mM (1:1 Cu^{2+} :Trx). Como exibido nas Figuras 31-33, o CuSO_4 inibe de maneira eficaz a redução induzida por tioredoxina do ocrelizumab, nas concentrações de 20 m e 10 mM (Figuras 31 e 32), mas a concentração de 5 mM não é suficiente para resultar em uma inibição completa da redução (Figura 33).

5. ATIVIDADE *IN VITRO* DO SISTEMA TIOREDOXINA INIBIDA POR CISTAMINA

[0302] A cistamina foi adicionada à mistura de ocrelizumab descrita acima, nas concentrações: 532 mM (20:1 Cistamina:2H7 (Variante A) dissulfeto), 266 mM (10:1 Cistamina:2H7 (Variante A) dissulfeto); 133 mM (5:1 Cistamina:2H7 dissulfeto) e 26,6 mM (1:1: Cistamina:2H7 (Variante A) dissulfeto). Como exibido nas Figuras 34-37, A cistamina inibe de maneira eficaz a redução induzida pela tioredoxina do ocrelizumab, nas concentrações de 532 mM (20:1 Cistamina:2H7 (variante A) dissulfeto) e 266 mM (10:1 Cistamina:2H7 (Variante A)) (Figuras 34 e 35) mas nas concentrações de 133 mM (5:1 Cistamina: 2H7 (Variante A) dissulfeto) e 26,6 mM (1:1 Cistamina:2H7 (Variante A) dissulfeto) não foram suficientes para inibir a redução do ocrelizumab após 24 horas (Figuras 36 e 37).

6. ATIVIDADE *IN VITRO* DO SISTEMA TIOREDOXINA INIBIDA PELA CISTINA

[0303] A cistina foi adicionada à mistura de ocrelizumab descrita acima em uma concentração de 2,6 mM. Como exibido na Figura 38, esta concentração de cistina inibe de maneira eficaz a redução do ocrelizumab pelo sistema tioredoxina. Deve ser notado que a concentração mínima eficaz de

cistina (tal como a concentração mínima eficaz de outros inibidores) depende das circunstâncias atuais, e pode ser diferente para diferentes proteínas, como anticorpos e pode variar dependendo do momento da adição. Deste modo, por exemplo, se a cistina é adicionada antes da lise, a concentração mínima eficaz para o anticorpo 2H7 (Variante A) é de aproximadamente 1,3 mM, para o Apomab é de aproximadamente 1 mM e para o anticorpo Variante C é de aproximadamente 4,5 mM. Quando a cistina é adicionada no meio de cultura celular, a concentração mínima eficaz é geralmente um pouco maior, e é de aproximadamente 5,2 mM para o 2H7 (Variante A), 6 mM para Apomab e 9 mM para o anticorpo Variante C. Normalmente, para a cistina, cistamina e glutathione oxidada (vide abaixo), a concentração inibitória mínima eficaz é de cerca de 40x a concentração de anticorpos (em μM).

7. ATIVIDADE *IN VITRO* DO SISTEMA TIOREDOXINA INIBIDA PELA GLUTATIONA OXIDADA (GSSG)

[0304] A GSSG foi adicionada à mistura de ocrelizumab descrita acima em uma concentração de 2,6 mM. Como exibido na Figura 39, esta concentração de GSSG inibe de maneira eficaz a redução do ocrelizumab pelo sistema tioredoxina. Deve ser notado, no entanto, que a concentração mínima eficaz da glutathione oxidada (assim como a de outros inibidores) depende das circunstâncias em uso, como, por exemplo, a natureza das proteínas (anticorpos, por exemplo) produzidas e o momento da adição. Por exemplo, para o anticorpo 2H7 (Variante A) a concentração mínima eficaz é de aproximadamente 1,3 mM para adição antes da lise.

8. ATIVIDADE *IN VITRO* DO SISTEMA DE REDUÇÃO ENZIMÁTICA

[0305] A Figura 40 exibe uma imagem digital similar a gel obtida a partir da análise utilizando o Bioanalisador (cada faixa representa um ponto de tempo), demonstrando que a incubação do ocrelizumab intacto ("2H7", um anti-CD20 humanizado, (Variante A) (1mg/ml) com 10 $\mu\text{g/mL}$ de hexoquinase, 50

$\mu\text{g/mL}$ de glicose-6-fosfato desidrogenase, tioredoxina $5 \mu\text{M}$, tioredoxina redutase $0,1 \mu\text{M}$, glicose 2 mM , ATP $0,6 \text{ mM}$, Mg^{2+} 2 mM e NADP 2 mM em 50 mM de tampão sulfato de histidina em pH $7,38$ resulta na redução do ocrelizumab em cerca de uma hora. A adição de $0,1 \text{ mM}$ de HDEA, um inibidor conhecido da glicose-6-fosfato desidrogenase não inibe a redução.

9. ATIVIDADE IN VITRO DO SISTEMA DE REDUÇÃO ENZIMÁTICA NECESSITA DE NADPH

[0306] Como exibido na imagem digital similar a gel obtida a partir da análise utilizando o Bioanalisador da Figura 41, a incubação do ocrelizumab intacto (1 mg/mL) com $5 \mu\text{M}$ de tioredoxina, $0,1 \mu\text{M}$ de tioredoxina redutase, e 2 mM de NADP e em 50 mM de tampão sulfato de histidina em pH $7,38$ não resulta na redução do anticorpo ocrelizumab. A Redução do ocrelizumab não ocorre sem a hexoquinase e a glicose-6-fosfato desidrogenase e seus substratos para gerar NADPH.

[0307] A invenção descrita de forma ilustrativa no presente pode ser adequadamente praticada na ausência de qualquer elemento ou elementos, limitação ou limitações que não estejam especificamente divulgadas no presente. Desta maneira, por exemplo, os termos “compreendendo”, “incluindo”, “contendo” e etc. devem ser interpretados de maneira expansiva e sem qualquer limitação. Adicionalmente, os termos e expressões empregados no presente foram utilizados como termos de descrição e não de limitação, e não há intenção no uso de tais termos e expressões de excluir qualquer equivalente da invenção exibida ou parte desta, mas reconhece-se que várias modificações são possíveis dentro do escopo da invenção reivindicada. Assim, deve ser compreendido que, embora a presente invenção tenha sido especificamente divulgada por realizações preferidas, os técnicos hábeis no assunto podem facilmente realizar recursos opcionais, alterações e variações das invenções enunciadas no presente, e que tais modificações e variações são consideradas dentro do

escopo das invenções divulgadas no presente. As invenções foram descritas no presente de maneira abrangente e genérica. Cada uma das espécies limitadas e agrupamentos subgenéricos abrangidas na divulgação genérica também fazem parte da presente invenção. Isso inclui, na descrição genérica de cada uma das invenções uma condição ou limitação negativa que irá permitir a remoção de qualquer matéria em questão a partir do gênero, não importando se o material a ser removido foi ou não especificamente recitado. Além disso, quando características ou aspectos de uma invenção são descritas nos termos do grupo Markush, aqueles educados no assunto reconhecerão que a invenção também é assim descrita nos termos de qualquer membro individual ou subgrupo de membros do grupo Markush. Adicionalmente, quando uma referência a um aspecto da invenção enumera uma série de membros individuais como, por exemplo, SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 100, inclusive, têm-se a intenção de listar cada membro da lista de maneira individual, e, adicionalmente, deve-se compreender que todos os membros individuais podem ser excluídos ou incluídos na reivindicação individualmente.

[0308] As etapas descritas e/ou utilizadas nos métodos da presente invenção podem ser executadas em uma ordem diferente daquela ilustrada e/ou indicada. As etapas são simples exemplos da ordem que estas etapas podem ocorrer. As etapas podem ocorrer em qualquer ordem desejada desde que tal ordem ainda execute os objetivos da invenção reivindicada.

[0309] A partir da descrição da presente invenção, é manifesto que diversos equivalentes podem ser usados para implementar os conceitos da presente invenção, sem se afastar de seu escopo. Além disso, enquanto a invenção foi descrita com referência específica a certas realizações, um técnico hábil no assunto reconheceria que modificações podem ser feitas na forma e no detalhe, sem se afastar do espírito e do escopo da invenção. As realizações descritas são consideradas em todos os aspectos como ilustrativas e não

restritivas. Também deve ser compreendido que a invenção não se limita as realizações específicas descritas no presente, mas é hábil de muitos equivalentes, rearranjos, modificações e substituições, sem se afastar do escopo de aplicação da presente invenção. Assim, realizações adicionais estão dentro do escopo da invenção e dentro das seguintes reivindicações.

[0310] Todas as publicações e pedidos de patentes Norte-Americanas; publicações e pedido de patentes estrangeiras; artigos científicos, livros e publicações mencionadas são incorporadas ao presente pela referência em sua totalidade, como se cada patente ou publicação individual fosse especificamente e individualmente indicada como sendo incorporada pela referência, incluindo os desenhos, figuras e tabelas, como se fosse enunciado na íntegra.

REIVINDICAÇÕES

1. MÉTODO PARA PREVENIR A REDUÇÃO DE PONTES DISSULFETO, em um polipeptídeo expresso em uma célula hospedeira recombinante, caracterizado por compreender, após fermentação, a difusão do fluido de cultura celular coletado ou pré-coletado da dita célula hospedeira recombinante com ar,

em que a dita célula hospedeira é uma célula de ovário de hamster chinês (CHO), e

em que dito polipeptídeo é um anticorpo, ou um fragmento de ligação ao antígeno de um anticorpo.

2. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pela difusão de ar ser continuada até:

(a) o fluido de cultura coletado estar pelo menos 10% saturado com ar;

(b) o fluido de cultura coletado estar entre 100% saturado a 30% saturado com ar;

(c) o oxigênio dissolvido (dO_2) no fluido de cultura celular coletado estar pelo menos 10%; ou

(d) o oxigênio dissolvido (dO_2) no fluido de cultura celular coletado estar pelo menos 30%.

3. MÉTODO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 2, caracterizado por compreender adicionalmente a etapa de redução do pH do fluido de cultura coletado das ditas células hospedeiras recombinantes.

4. MÉTODO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado por compreender adicionalmente a etapa de adicionar citrato ao fluido de cultura coletado das ditas células hospedeiras recombinantes.

5. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo dito anticorpo ser um anticorpo que se liga ao CD20.

6. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo anticorpo que se liga ao CD20 ser ocrelizumab.

7. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo anticorpo compreender uma VL que compreende a sequência de aminoácidos estabelecida na SEQ ID NO: 22 e compreende uma VH que compreende a sequência de aminoácidos estabelecida na SEQ ID NO: 23; ou uma VL que compreende a sequência de aminoácidos estabelecida na SEQ ID NO: 24 e uma VH que compreende uma sequência de aminoácidos estabelecida na SEQ ID NO: 25.

8. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo dito anticorpo ser um anticorpo que se liga a HER2.

9. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelo dito anticorpo compreender uma VL que compreende a sequência de aminoácidos estabelecida na SEQ ID NO: 16 e compreende uma VH que compreende a sequência de aminoácidos estabelecida na SEQ ID NO: 17; ou uma VL que compreende a sequência de aminoácidos estabelecida na SEQ ID NO: 18 e uma VH que compreende uma sequência de aminoácidos estabelecida na SEQ ID NO: 19.

10. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelo dito anticorpo ser o 2C4 humanizado.

11. MÉTODO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 5 a 10, caracterizado pelo anticorpo expresso na célula hospedeira recombinante ser produzido em uma escala maior que 5.000 L.

12. MÉTODO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 5 a 10, caracterizado por compreender adicionalmente a etapa de recuperar o anticorpo do fluido de cultura celular coletado.

13. MÉTODO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 5 a 10, caracterizado por compreender adicionalmente a etapa de purificar o

anticorpo do fluido de cultura celular coletado.

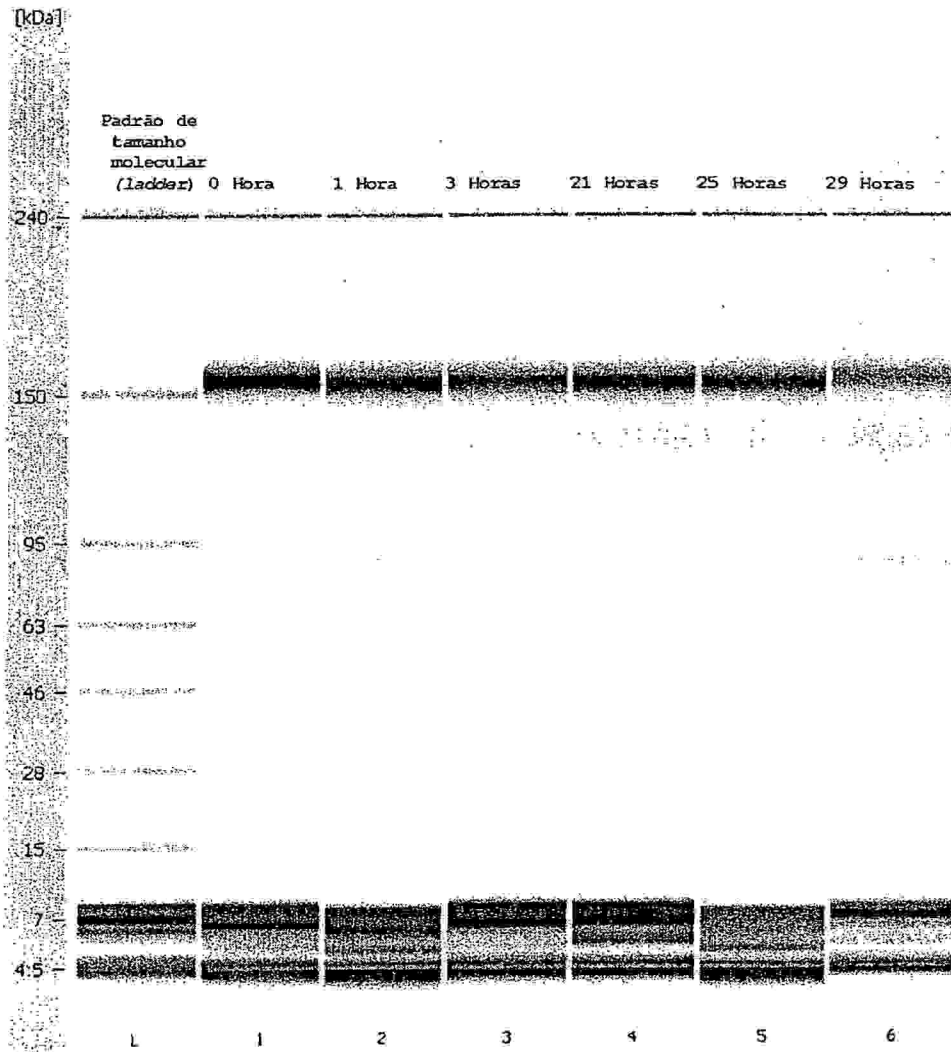
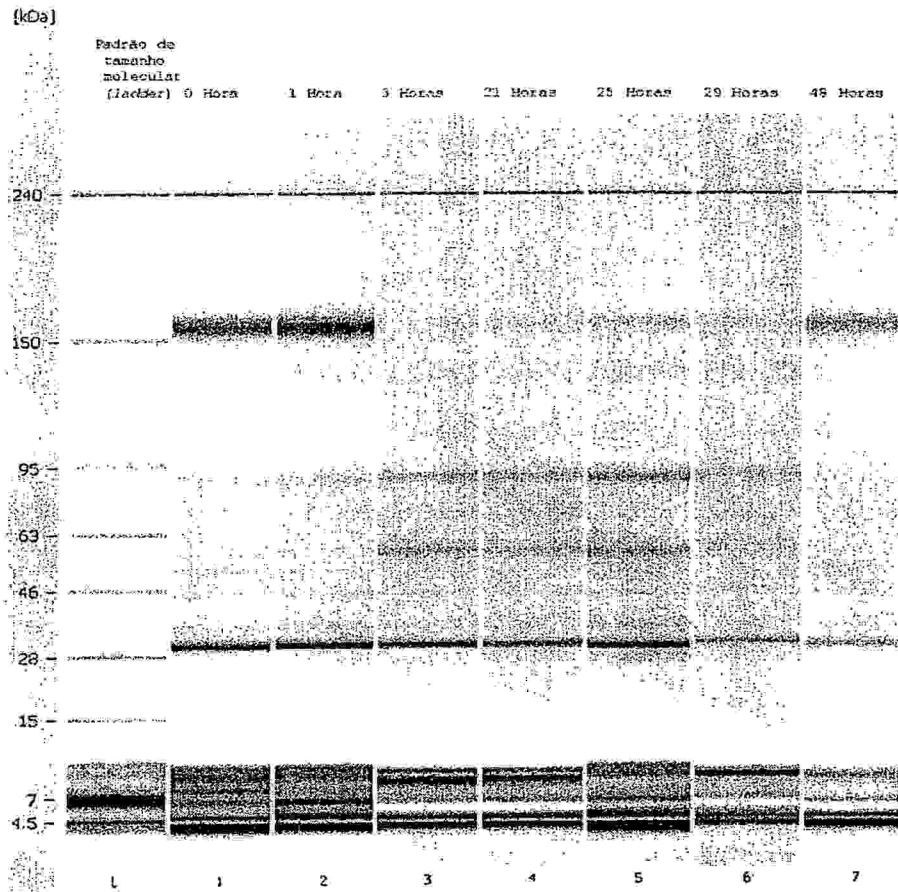
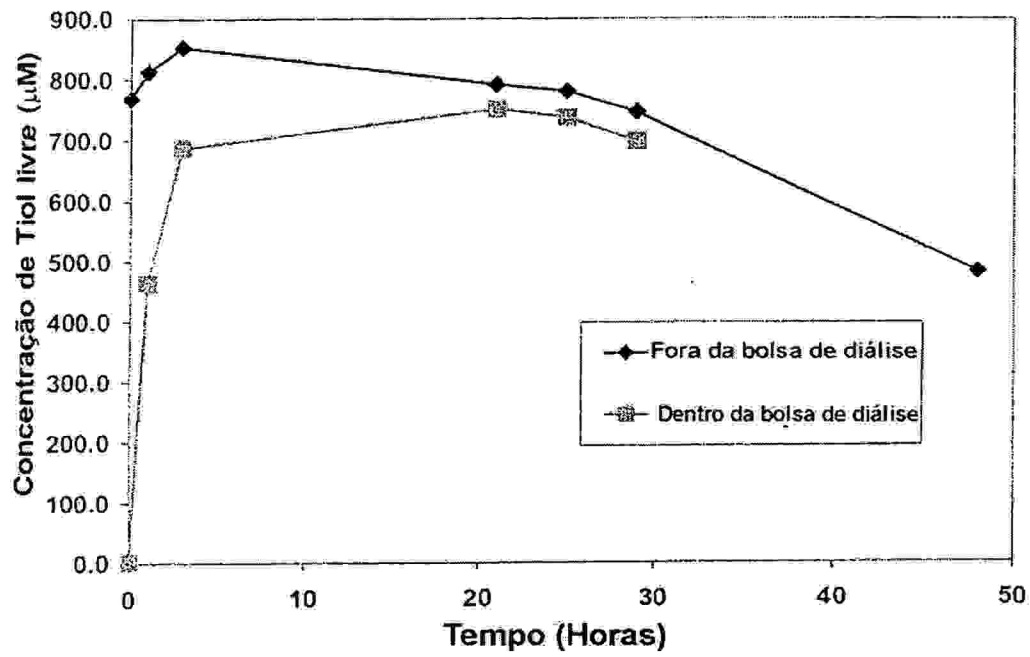


Fig.1

**Fig.2**

**Fig.3**

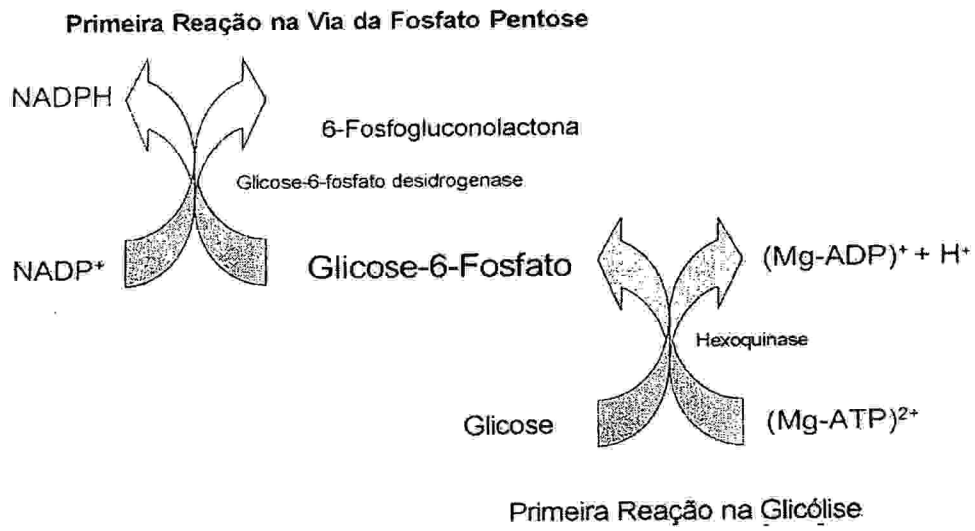
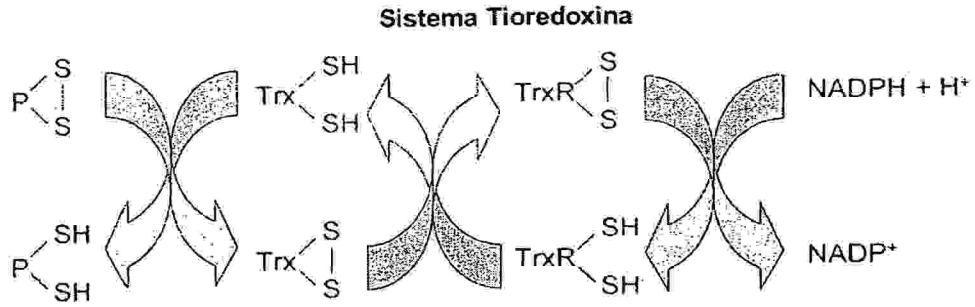
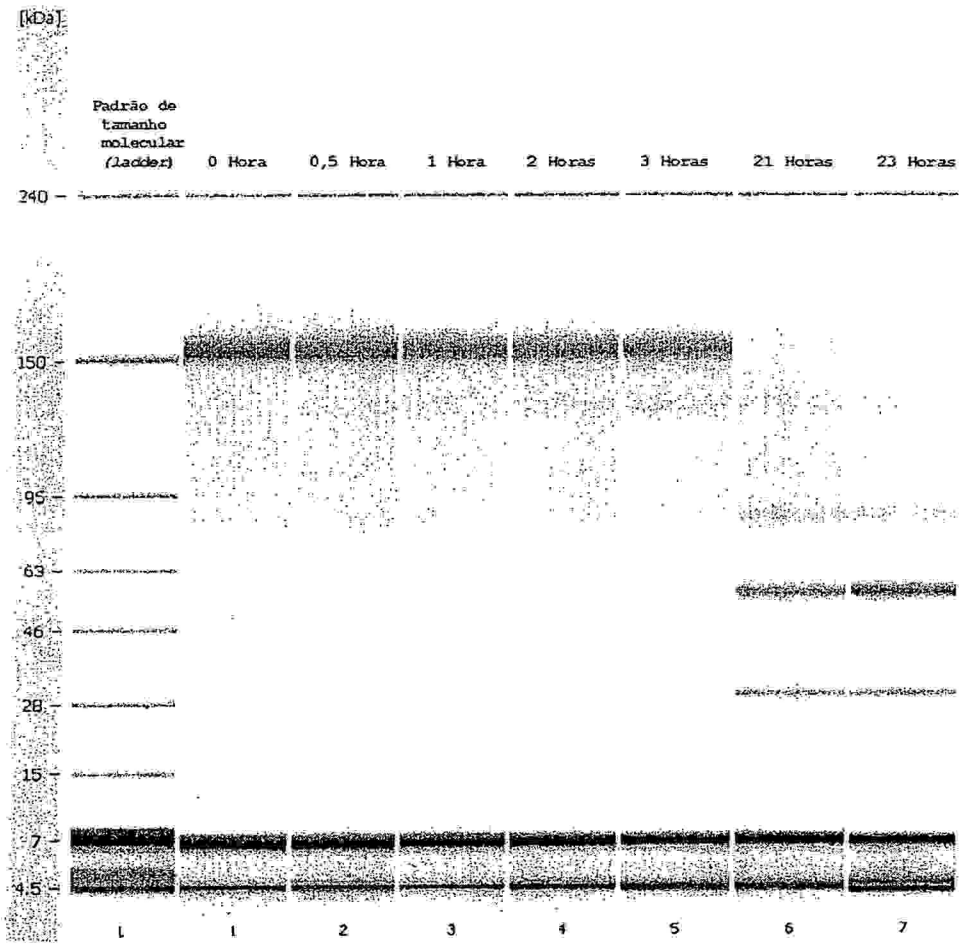


Fig.4

**Fig.5**

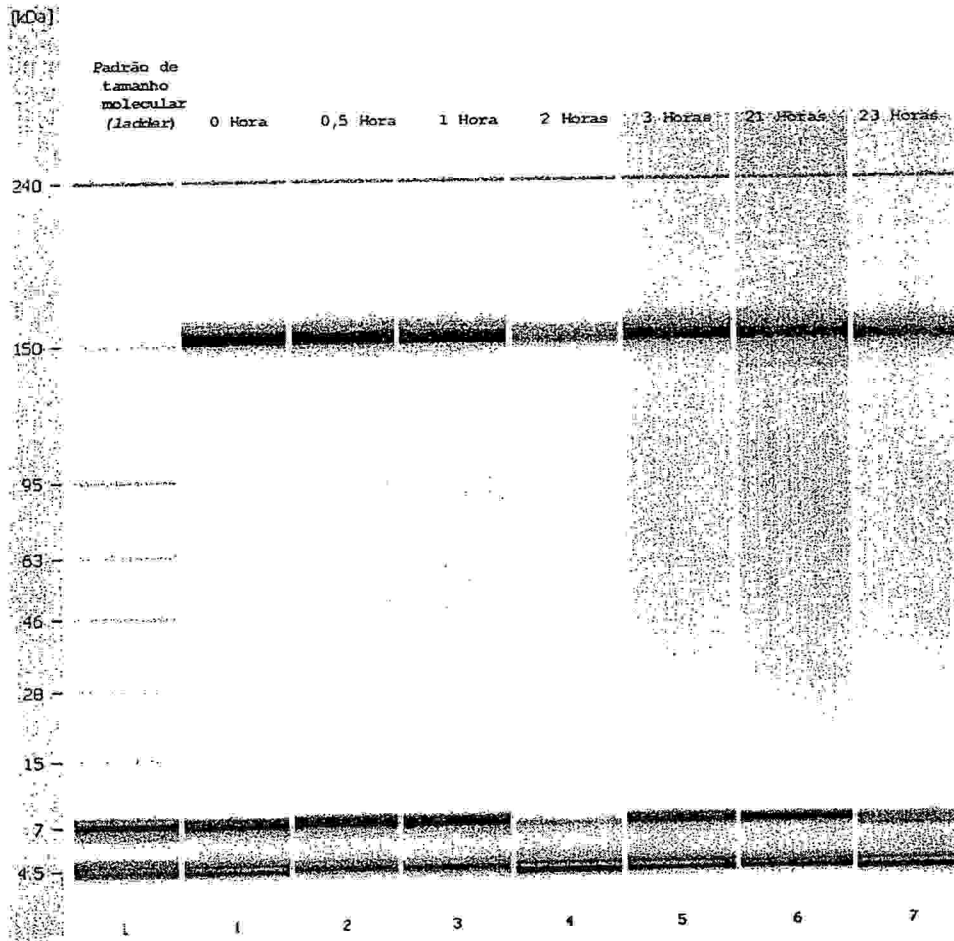
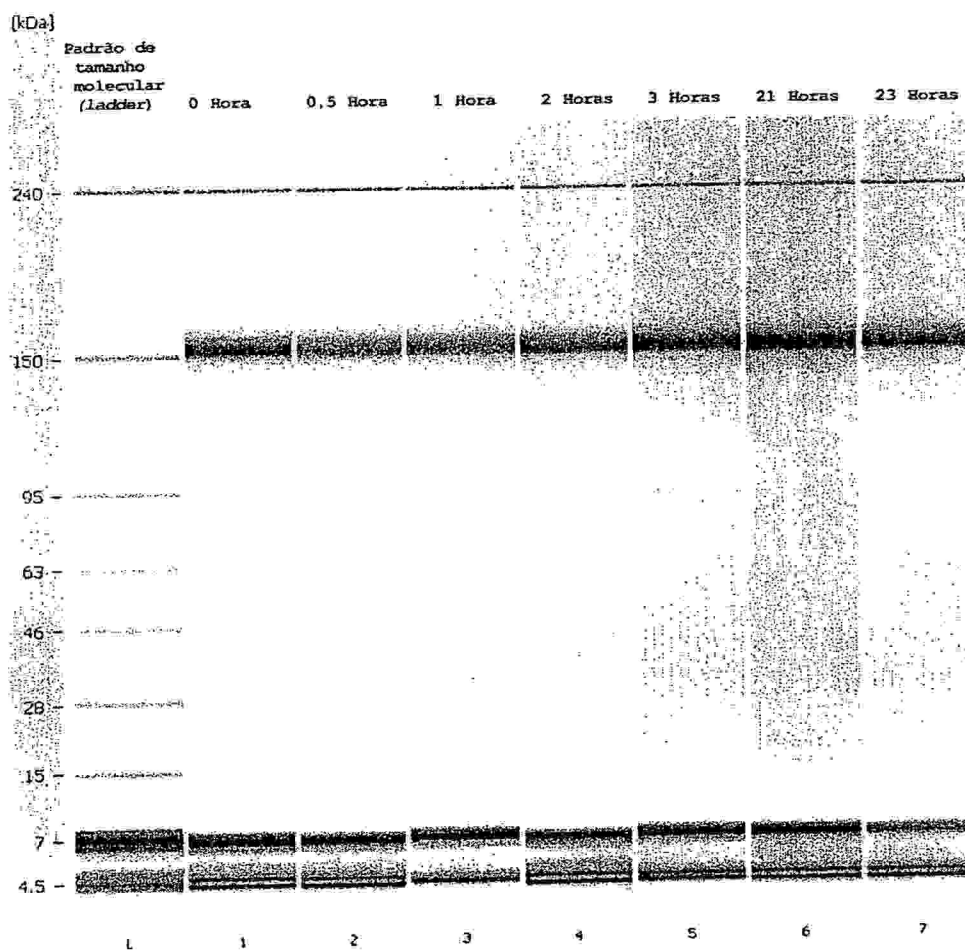


Fig.6

**Fig.7**

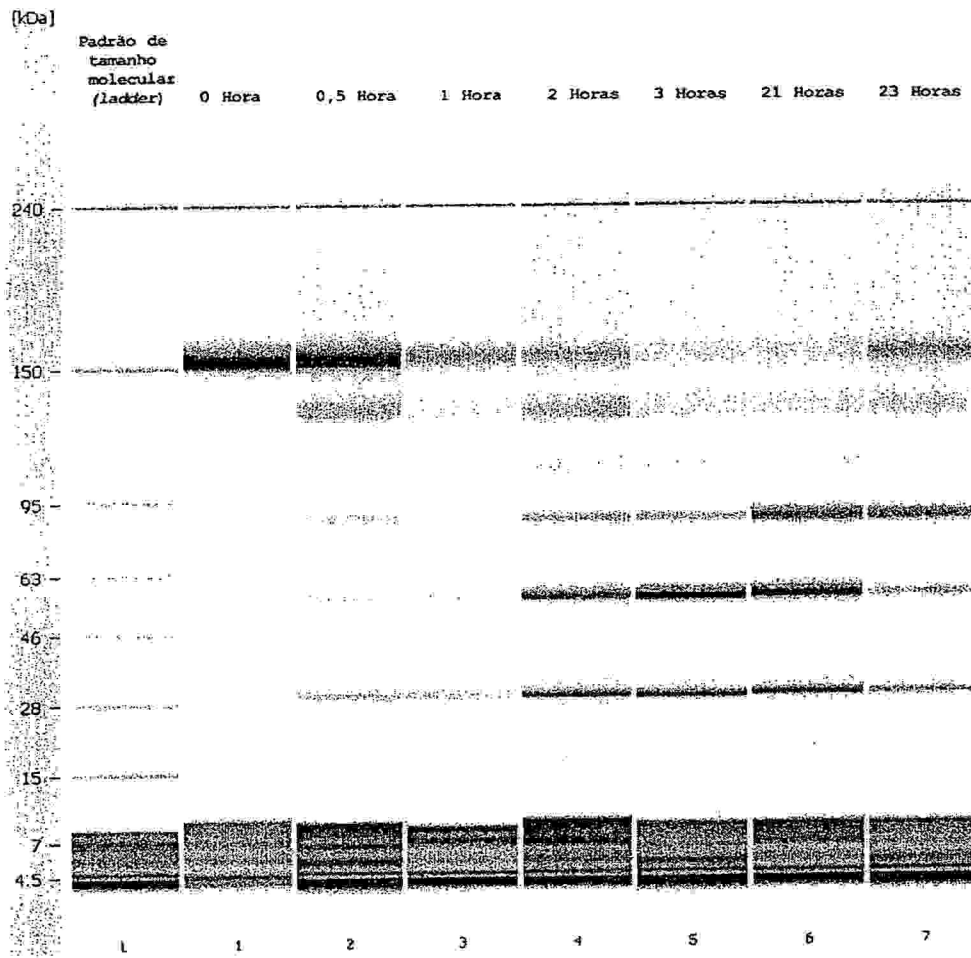


Fig.8

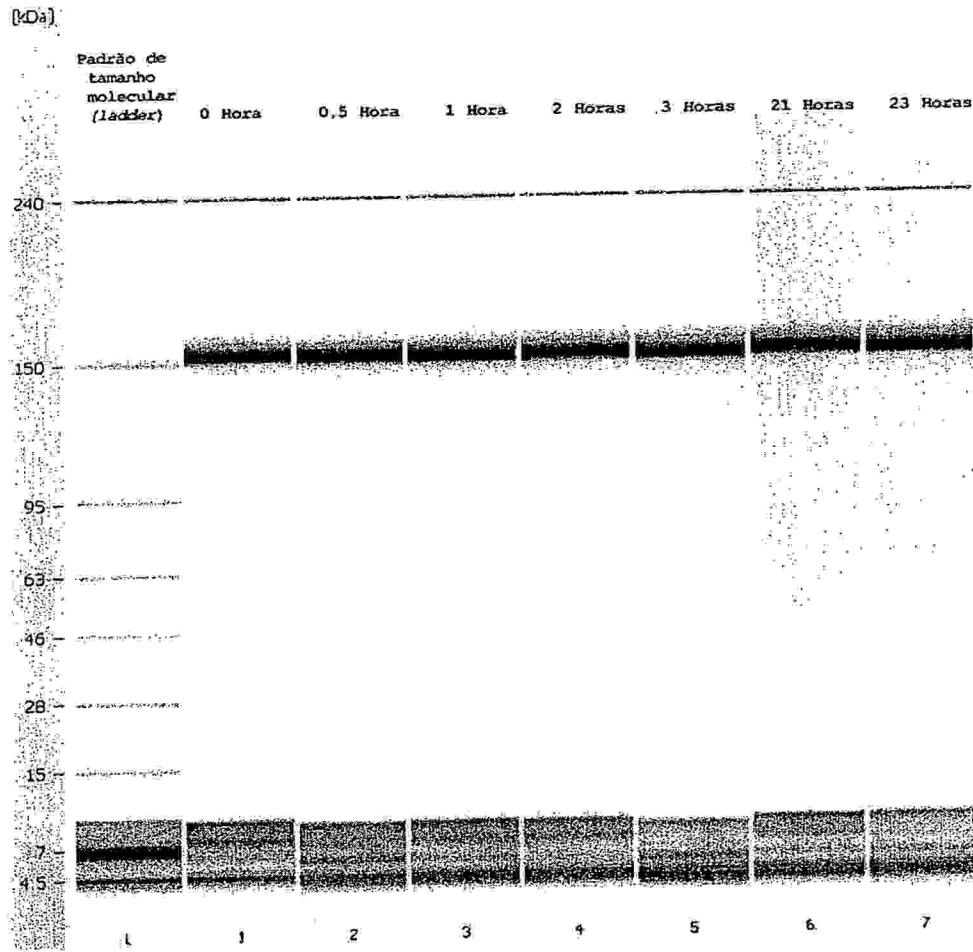


Fig.9

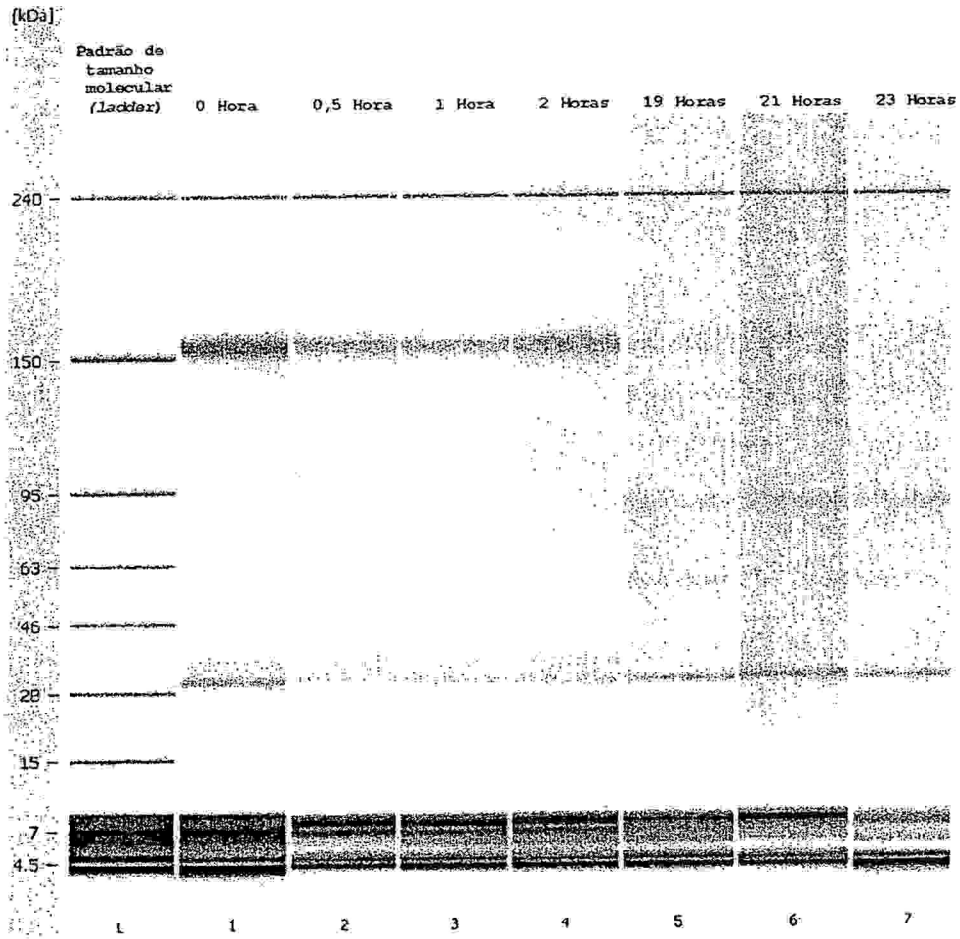


Fig.10

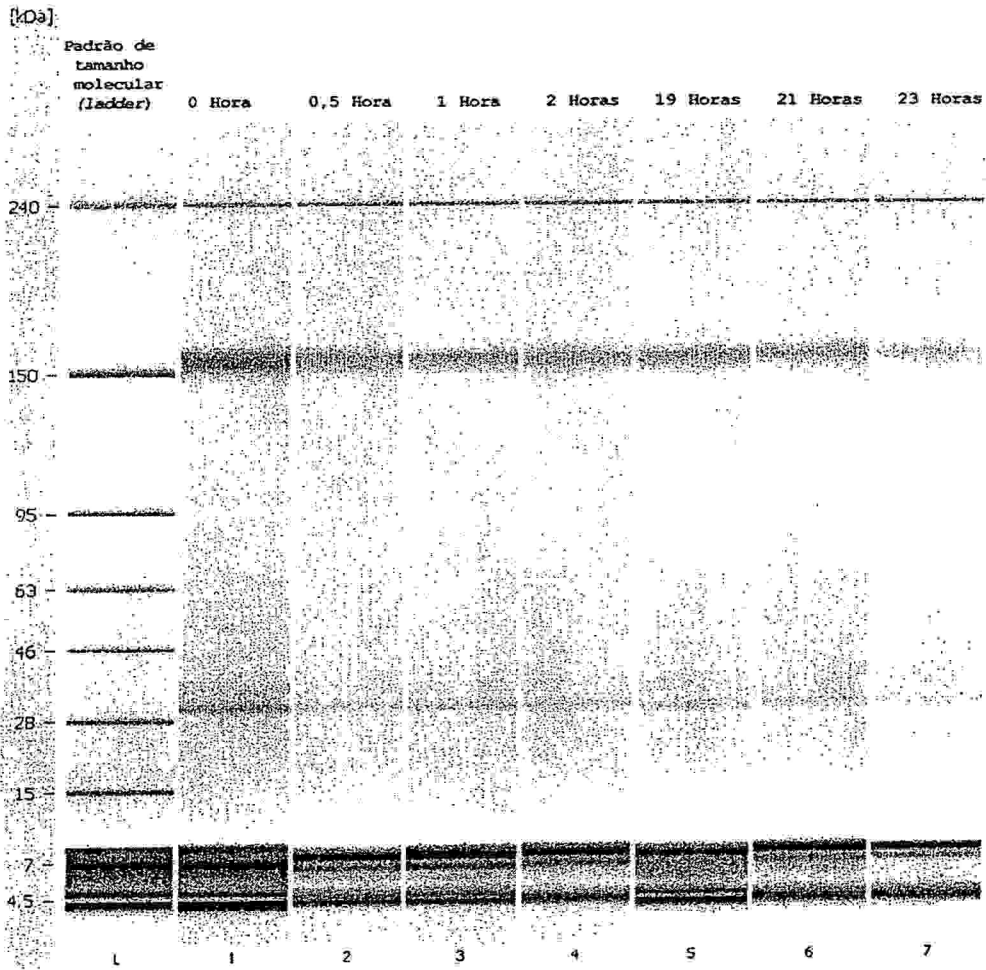


Fig.11

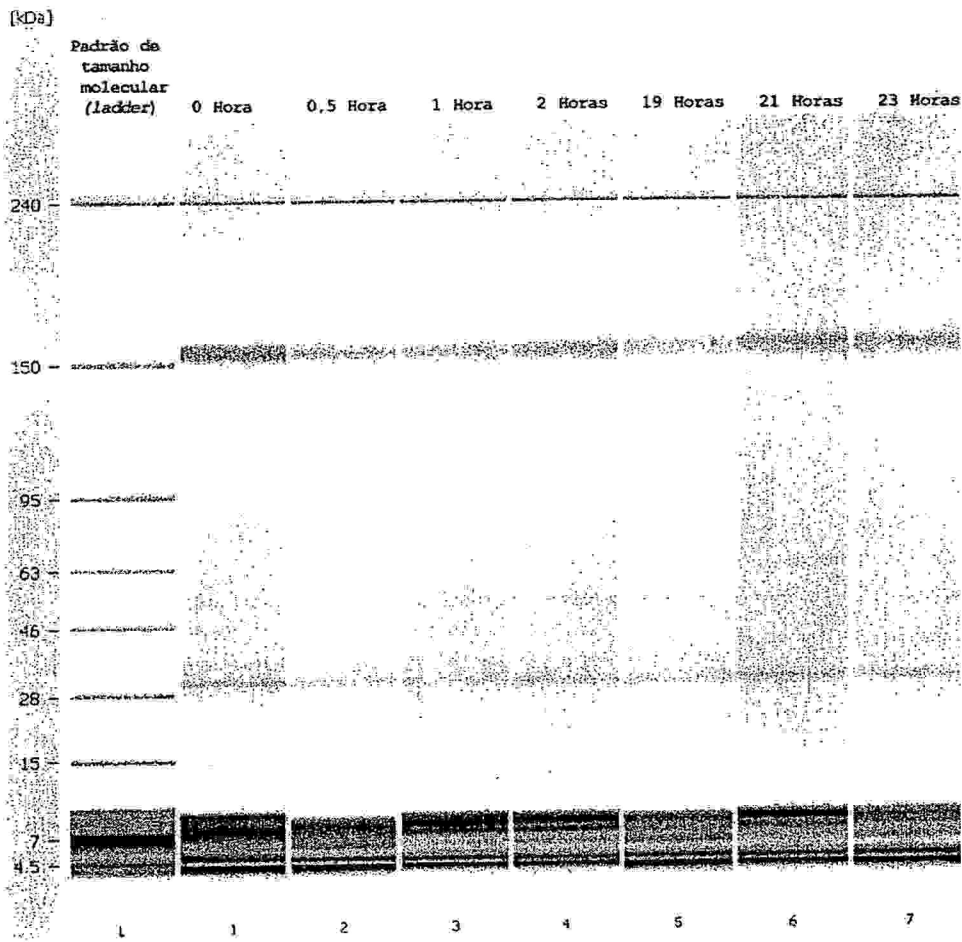
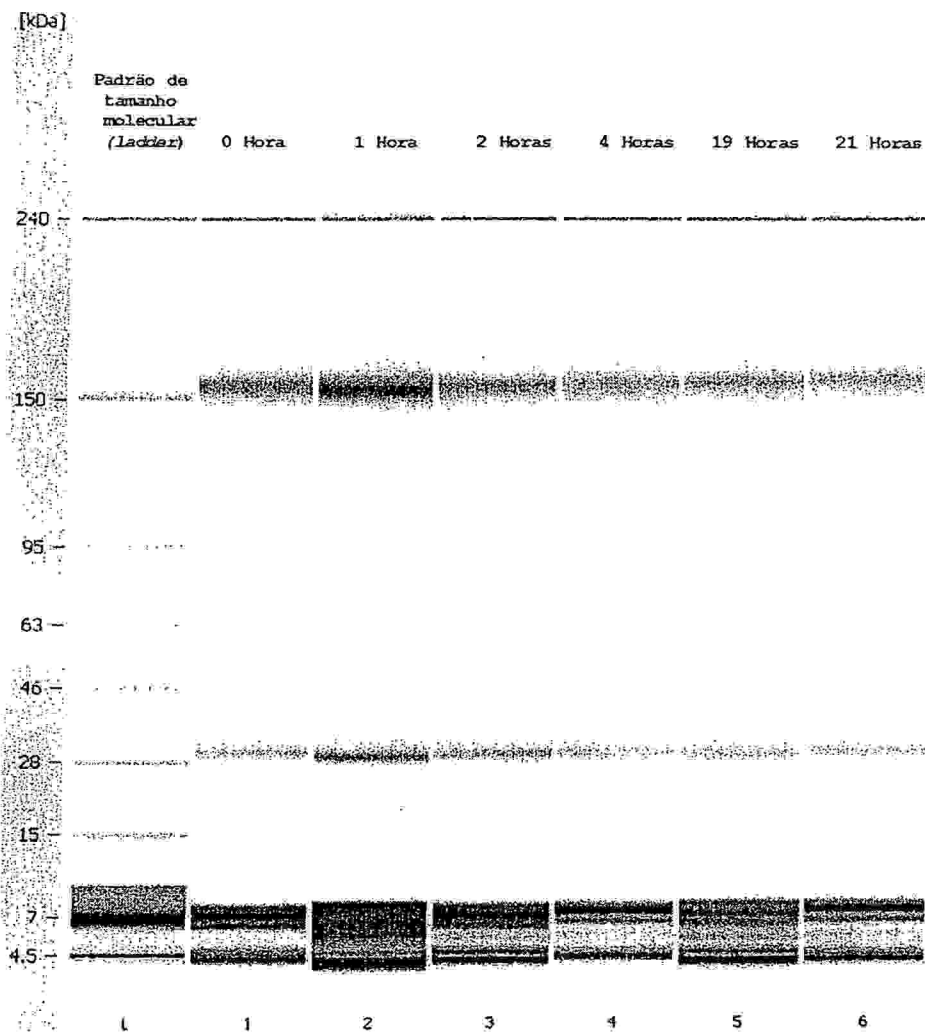


Fig.12

**Fig.13**

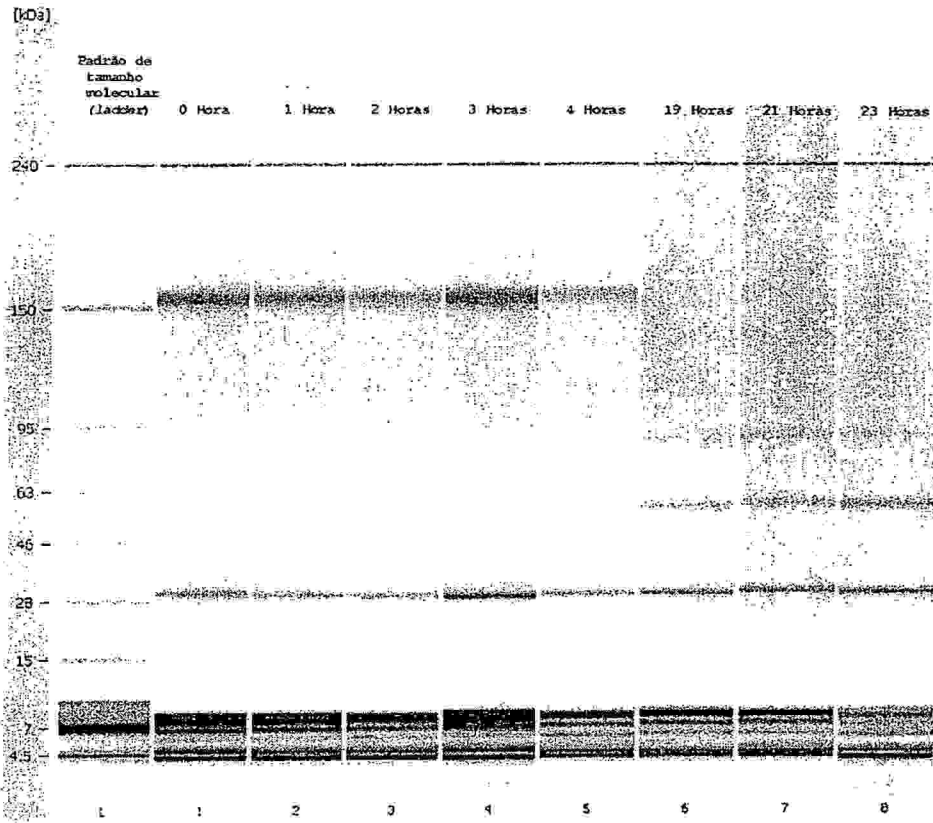


Fig.14

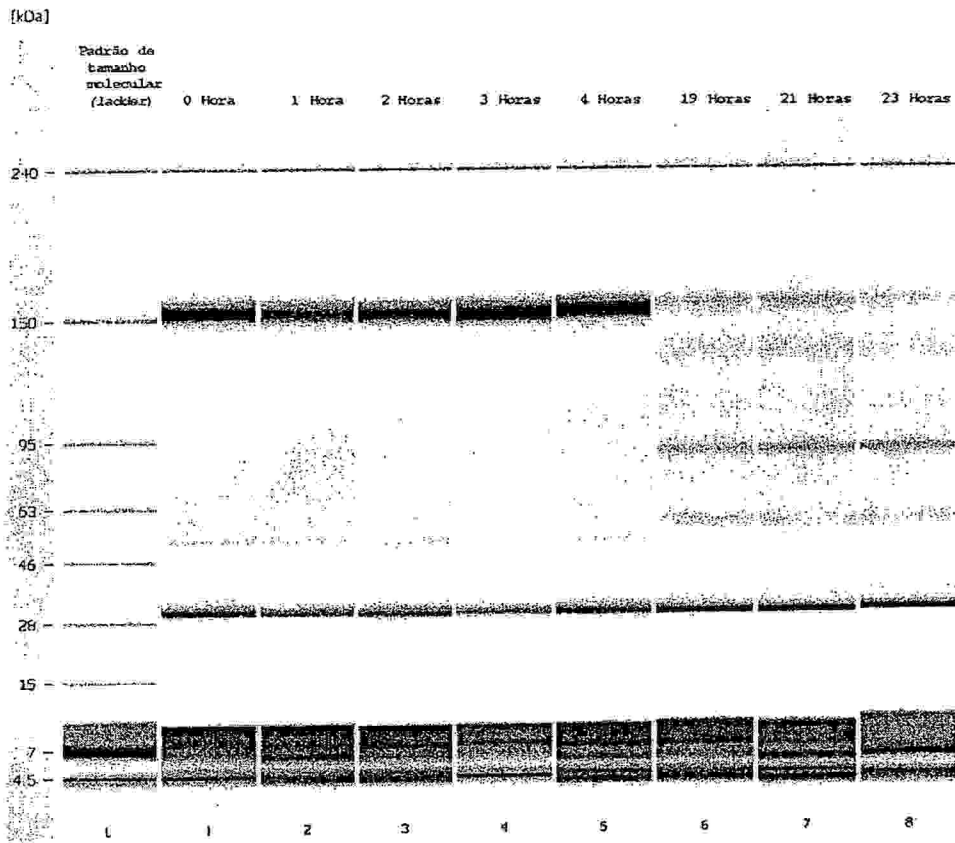
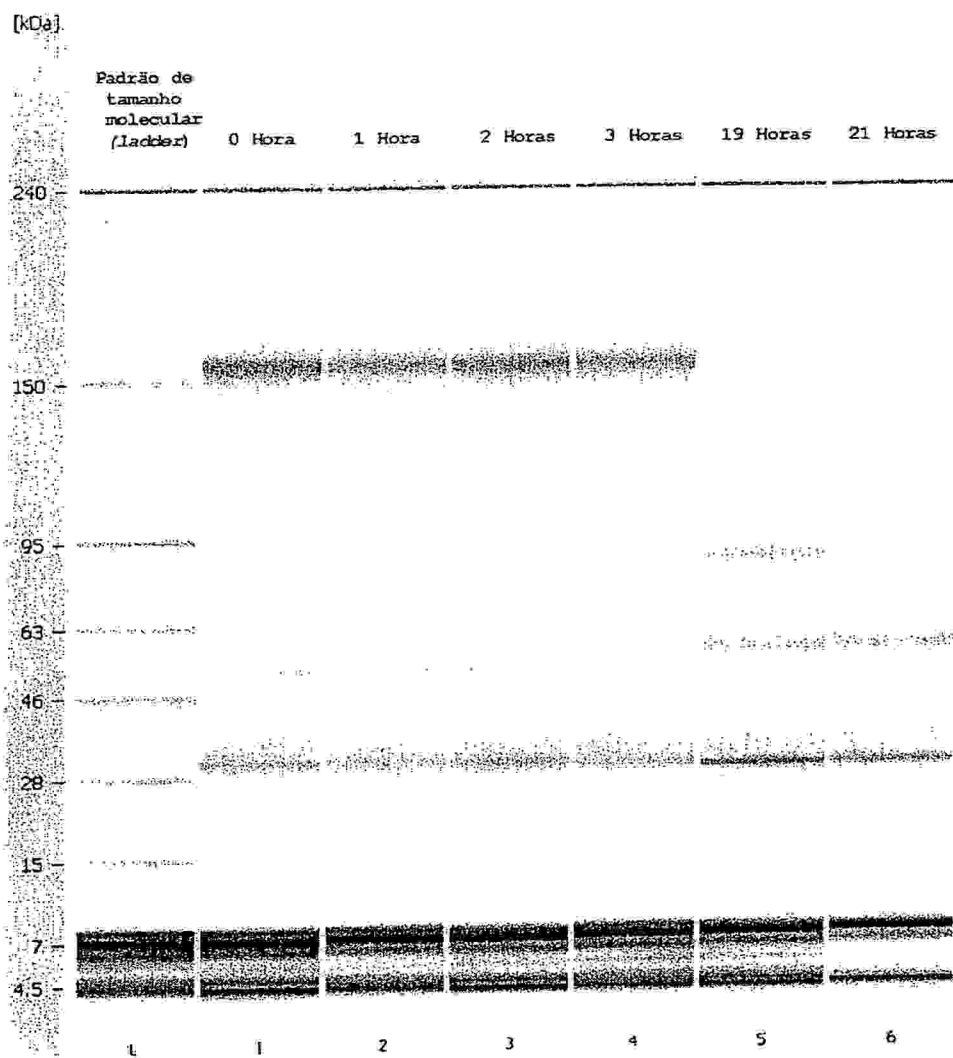
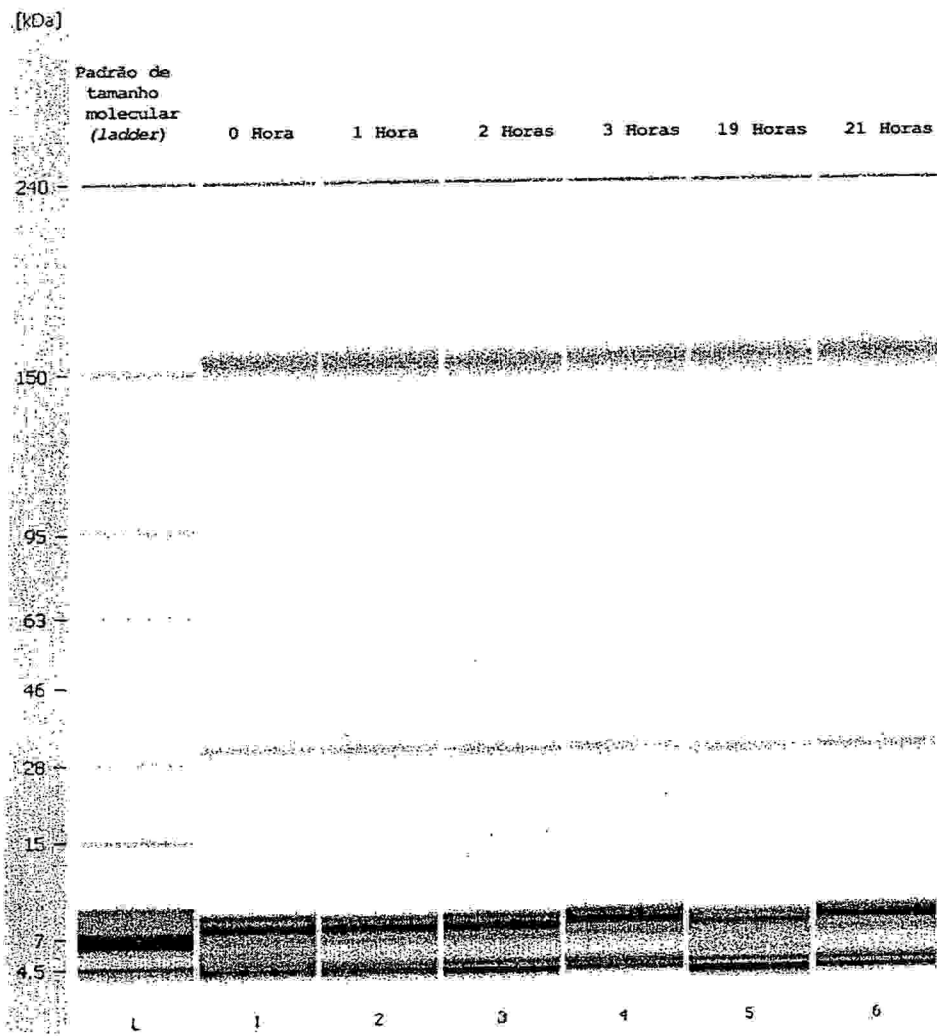


Fig.15

**Fig.16**

**Fig.17**

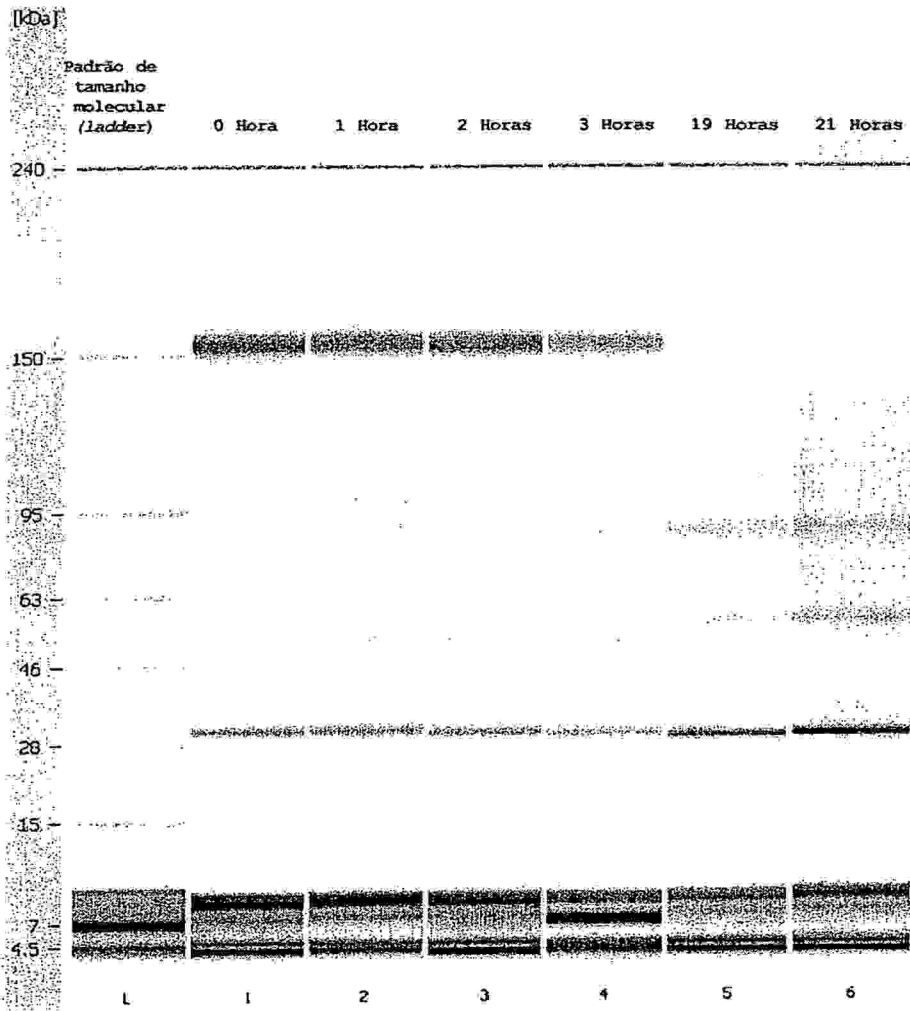
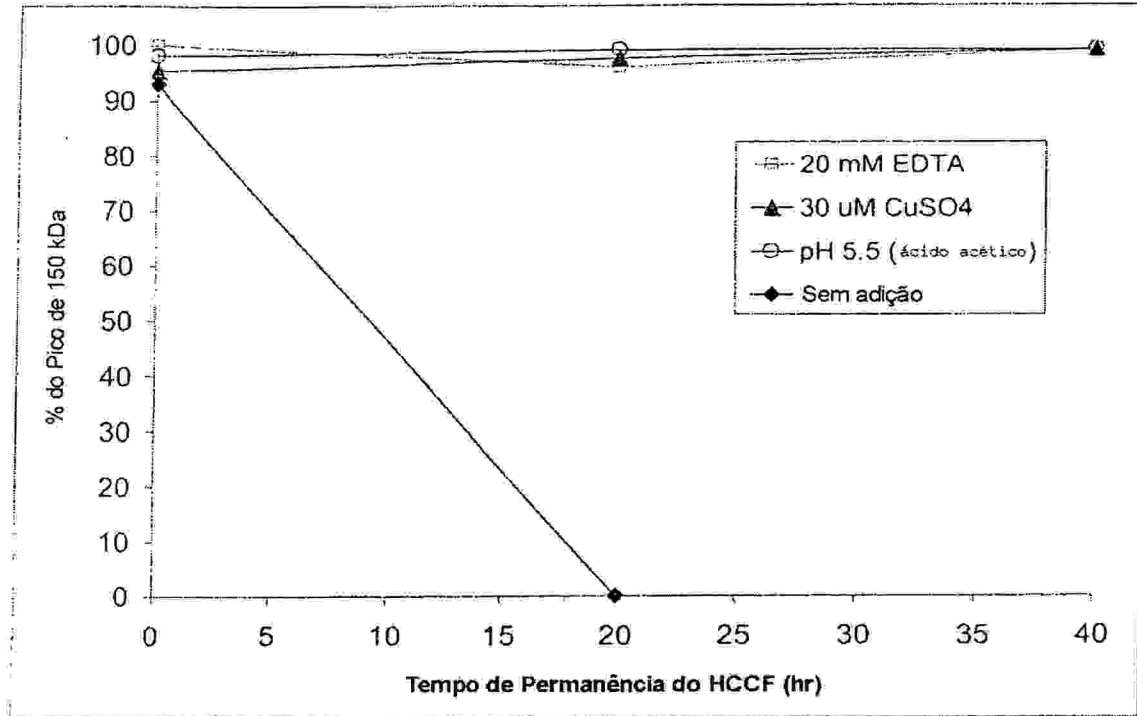
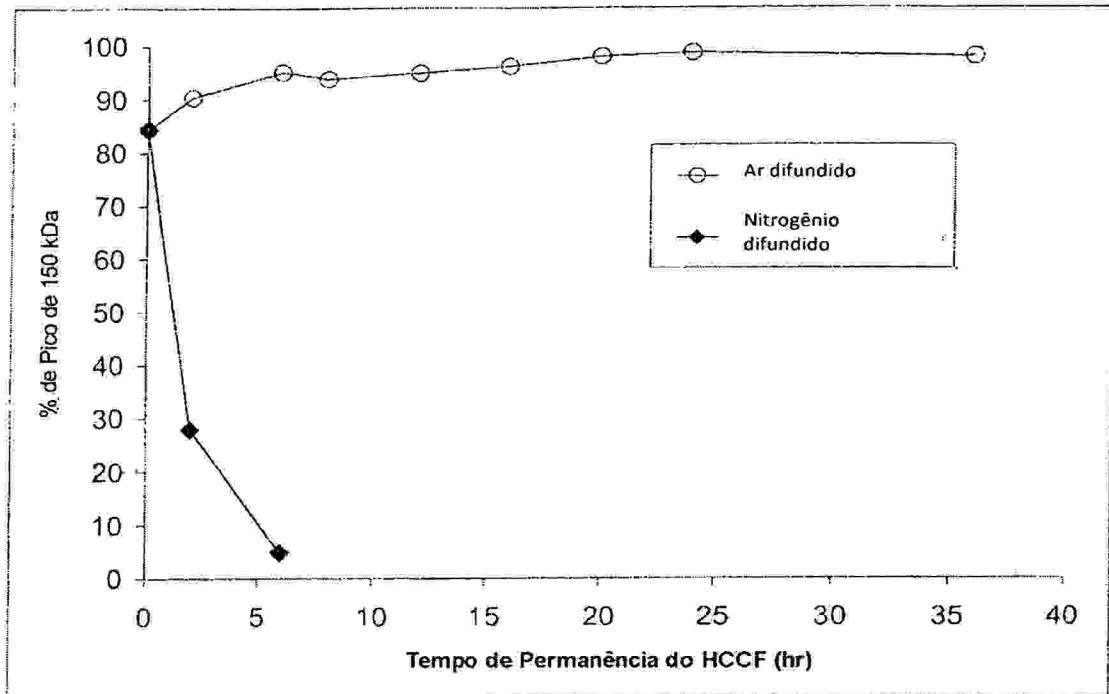


Fig.18

**Fig.19**

**Fig.20**

Cadeia Leve

1 15 30 45
DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPK
46 60 75 90
LLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQ
91 105
HYTTPPTFGQGTKVEIK

Fig.21**Cadeia Pesada**

1 15 30 45
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGL
46 60 75 90
EWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAED
91 105 120
TAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGLVTVSS

Fig.22

Tipico Processo de Cultura por Batelada ou por Batelada Alimentada

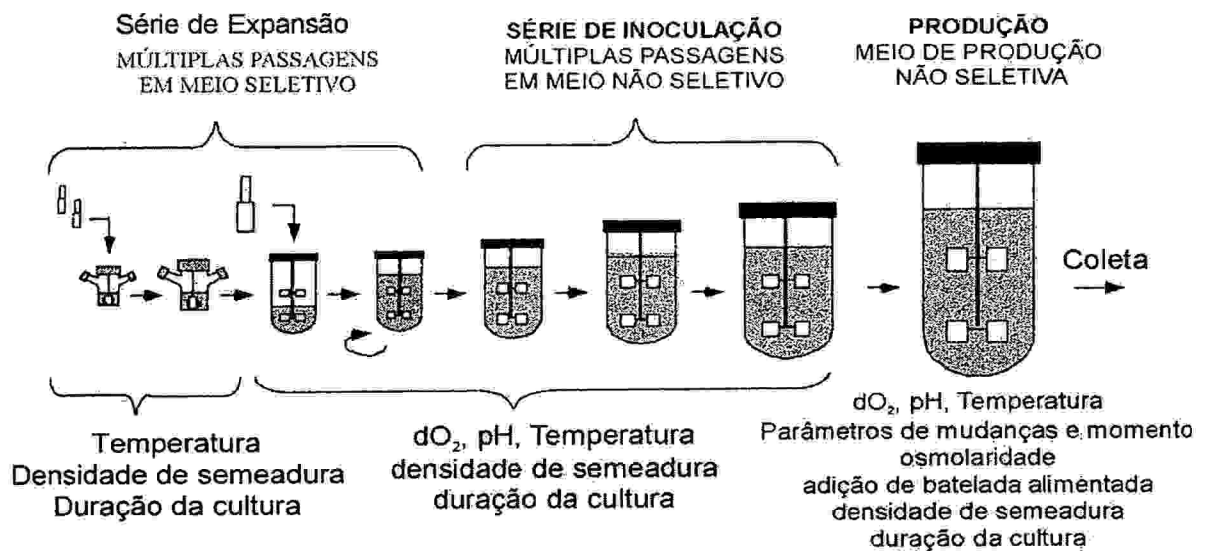


Fig.23

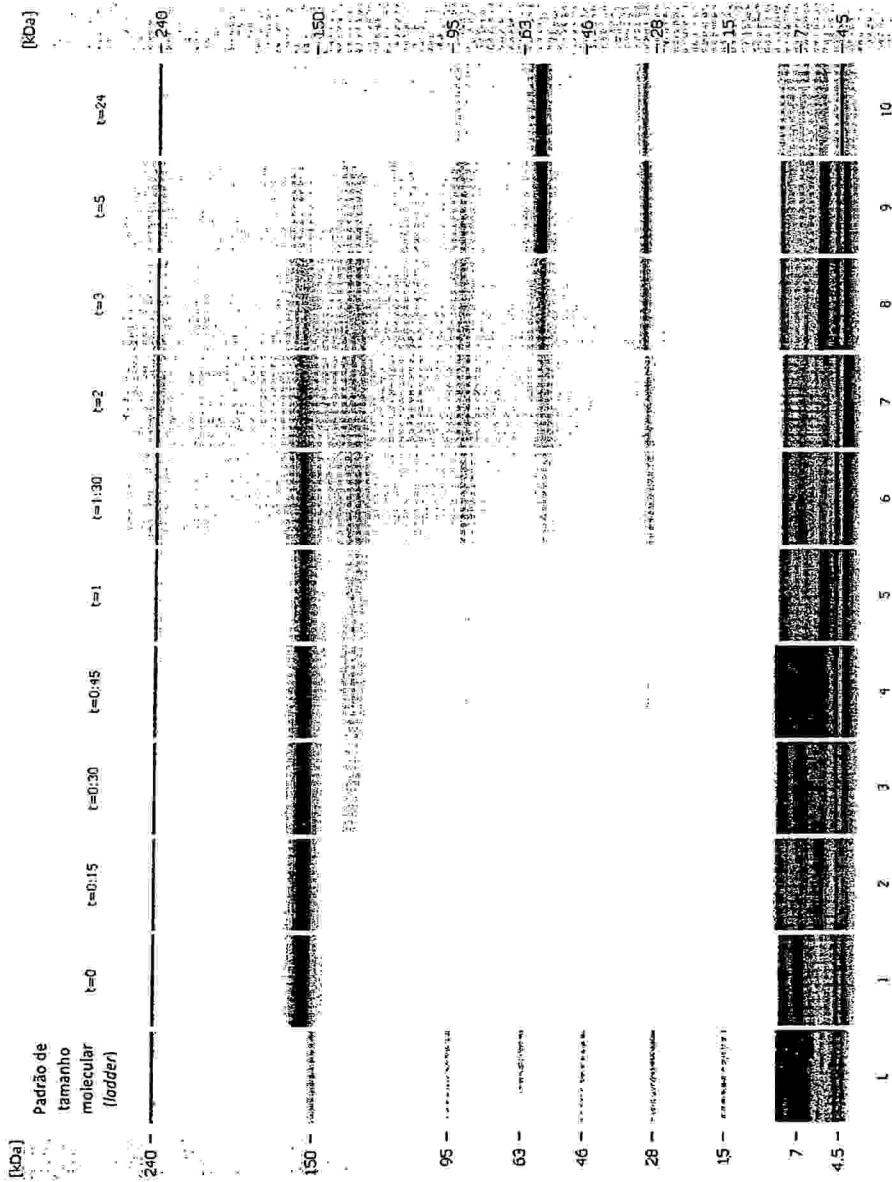


Fig.24

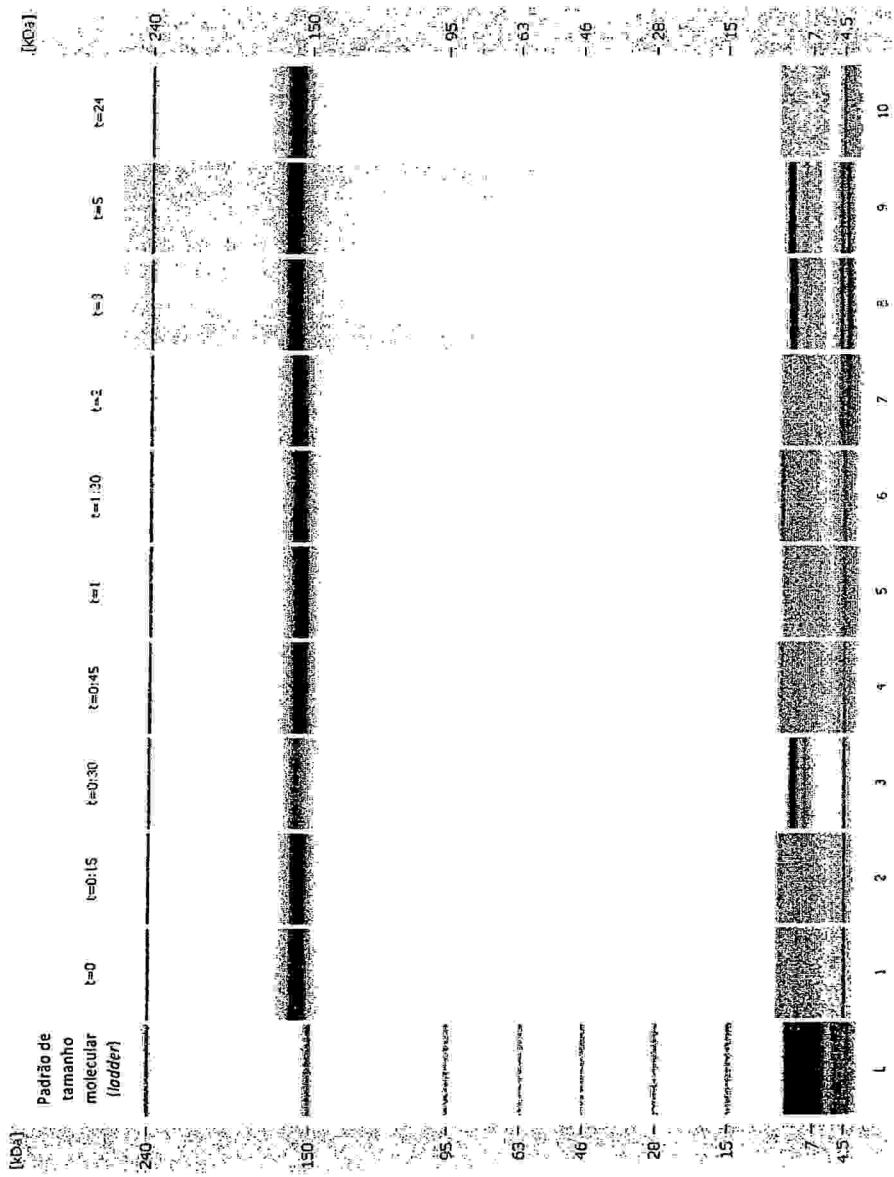


Fig.25

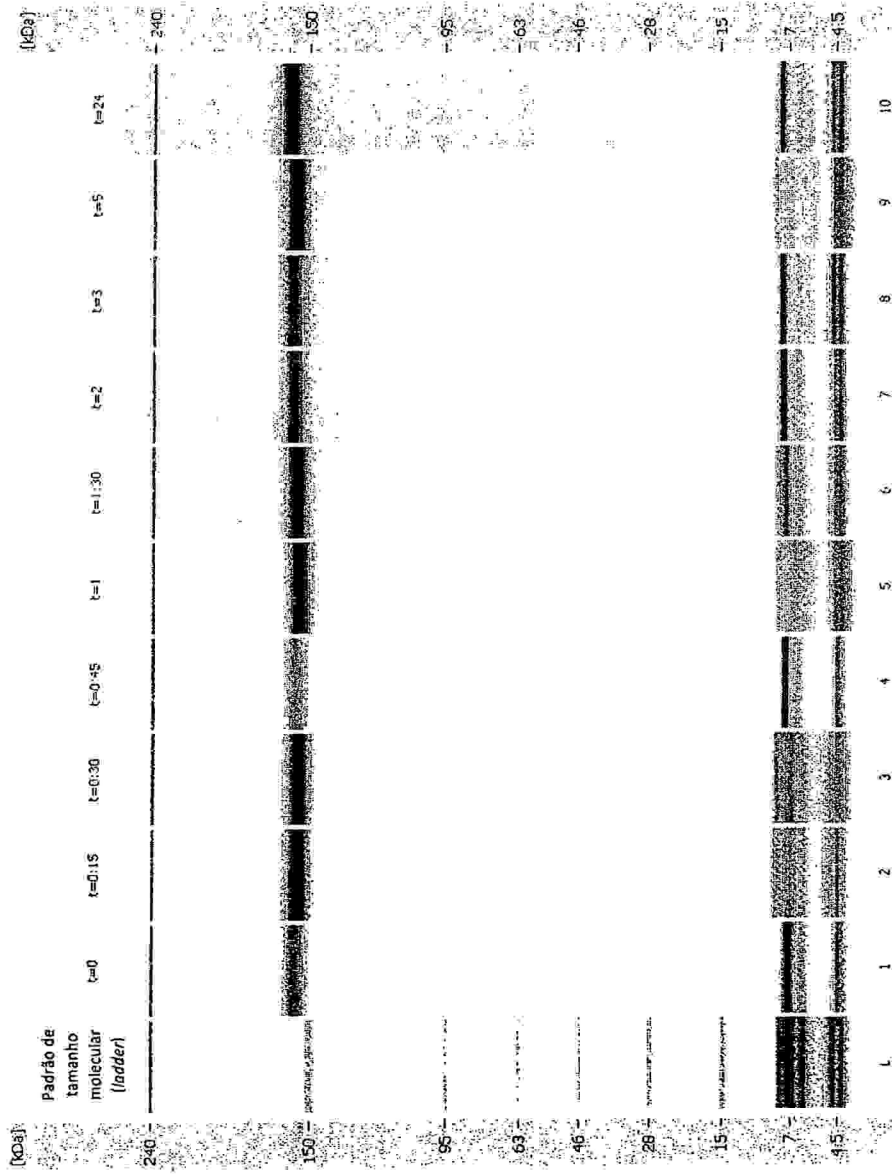


Fig.26

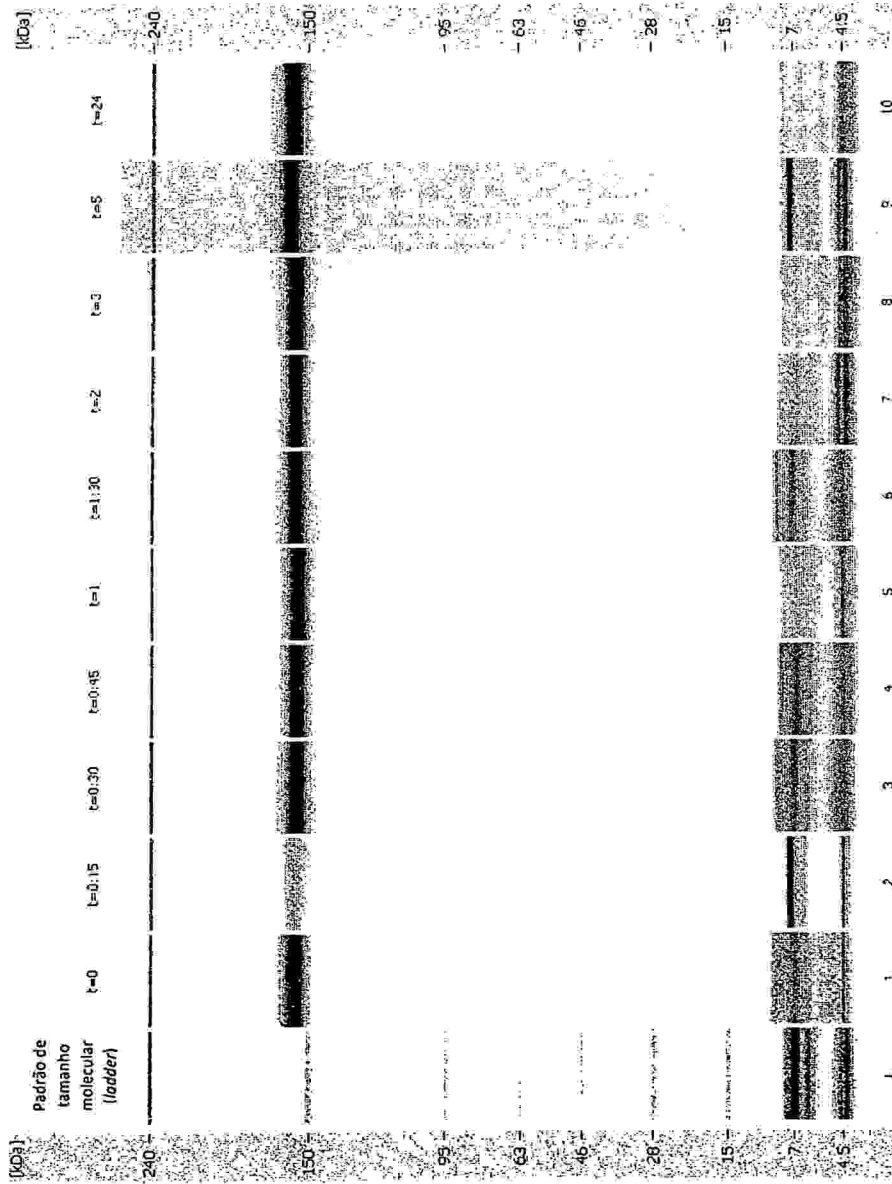


Fig.27

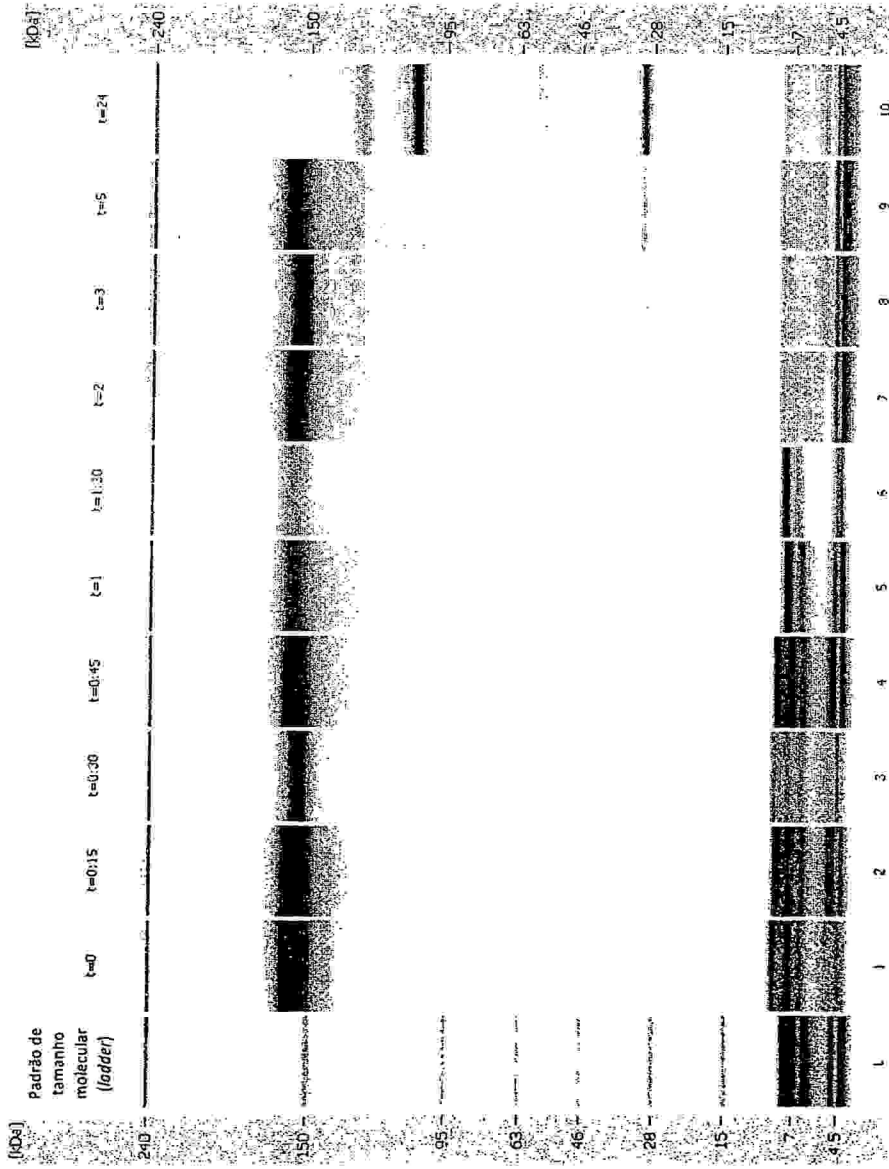


Fig.28

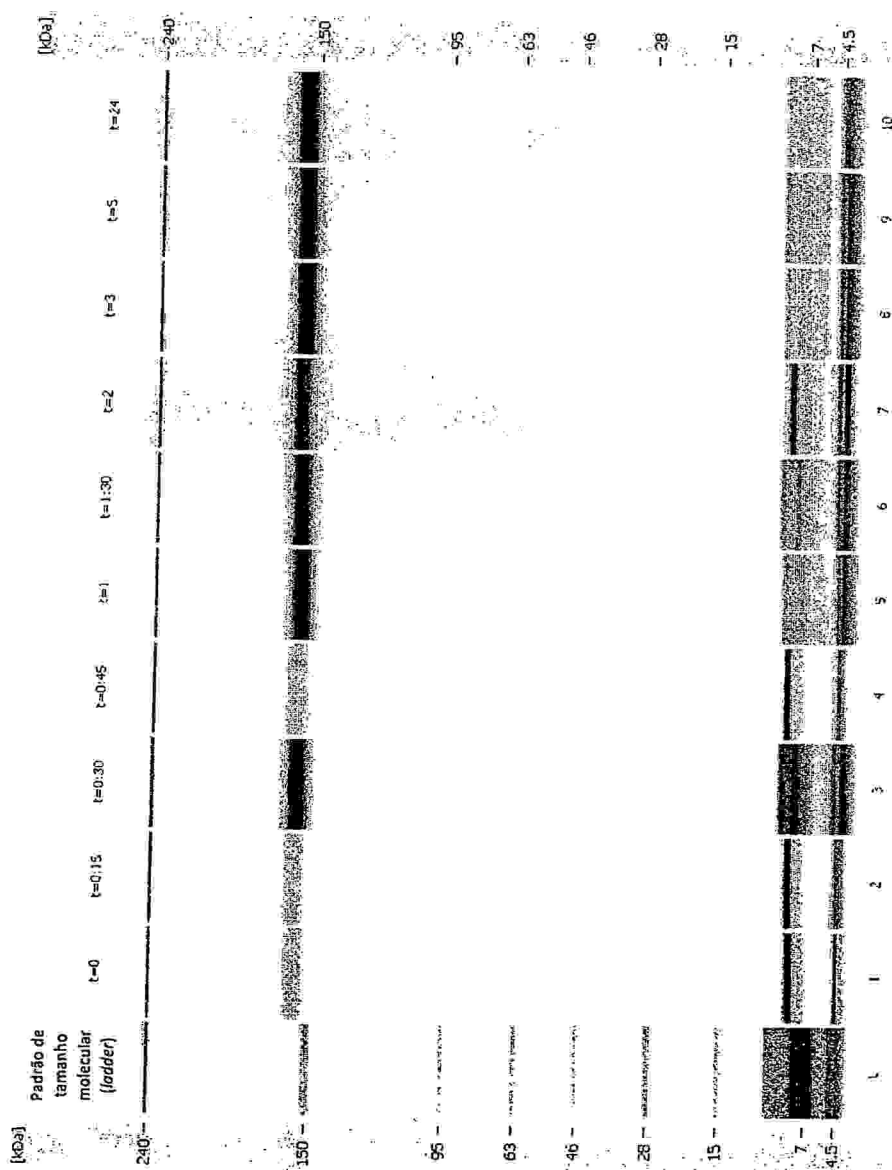


Fig.29

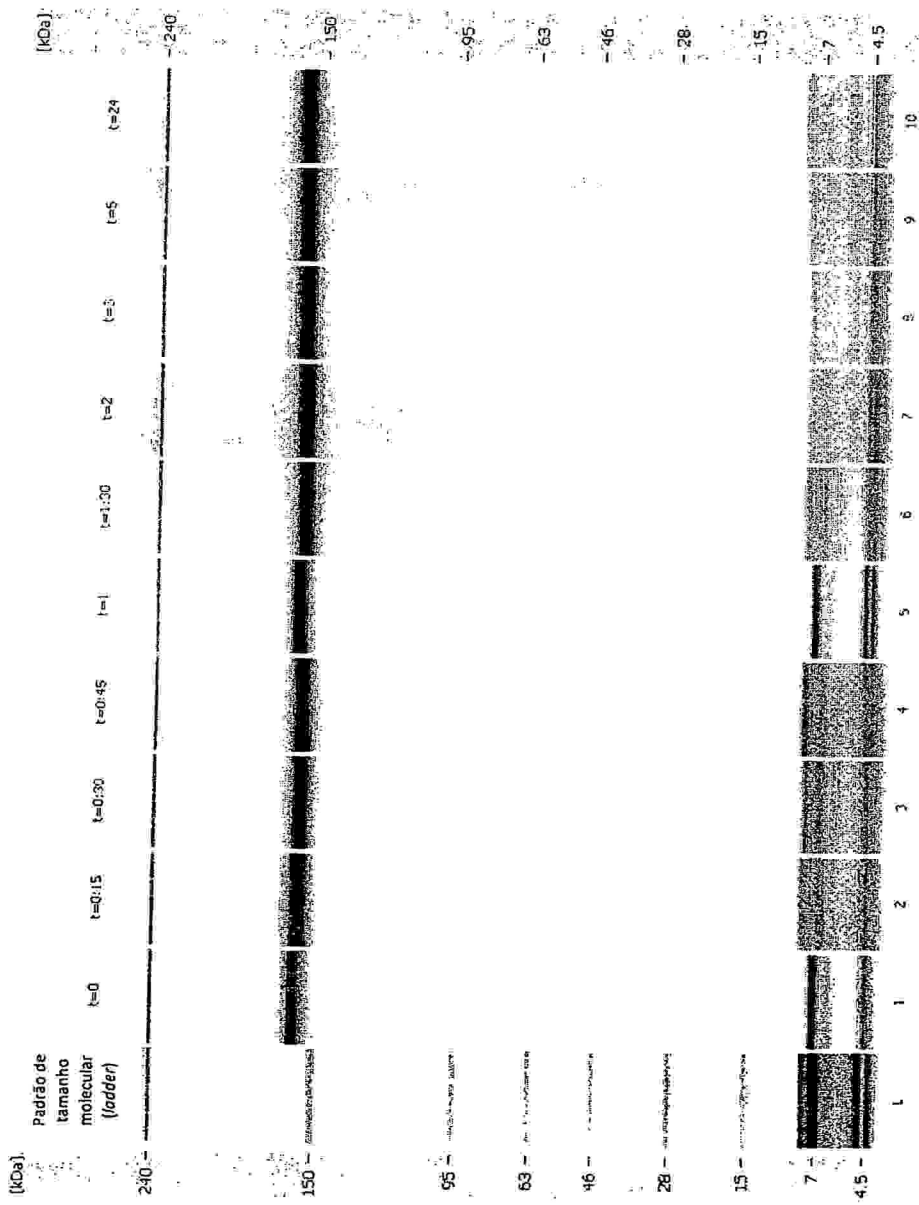


Fig.30

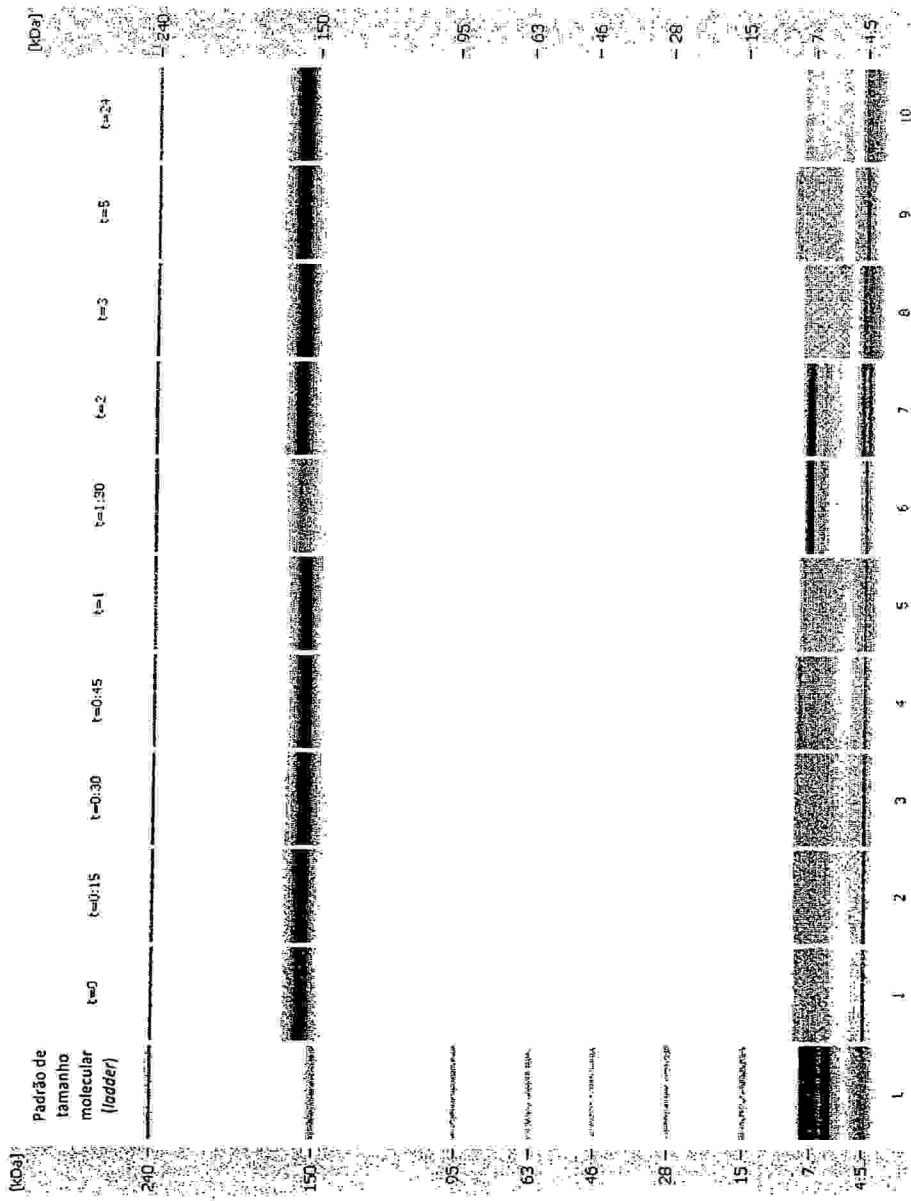


Fig.31

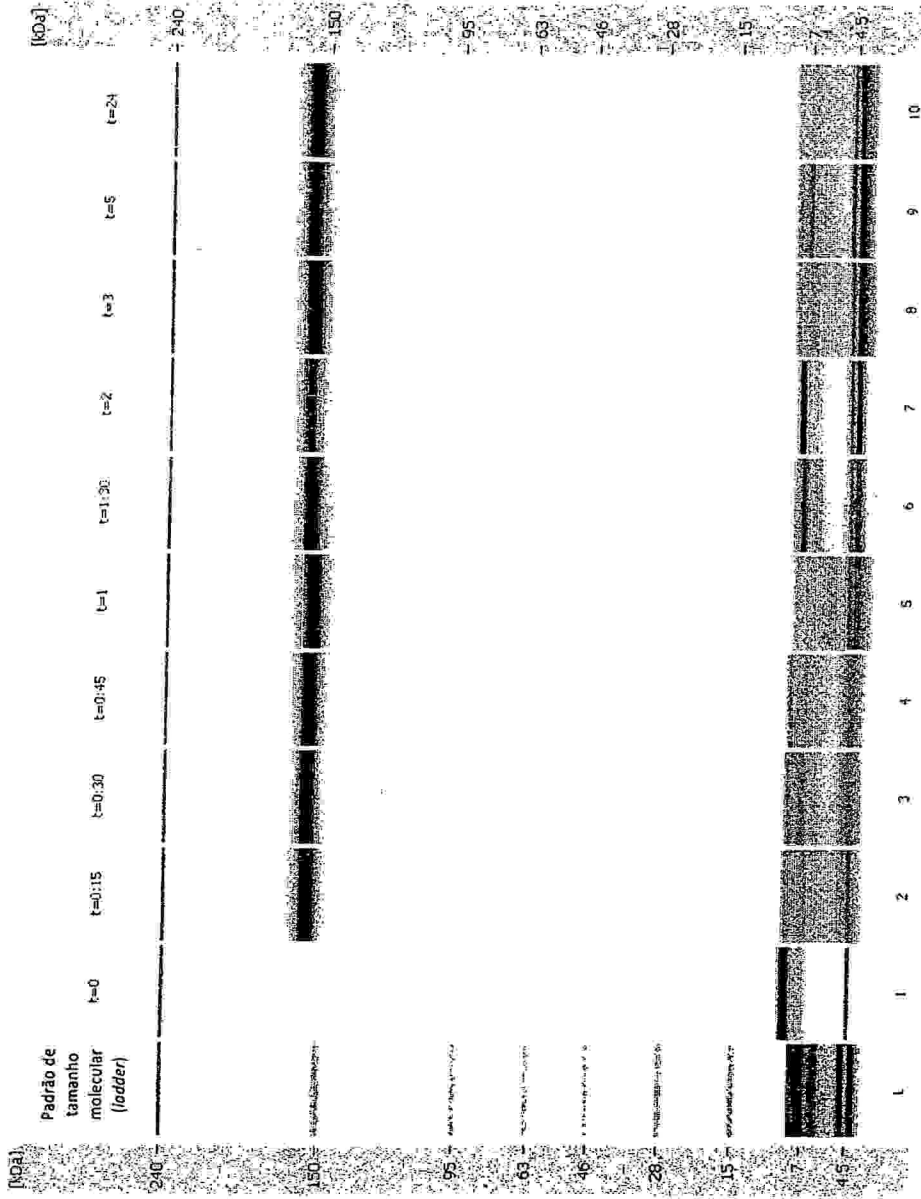


Fig.32

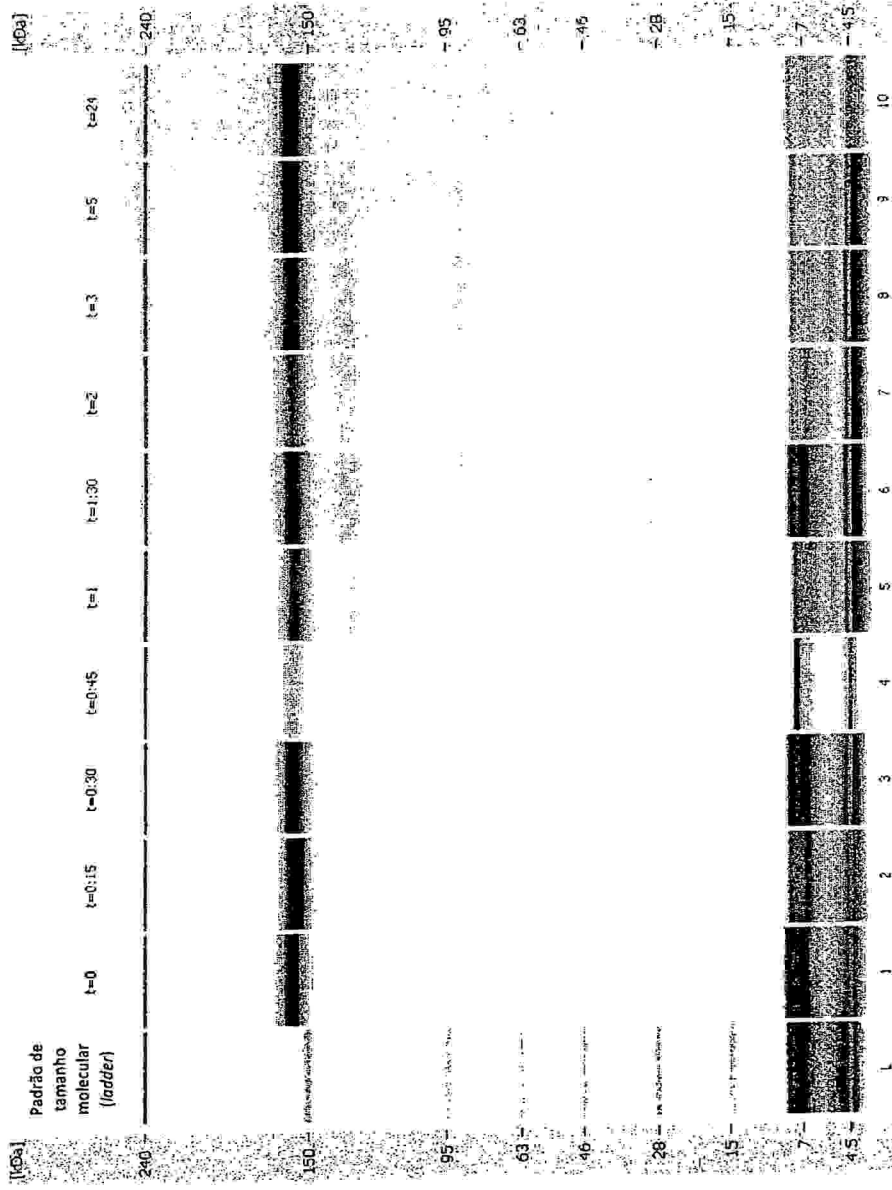


Fig.33

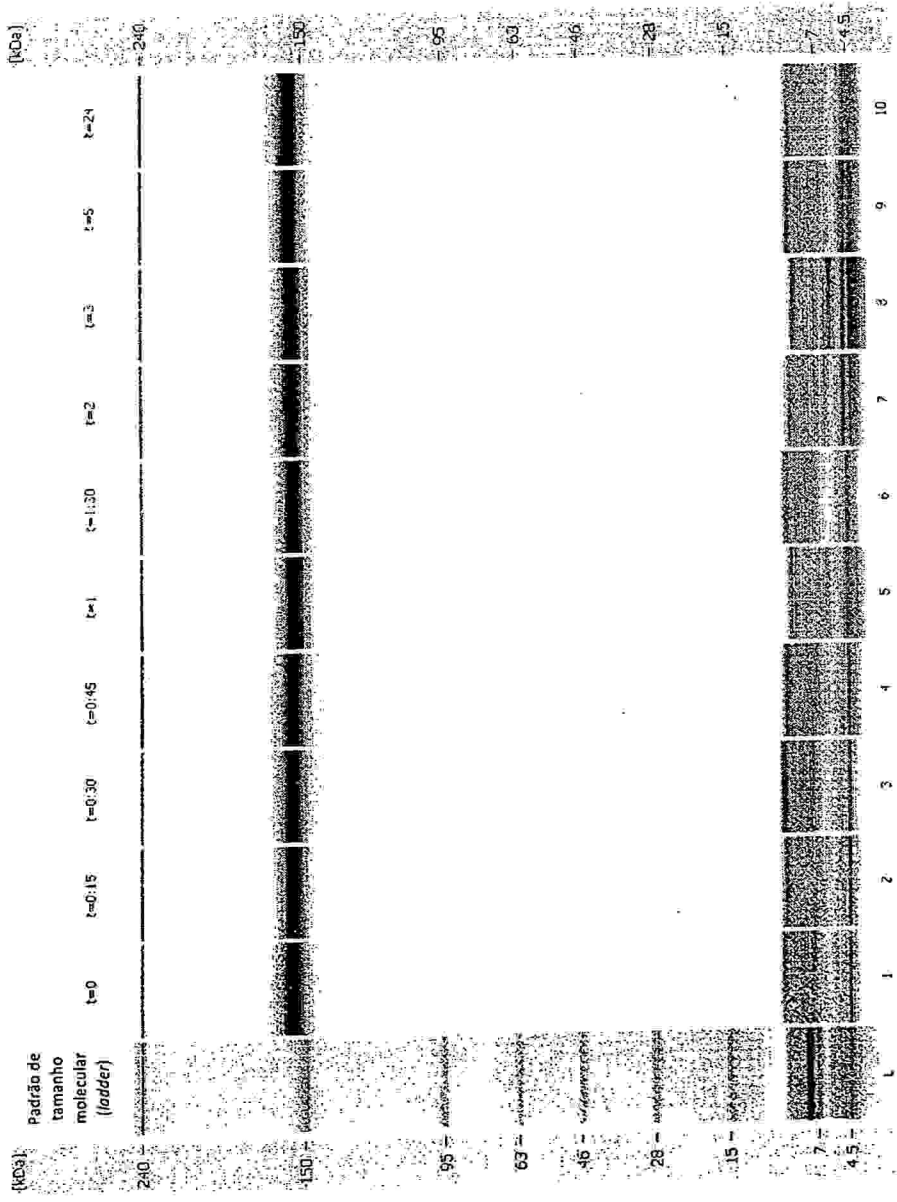


Fig.34

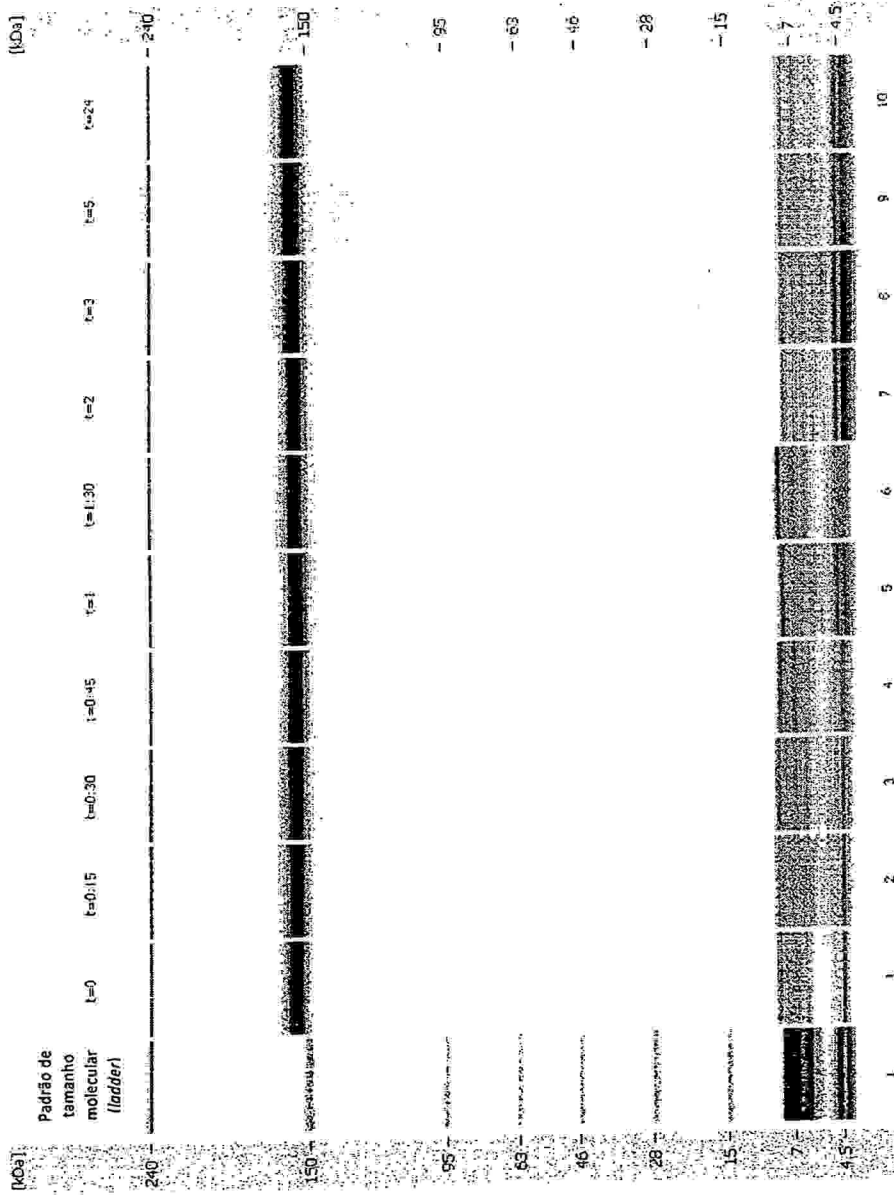


Fig.35

3
0
6
1

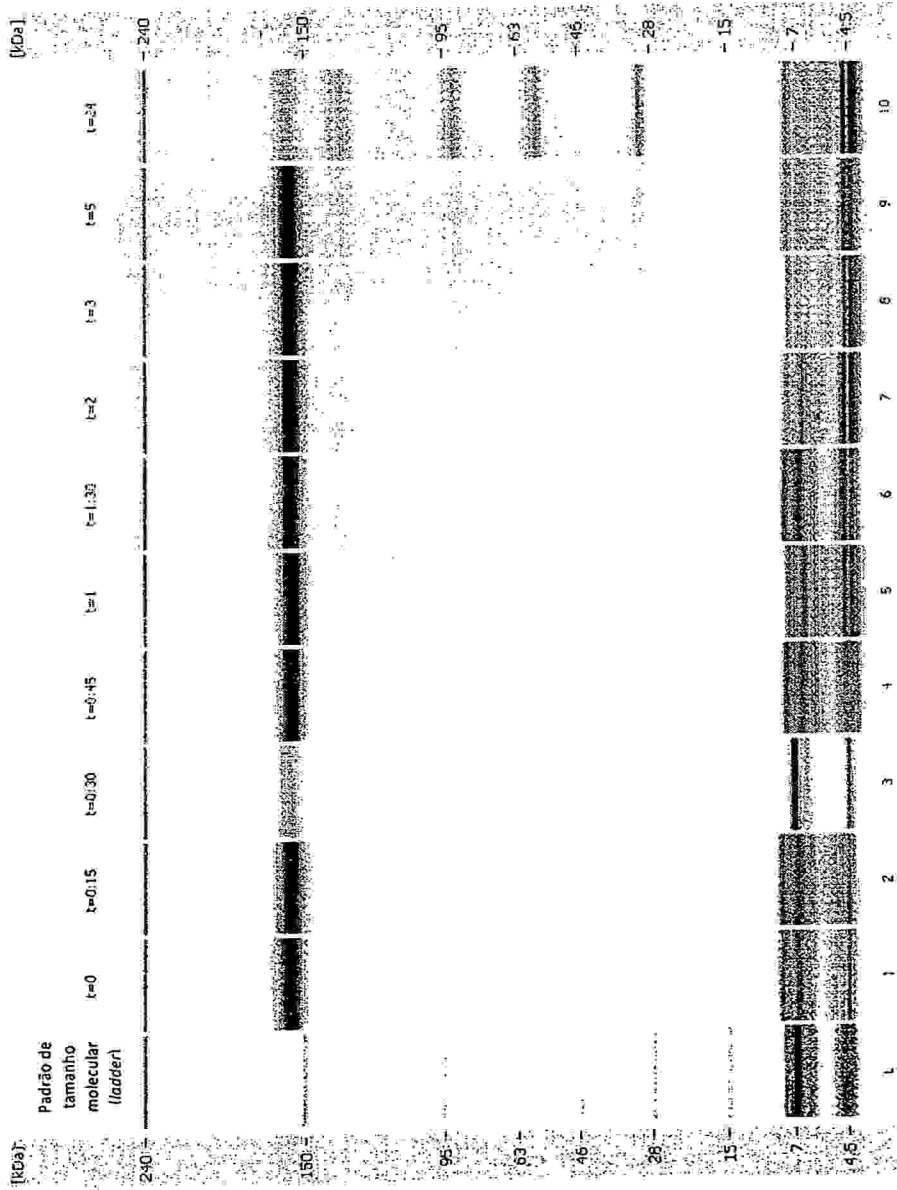


Fig.36

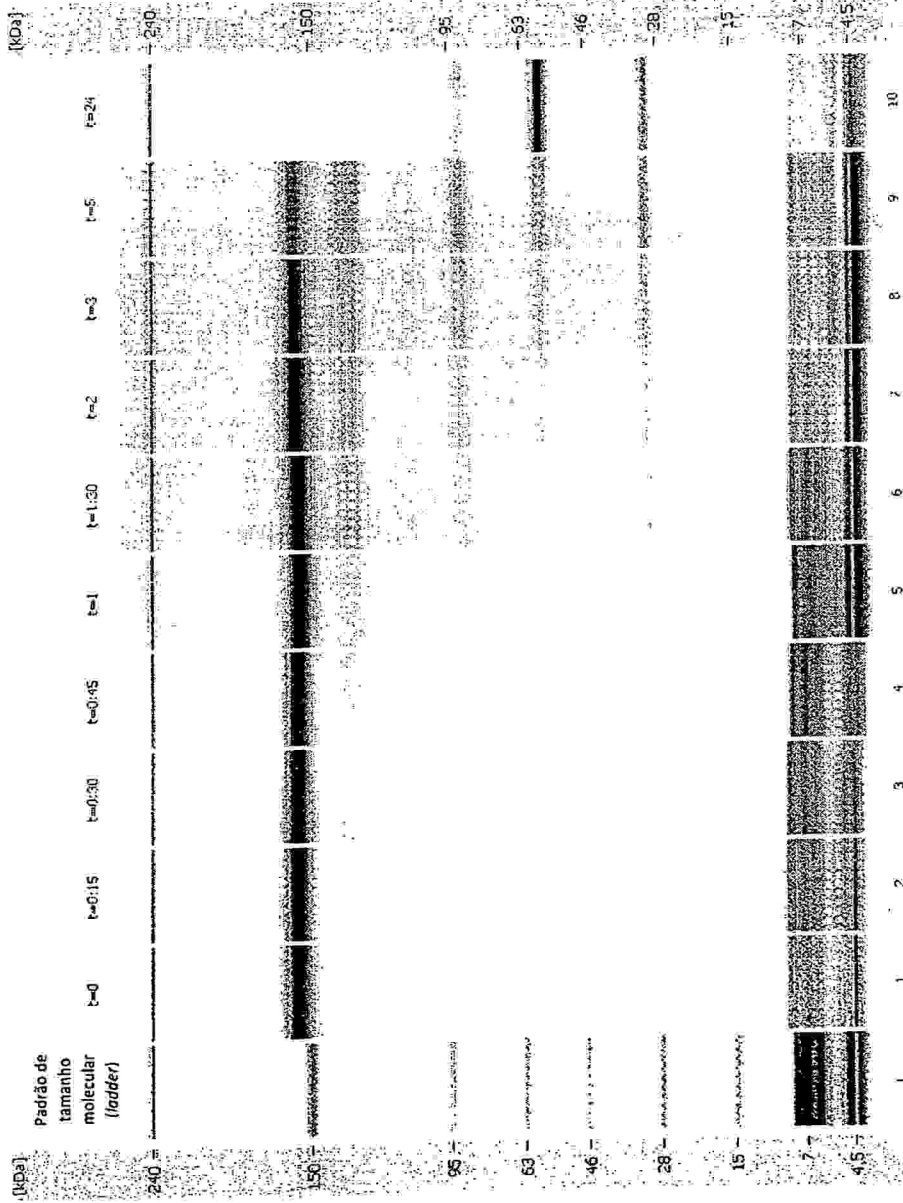


Fig.37

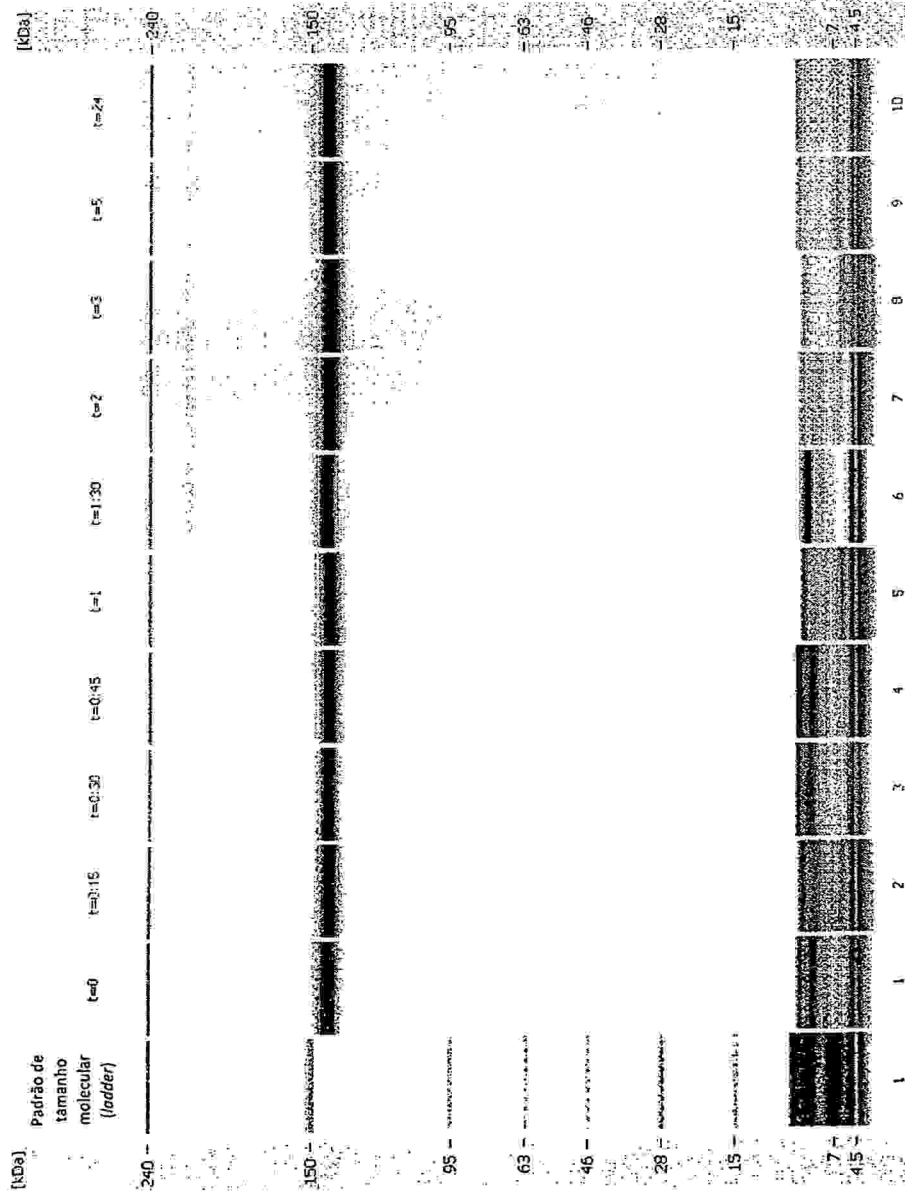


Fig.38

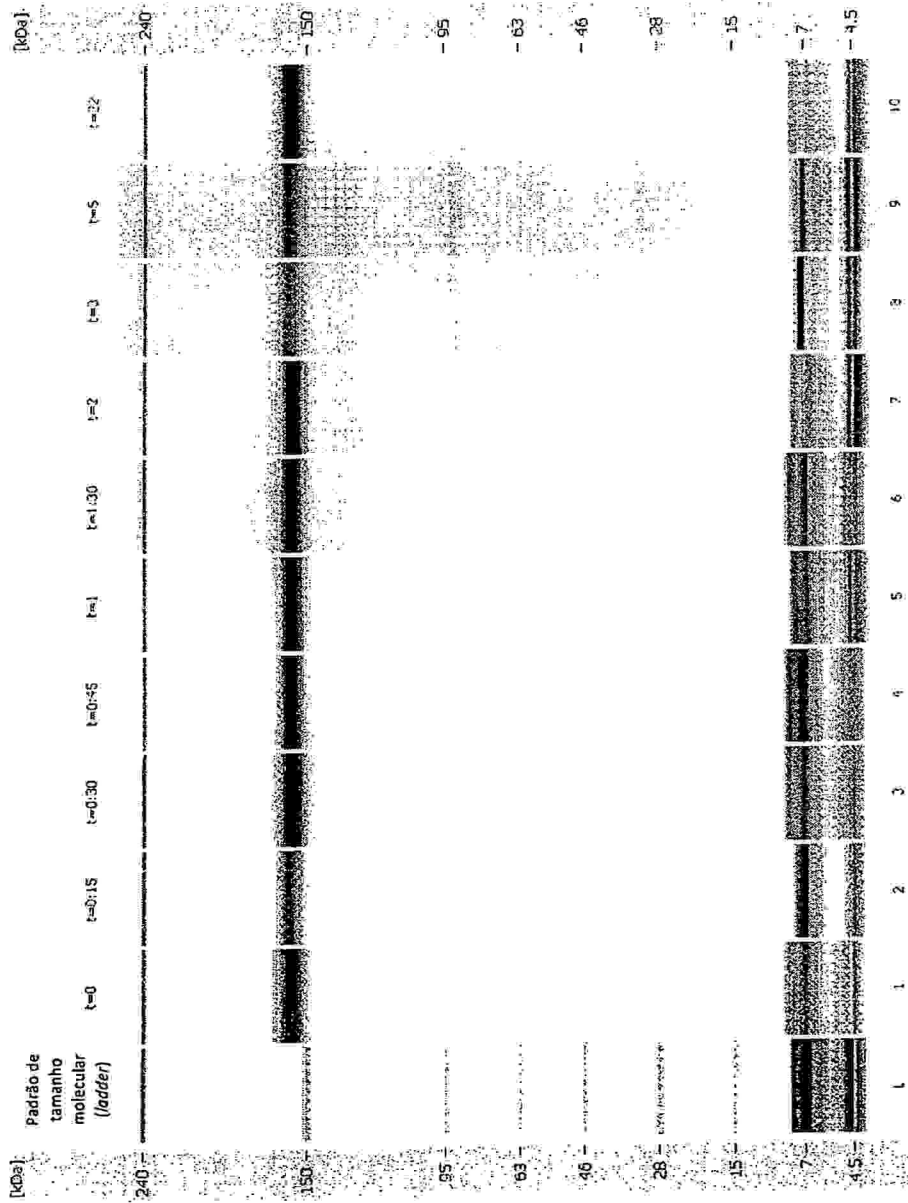
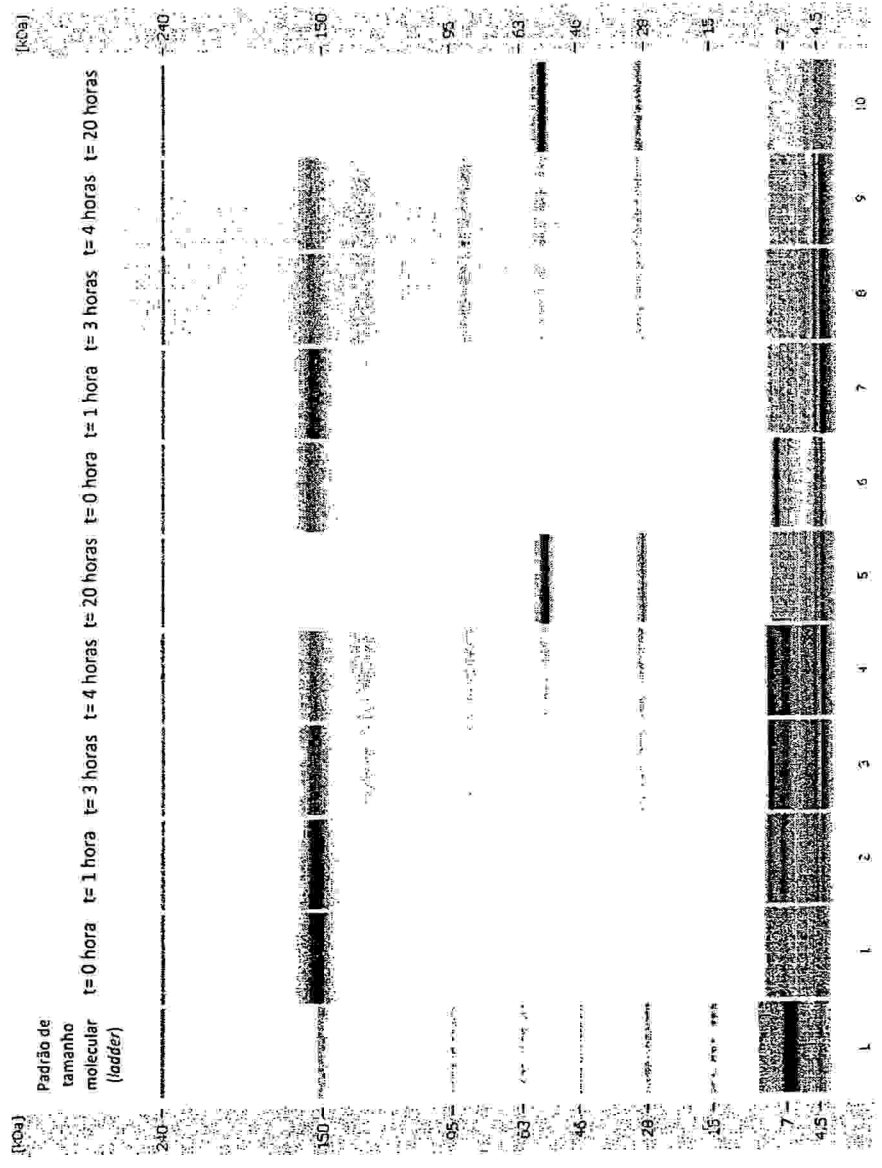


Fig.39

h
3
3



+ 0,1 mM DHEA

Fig.40

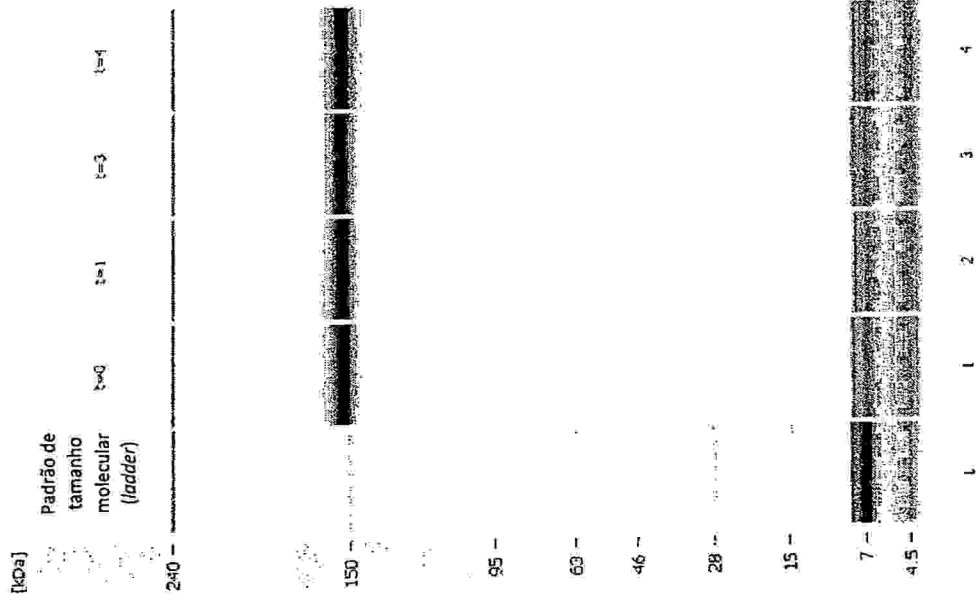


Fig.41