



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

(21) BR 11202000127-9 A2



(22) Data do Depósito: 03/07/2018

(43) Data da Publicação Nacional: 07/07/2020

(54) Título: MÉTODO PARA SELECIONAR UM HIDROLISADO DE SOJA, E, GLICOPROTEÍNA

(51) Int. Cl.: C07K 14/415; C12N 5/00; C12N 15/09; C12P 21/00; C12P 21/06.

(30) Prioridade Unionista: 02/02/2018 US 62/625,744; 06/07/2017 US 62/529,471.

(71) Depositante(es): REGENERON PHARMACEUTICALS, INC..

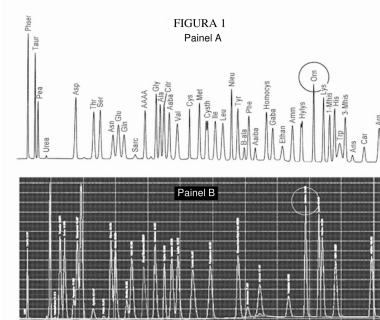
(72) Inventor(es): JOHN CHEN; SHAWN LAWRENCE; AMY JOHNSON; THEODORE LONEY; RAVINDRA PANGULE; TA-CHUN HANG; SCOTT CARVER; BERNHARD SCHILLING.

(86) Pedido PCT: PCT US2018040734 de 03/07/2018

(87) Publicação PCT: WO 2019/010191 de 10/01/2019

(85) Data da Fase Nacional: 03/01/2020

(57) Resumo: O presente pedido fornece um método para triar remessas de hidrolisado de soja para uma quantidade desejada de um componente do mesmo, como ornitina ou putrescina, e selecionar apenas as remessas de hidrolisado de soja que possuem uma quantidade desejada de tal componente. A presente divulgação também estabelece métodos para cultivar células em meios suplementados com remessas selecionadas de soja para produzir lotes mais consistentes e de alta qualidade de uma proteína de interesse. Adicionalmente, a presente divulgação fornece uma pluralidade de preparações de proteínas que foram produzidas, cada um, cultivando-se células em meios suplementados com remessas separadas de hidrolisado de soja contendo uma quantidade desejada de ornitina ou putrescina, em que cada remessa de proteína produzida exibe qualidade aprimorada da proteína de interesse ou quantidade de proteína de qualidade produzida.



MÉTODO PARA SELECIONAR UM HIDROLISADO DE SOJA, E, GLICOPROTEÍNA

INCORPORAÇÃO DE LISTAGEM DE SEQUÊNCIA

[001] O conteúdo do texto depositado com o nome "REGE009P02US_SeqList.txt", criado em 1 de fevereiro de 2018 e com 11,2 KB, é incorporado por referência na íntegra.

CAMPO DA INVENÇÃO

[002] A invenção refere-se a métodos para a cultura celular e para a produção de proteínas recombinantes. A invenção refere-se especificamente a métodos para a cultura celular em meios contendo hidrolisado de soja para obter uma produção consistente de proteína recombinante de alta qualidade.

FUNDAMENTOS

[003] Os meios de cultura celular contendo hidrolisados de proteínas, como o hidrolisado de soja, são comumente usados na produção de proteínas recombinantes a partir de células cultivadas. Contudo, os hidrolisados de proteínas podem conter compostos que impactam negativamente o crescimento celular ou a produção de proteínas recombinantes. Apesar dessas desvantagens, os hidrolisados de proteínas têm sido amplamente utilizados como suplementos na cultura celular.

[004] Os agentes terapêuticos biológicos humanos (biofarmacêuticos) são geralmente produzidos na cultura celular de mamíferos. No entanto, a qualidade e o desempenho dos agentes terapêuticos biológicos são altamente dependentes do processo de fabricação. Tebbey, P. e Declerck, P. Generics and Biosimilars Initiative Journal (2016) 5: 2, pp. 70-73 são incorporados neste documento para a fabricação de drogas biológicas com glicosilação consistente. Alterações no processo de cultura celular para a fabricação de glicoproteínas podem levar a variações no padrão de glicosilação, na presença de espécies acídicas (por exemplo, ácido siálico) ou na quantidade de glicano em uma proteína. Id. Essa variação aumenta a

heterogeneidade das isoformas proteicas na produção resultante de proteínas, o que pode alterar a estabilidade, eficácia ou imunogenicidade do agente terapêutico biológico e, finalmente, levar à rejeição do lote de proteínas.

[005] Portanto, métodos de cultura celular que eliminam a variabilidade de lote para lote no rendimento e na composição da droga são altamente desejáveis. A presente divulgação identifica certos componentes no hidrolisado de proteínas vegetais (por exemplo, hidrolisado de soja) que podem variar de remessa para remessa e alterar a composição e o rendimento de glicoproteínas de alta qualidade produzidas em cultura usando hidrolisado de soja. A presente divulgação aborda a necessidade de métodos de cultura celular melhorados, entre outras coisas, triagem de remessas de hidrolisado de proteínas vegetais e seleção daquelas remessas que incluem uma concentração desejável de um componente de hidrolisado de proteínas vegetais para uso na produção de biofarmacêuticos.

SUMÁRIO

[006] A presente divulgação se baseia em parte na descoberta de que a concentração de ornitina ou putrescina em uma remessa de hidrolisado de soja afeta a qualidade e a composição das proteínas produzidas na cultura celular usando hidrolisado de soja. A presente divulgação também fornece que as células cultivadas em meios incluindo hidrolisado de soja compreendendo certas concentrações de ornitina ou putrescina produzem maiores quantidades de proteínas de alta qualidade exibindo padrões de glicosilação mais consistentes, quantidades de perfis de glicano e ácido siálico de lote para lote.

[007] Em um aspecto, a invenção refere-se a um método de cultura de uma população de células que expressam uma glicoproteína heteróloga recombinante em meios de cultura celular compreendendo hidrolisado de soja para produzir a glicoproteína heteróloga recombinante e em que o hidrolisado de soja compreende $\leq 0,067\%$ (p/p) de ornitina ou putrescina.

[008] Em algumas modalidades, o método inclui as etapas de cultura de uma população de células que expressam uma glicoproteína heteróloga recombinante em meio de cultura celular compreendendo hidrolisado de soja contendo \leq menos de 0,67 miligrama (mg) de ornitina por grama (g) de soja (p/p) ou cerca de 0,003% - 0,067% (p/p) de ornitina. Numa modalidade, o meio de cultura contém \leq 5 mg/L de ornitina, ou cerca de 0,6 - 3 mg/L de ornitina. Em algumas modalidades, a população de células é obtida por expansão clonal de uma célula que expressa uma glicoproteína heteróloga recombinante.

[009] Num aspecto, a invenção refere-se a um método para a produção de uma glicoproteína. Em uma modalidade, o método inclui as etapas de cultura de uma população de células que expressam uma glicoproteína heteróloga recombinante em meio de cultura contendo hidrolisado de soja contendo \leq menos de 0,67 miligrama (mg) de putrescina por grama (g) de soja (p/p) ou cerca de 0,003% - 0,067% (p/p) de putrescina. Numa modalidade, o meio de cultura contém \leq 5 mg/L de putrescina ou cerca de 0,6 - 3 mg/L de putrescina. Em algumas modalidades, a população de células é obtida por expansão clonal de uma célula que expressa uma glicoproteína heteróloga recombinante.

[0010] Numa modalidade, a glicoproteína é uma molécula armadilha, como o riloncept (armadilha de IL1, divulgada, por exemplo, na Patente US. N° 6,927,004), aflibercept (armadilha de VEGF, divulgada, por exemplo, na Patente US. 7,087,411), conbercept (armadilha de VEGF, divulgada, por exemplo, na Patente US. N° 7,750,138 e 8,216,575) e etanercept (armadilha de TNF, divulgada, por exemplo, na Patente US. N° 5,610,279). Numa modalidade, \geq 10% (p/p) da quantidade total de todas as espécies de N-glicano da glicoproteína é um N-glicano A1.

[0011] Num aspecto, a invenção refere-se a um método de produção de uma glicoproteína. Noutro aspecto, a invenção refere-se a um método de

utilização de um hidrolisado de soja na produção de uma glicoproteína. Em outro aspecto, a invenção refere-se a um método de seleção de um hidrolisado de soja para uso na produção de uma glicoproteína, avaliando a qualidade da glicoproteína produzida. Em uma modalidade, o método compreende cultivar uma célula que expressa uma proteína glicosilada em um meio de cultura celular para produzir a glicoproteína, purificar a proteína glicosilada, sujeitar a proteína glicosilada purificada à análise de impressão digital de oligossacarídeos, determinar a quantidade relativa de um N-glicano A1 comparado à quantidade total de espécies de N-glicano da glicoproteína; e selecionar um hidrolisado de soja que forneça pelo menos 10% (p/p) de N-glicano A1 em comparação com a quantidade total de espécies de N-glicano da glicoproteína.

[0012] Em uma modalidade, o método inclui as etapas de preparação de um meio de cultura celular contendo um hidrolisado de soja, cultivo de uma célula que expressa a glicoproteína no meio de cultura celular, purificação da proteína glicosilada, sujeição da proteína glicosilada purificada à análise de impressão digital de oligossacarídeos, determinação da quantidade relativa de um N-glicano A1 em comparação com a quantidade total de espécies de N-glicano da glicoproteína e, em seguida, seleção do hidrolisado de soja que fornece a produção de uma glicoproteína com pelo menos 10% (p/p) de N-glicano A1 comparado à quantidade total de espécies de N-glicano da glicoproteína.

[0013] Numa modalidade, o hidrolisado de soja selecionado contém \leq 0,67 mg de ornitina por g de soja (p/p), ou cerca de 0,003% - 0,067% (p/p) de ornitina. Numa modalidade, o meio de cultura contém \leq 5 mg/L de ornitina, ou cerca de 0,6 - 3 mg/L de ornitina.

[0014] Numa modalidade, o hidrolisado de soja selecionado contém \leq 0,67 mg de putrescina por g de soja (p/p), ou cerca de 0,003% - 0,067% (p/p) de putrescina. Numa modalidade, o meio de cultura contém \leq 5 mg/L de

putrescina ou cerca de 0,6 - 3 mg/L de putrescina.

[0015] Em um aspecto, a invenção refere-se a um método de seleção de um hidrolisado de soja para uso na produção de uma glicoproteína medindo a quantidade de ornitina ou putrescina no hidrolisado de soja. Em uma modalidade, o método inclui as etapas de medição da quantidade de ornitina em um hidrolisado de soja, seleção de um hidrolisado de soja com $\leq 0,67$ mg de ornitina por g de soja ou cerca de 0,003% - 0,067% (p/p) de ornitina e combinação do hidrolisado de soja selecionado com um ingrediente adicional para formar um meio de cultura celular com ≤ 5 mg/L de ornitina ou cerca de 0,6 - 3 mg/L de ornitina. Em uma modalidade, o método inclui as etapas de medição da quantidade de putrescina em um hidrolisado de soja potencialmente útil, seleção de um hidrolisado de soja com $\leq 0,67$ mg de putrescina por g de soja ou cerca de 0,003% - 0,067% (p/p) de putrescina e combinação do hidrolisado de soja selecionado com um ingrediente adicional para formar um meio de cultura celular com ≤ 5 mg/L de putrescina ou cerca de 0,6 - 3 mg/L de putrescina.

[0016] Em um aspecto, a invenção se refere a uma glicoproteína compreendendo um N-glicano A1 e é fornecida pelo menos uma outra espécie de N-glicano em que a quantidade relativa do N-glicano A1 é de pelo menos 10% (p/p) da quantidade total de N-glicanos da glicoproteína. Numa modalidade, a quantidade relativa de N-glicano A1 é de cerca de 10% a 17% (p/p).

[0017] Em uma modalidade, a glicoproteína também possui um N-glicano A2, um N-glicano A2F, um N-glicano A1F, um N-glicano NGA2F, um N-glicano NA2G1F, um N-glicano NA2 e um N-glicano NA2F.

[0018] Numa modalidade, a glicoproteína contém 8 - 65 moles de ácido siálico por mole de glicoproteína. Numa modalidade em que a glicoproteína é riloncept, qualquer um dos resíduos de asparagina N37, N98, N418 e N511 da SEQ ID NO: 1 contém um N-glicano A1. Numa modalidade

em que a glicoproteína é aflibercept, qualquer um dos resíduos de asparagina N123 e N196 da SEQ ID NO: 2 contém um N-glicano A1.

[0019] Numa modalidade, a quantidade relativa de N-glicano A1 da glicoproteína é determinada comparando a área sob o pico do N-glicano A1 com as áreas totais sob o pico para todos os N-glicanos obtidos a partir de uma impressão digital de oligossacarídeo da glicoproteína obtida por eletroforese capilar.

[0020] Em um aspecto, é fornecido um método de fabricação de hidrolisado de soja com uma quantidade reduzida de ornitina ou putrescina. Em uma modalidade, o método compreende as etapas de digestão enzimática do extrato de soja em um vaso de reação livre de resíduos, medindo a quantidade de ornitina no hidrolisado de soja e selecionando aqueles lotes de hidrolisado de soja contendo ornitina $\leq 0,067\%$ (p/p) ou putrescina para uso em um meio de cultura celular. Em uma modalidade, o método compreende as etapas de digestão enzimática do extrato de soja em um vaso de reação livre de resíduos, medindo a quantidade de putrescina no hidrolisado de soja e selecionando o hidrolisado de soja com ornitina ou putrescina $\leq 0,067\%$ (p/p) para uso em um meio de cultura celular.

[0021] O termo "cerca de" pode ser compreendido como dentro de 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5%, 0,1%, 0,05%, ou 0,01% do valor declarado. A menos que explicitado a partir do contexto, todos os valores numéricos fornecidos neste documento são modificados pelo termo "cerca de."

[0022] Embora métodos e materiais semelhantes ou equivalentes aos descritos neste documento possam ser usados na prática ou nos testes da presente divulgação, os métodos e materiais adequados são descritos abaixo. Todas as publicações, pedidos de patentes, patentes e outras referências mencionadas neste documento estão incorporadas a título de referência em suas totalidades. As referências citadas neste documento não são tomadas

como estado da técnica para a divulgação reivindicada. Em caso de conflito, o presente relatório descritivo, incluindo definições, servirão de base para controle. Além disso, os materiais, métodos e exemplos são apenas ilustrativos e não pretendem ser um fator limitante. Outras características e vantagens da divulgação tornar-se-ão aparentes a partir da seguinte descrição detalhada e reivindicações.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

[0023] Qualquer um dos aspectos e modalidades acima pode ser combinado com qualquer outro aspecto ou modalidade, conforme divulgado aqui nas seções Resumo e/ou Descrição Detalhada.

[0024] A patente ou arquivo de pedido contém pelo menos uma figura executada em cor. Cópias dessa patente ou publicação de pedido de patente com figuras coloridas serão fornecidas pelo Escritório mediante solicitação e pagamento da taxa necessária.

[0025] Vários objetos e vantagens e uma compreensão mais completa da presente invenção são aparentes e mais facilmente apreciados por referência à Descrição Detalhada a seguir e às reivindicações anexas quando tomadas em conjunto com o Desenho anexo, em que:

A Figura 1 representa um perfil de eluição cromatográfica de aminoácidos derivados de ninidrina. O eixo X representa o tempo de eluição de uma coluna de cromatografia (tempo de retenção) e o eixo Y representa a absorbância da luz a 570 nm. O painel A mostra a remessa que não atende aos critérios para produzir uma mistura aceitável de N-glicano pelos padrões da FDA. O painel B representa uma análise de aminoácidos aceitável do hidrolisado de proteína de soja. O pico representando ornitina é circulado em ambos os cromatogramas.

[0026] A Figura 2 representa um eletroforetograma capilar de oligossacarídeos liberados de uma glicoproteína pelo peptídeo: digestão com N-glicosidase F (PNGase F). O eixo X representa o tempo de eluição de um

capilar e o eixo Y representa a absorvância da luz ou a intensidade da fluorescência. Os picos são numerados de 1 a 21. O pico 1 representa o N-glicano A2; o pico 4 representa o N-glicano A2F; o pico 11 representa o N-glicano A1; o pico 14 representa o N-glicano A1F; o pico 16 representa o N-glicano NGA2F; o pico 19 representa o N-glicano NA2G1F; o pico 20 representa o N-glicano NA2; e o pico 21 representa o N-glicano NA2F.

[0027] A Figura 3 representa uma mancha de pontos da quantidade relativa de N-glicano A1 em função da concentração de ornitina e citrulina no hidrolisado de proteína de soja. O eixo X mostra a concentração de citrulina ou ornitina em mg/L. O eixo Y representa a área relativa do pico 11, que representa o N-glicano A1.

[0028] A Figura 4 é um gráfico de correlação que descreve a correlação negativa da concentração de ornitina no hidrolisado de soja (quadrante inferior direito) com a quantidade relativa do pico 11 no aflibercept (N-glicano A1, quadrante superior esquerdo).

[0029] A Figura 5 é um gráfico de correlação representando (i) a correlação negativa da concentração de ornitina no hidrolisado de soja (quadrante inferior esquerdo) com o título final de riloncept (quadrante superior direito); e (ii) a correlação positiva da concentração de ornitina no hidrolisado de soja (quadrante inferior esquerdo) com o acúmulo de lactato no meio (quadrante inferior esquerdo).

[0030] A Figura 6A é um par de gráficos que representam a quantidade de poliamina sintetizada a partir de uma cultura celular de CHO, representada como $IVCD \times 10^6$ células-dia/ml ou como título (em gramas por ml) como uma função do dia de remessa sob várias condições, incluindo: controle, altas e baixas concentrações de ornitina, putrescina, MFC e IPC.

[0031] A Figura 6B é uma tabela que fornece as condições experimentais de cada grupo de estudo representado na Figura 6A.

DESCRIÇÃO DETALHADA

[0032] Deve ser entendido que o escopo da presente divulgação não se limita aos métodos e condições experimentais específicos descritos, pois esses métodos e condições podem variar. Também deve ser entendido que a terminologia usada neste documento é para a finalidade de descrever modalidades particulares somente, e não pretende ser limitante.

[0033] A menos que definido de outra forma, todos os termos técnicos e científicos usados neste documento têm o mesmo significado conforme comumente entendido por um versado na técnica ao qual esta invenção pertence. Embora quaisquer métodos e materiais semelhantes ou equivalentes aos descritos neste pedido possam ser usados na prática ou teste da presente invenção, os métodos e materiais específicos são agora descritos. Unidades, prefixos e símbolos podem ser denotados em sua forma padrão aceita pela indústria. As faixas numéricas mencionadas neste documento estão em colchetes, o que significa que incluem os números que definem a faixa. Salvo indicação em contrário, os termos "um" ou "uma" devem ser interpretados como significando "pelo menos um de".

[0034] Os títulos das seções usados neste documento são para fins organizacionais apenas e não devem ser interpretados como limitadores do objeto descrito. Os métodos e técnicas descritos neste documento são geralmente realizados de acordo com métodos convencionais conhecidos na técnica e, tal como descrito em várias referências gerais e mais específicas que são citadas e discutidas ao longo do presente relatório descritivo, a menos que indicado de outra forma. Ver, por exemplo, Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3^a ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (2001) e Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates (1992), Harlow and Lane *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (1990), e Julio E. Celis, *Cell Biology: A Laboratory Handbook*, 2^a ed., Academic Press, New York, NY (1998) e Dieffenbach e

Dveksler, PCR Primer: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (1995). Todas as publicações mencionadas nesta divulgação são incorporadas neste documento por referência na sua totalidade.

Definições

[0035] A menos que definido de outra forma, todos os termos técnicos e científicos usados neste documento têm o mesmo significado conforme comumente entendido por um versado na técnica ao qual esta invenção pertence.

[0036] A frase "quantidade relativa" significa a quantidade de uma espécie molecular sobre a quantidade total de todas as espécies moleculares de um tipo geral. Por exemplo, a quantidade relativa de um glicano A1 (ou seja, (GlcNAc)₂(Man)₃(GlcNAc)₂(Gal)₂(SA)₁) é calculada como a quantidade de A1/soma da quantidade de todos os glicanos de N. A quantidade relativa pode ser expressa como quantidades absolutas de massa a massa (ou seja, grama por grama) ou uma porcentagem, ou seja, % (p/p).

[0037] "Ornitina" é um aminoácido codificante da não proteína envolvida no ciclo da ureia, síntese de poliamina e metabolismo da arginina. Sabe-se também que a ornitina influencia o conteúdo de glicofomas das proteínas recombinantes. Ver PCT/US2014/069378. A ornitina é atuada por várias enzimas. Por exemplo, a ornitina descarboxilase catalisa a conversão de ornitina em putrescina na via biossintética da poliamina. Ver Pegg A, J. de Biol. Chem. (2006) 281:21 pp. 14532. Além disso, a conversão de ornitina em citrulina é catalisada pela ornitina transcarbamilase como parte do ciclo da ureia. O metabolismo da ornitina ocorre no citosol e na mitocôndria de células em cultura. A presença de putrescina ou presença de ornitina foi considerada crítica para o crescimento e a produtividade de células cultivadas em meios quimicamente definidos, no entanto, o impacto nos atributos críticos de qualidade de uma proteína produzida por essas células não foi descrito.

[0038] "Putrescina" é um aminoácido não codificador de proteínas, uma poliamina, envolvida no ciclo da ureia. A putrescina (também conhecida como 1,4-Diaminobutano, com uma fórmula química $C_4H_{12}N_2$) é produzida pela descarboxilação da ornitina e serve como precursor do gama-aminobutirato (γ -aminobutirato).

[0039] Tal como utilizado neste documento "peptídeo", "polipeptídeo" e "proteína" são utilizados alternadamente e referem-se a uma molécula compreendendo dois ou mais resíduos de aminoácidos ligados uns aos outros por uma ligação peptídica. Peptídeos, polipeptídeos e proteínas também podem incluir modificações como glicosilação, fixação lipídica, sulfatação, gama-carboxilação de resíduos de ácido glutâmico, alquilação, hidroxilação e ADP-ribosilação. Peptídeos, polipeptídeos e proteínas podem ser de interesse científico ou comercial, incluindo medicamentos à base de proteínas (bioterapêuticos). Peptídeos, polipeptídeos e proteínas incluem, entre outras coisas, anticorpos e proteínas quiméricas ou de fusão. Os peptídeos, polipeptídeos e proteínas podem ser produzidos por linhagens de células animais recombinantes, como linhagens de células de mamíferos, usando métodos de cultura celular.

[0040] O termo "sequência polinucleotídica" ou "sequência peptídica", conforme utilizado neste documento, refere-se a polímeros de ácidos nucleicos que codificam proteínas de interesse, como proteínas quiméricas (como moléculas armadilha), anticorpos ou porções de anticorpos (por exemplo, VH, VL, CDR3) que são produzidos como uma droga biofarmacêutica. A sequência polinucleotídica pode ser fabricada por técnicas de manipulação genética (por exemplo, uma sequência que codifica uma proteína quimérica ou uma sequência otimizada por códon, uma sequência sem íntron) e introduzida em uma célula, onde pode residir como um epissoma ou ser integrado ao genoma da célula. A sequência polinucleotídica pode ser uma sequência que ocorre naturalmente que é introduzida em um

sítio ectópico dentro do genoma da célula hospedeira. A sequência peptídica pode ser heteróloga, como uma sequência que ocorre naturalmente de outro organismo, uma sequência recombinante, uma sequência geneticamente modificada ou, inter alia, uma sequência expressa sob o controle de um promotor do tipo diferente do selvagem, por exemplo, uma sequência de nucleotídeos codificando um ortólogo humano, pelo qual a célula hospedeira (produção) é uma célula CHO.

[0041] A frase "proteína de ligação ao antígeno" inclui uma proteína que possui pelo menos uma CDR e é capaz de reconhecer seletivamente um antígeno, ou seja, é capaz de se ligar a um antígeno com um KD que esteja pelo menos na faixa micromolar. As proteínas de ligação a antígeno terapêuticas (por exemplo, anticorpos terapêuticos) requerem frequentemente um KD que esteja na faixa nanomolar ou picomolar. Tipicamente, uma proteína de ligação ao antígeno inclui duas ou mais CDRs, por exemplo, 2, 3, 4, 5 ou 6 CDRs. Exemplos de proteínas de ligação ao antígeno incluem anticorpos, fragmentos de ligação ao antígeno de anticorpos, como polipeptídeos que contêm as regiões variáveis das cadeias pesadas e cadeias leves de um anticorpo (por exemplo, fragmento Fab, fragmento F(ab')₂) e proteínas que contêm as regiões variáveis de cadeias pesadas e cadeias leves de um anticorpo e contendo aminoácidos adicionais das regiões constantes de cadeias pesadas e/ou leves (como um ou mais domínios constantes, ou seja, um ou mais de domínios CL, CH1, dobradiça, CH2 e CH3).

[0042] "Anticorpo" refere-se a uma molécula de imunoglobulina composta por quatro cadeias polipeptídicas, duas cadeias pesadas (H) e duas cadeias leves (L) interconectadas por ligações dissulfeto. Cada cadeia pesada tem uma região variável de cadeia pesada (HCVR ou VH) e uma região constante de cadeia pesada. A região constante de cadeia pesada contém três domínios, CH1, CH2 e CH3. Cada cadeia leve possui uma região variável de cadeia leve (VL) e uma região constante da cadeia leve. A região constante da

cadeia leve consiste em um domínio (CL). As regiões VH e VL podem ser ainda subdivididas em regiões de hipervariabilidade, denominadas regiões determinantes de complementaridade (CDR), intercaladas com regiões que são mais conservadas, denominadas regiões estruturais (FR). Cada VH e VL é composto por três CDRs e quatro FRs, dispostos a partir do terminal amino para o terminal carboxil na seguinte ordem: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 e FR4. O termo "anticorpo" inclui imunoglobulinas glicosiladas e não glicosiladas de qualquer isotipo ou subclasse. O termo "anticorpo" inclui moléculas de anticorpo preparadas, expressas, criadas ou isoladas por meios recombinantes, como anticorpos isolados de uma célula hospedeira transfectada com uma sequência de nucleotídeos para expressar o anticorpo. O termo "anticorpo" também inclui um anticorpo biespecífico, que inclui uma imunoglobulina heterotetramérica que pode se ligar a mais de um epítopo. Os anticorpos biespecíficos são geralmente descritos na Publicação de Pedido de Patente US. Nº 2010/0331527, que é incorporada por referência neste documento.

[0043] O termo "porção de ligação ao antígeno" de um anticorpo (ou fragmento de anticorpo) ou uma proteína de interesse refere-se a um ou mais fragmentos de um anticorpo ou de uma proteína de interesse que retêm a capacidade de se ligar especificamente a um antígeno. Exemplos não limitativos de fragmentos de ligação a proteínas englobados no termo "porção de ligação ao antígeno" de um anticorpo incluem (i) um fragmento Fab, um fragmento monovalente que consiste nos domínios VL, VH, CL e CH1; (ii) um fragmento F(ab')₂, um fragmento bivalente compreendendo dois fragmentos Fab ligados por uma ponte dissulfeto na região de dobradiça; (iii) um fragmento Fd que consiste nos domínios VH e CH1; (iv) um fragmento Fv consistindo nos domínios VL e VH de um único braço de um anticorpo, (v) um fragmento dAb (Ward et al., Nature (1989) 241:544-546), que consiste em um domínio VH, (vi) uma CDR isolada e (vii) um scFv, que consiste nos

dois domínios do fragmento Fv, VL e VH, unidos por um ligante sintético para formar uma única cadeia proteica na qual as regiões VL e VH se pareiam para formar moléculas monovalentes. Outras formas de anticorpos de cadeia única, como os diabéticos, também estão incluídas no termo "anticorpo". Ver, por exemplo, Holliger et al., PNAS USA (1993) 90: 6444-6448; Poljak et al., Structure (1994) 2:1121-1123.

[0044] Além disso, um anticorpo ou uma porção de ligação ao antígeno deste pode ser parte de uma molécula de imunoadesão maior, formada por associação covalente ou não covalente do anticorpo ou porção do anticorpo com uma ou mais outras proteínas ou peptídeos. Exemplos não limitativos dessas moléculas de imunoadesão incluem o uso da região central da estreptavidina para produzir uma molécula tetramérica de scFv (Kipriyanov et al., Human Antibodies and Hybridomas (1995) 6: 93-101) e o uso de um resíduo de cisteína, um peptídeo marcador e uma tag de polihistidina C-terminal para produzir moléculas de scFv bivalentes e biotinizadas (Kipriyanov et al. Mol. Immunol. (1994) 31:1047-1058). As porções de anticorpos, tais como os fragmentos Fab e F(ab')₂, podem ser preparadas a partir de anticorpos inteiros utilizando técnicas convencionais, tais como via digestão com papaína ou pepsina de anticorpos inteiros. Além disso, anticorpos, porções de anticorpos e moléculas de imunoadesão podem ser obtidos usando técnicas de DNA recombinante padrão comumente conhecidas na técnica (ver Sambrook et al., 1989).

[0045] O termo "anticorpo humano" pretende incluir anticorpos com regiões variáveis e constantes derivadas de sequências de imunoglobulina da linhagem germinativa humana. Os anticorpos humanos da presente divulgação podem incluir resíduos de aminoácidos não codificados pelas sequências de imunoglobulina de linhagem germinativa humana (por exemplo, mutações introduzidas por mutagênese ao acaso ou específica do sítio in vitro ou por mutação somática in vivo), por exemplo nas CDRs e, em

particular, CDR3. O termo "anticorpo humano recombinante", conforme usado neste documento, destina-se a incluir todos os anticorpos humanos que são preparados, expressos, criados ou isolados por meios recombinantes, como anticorpos expressos usando um vetor de expressão recombinante transfectado em uma célula hospedeira, anticorpos isolados de uma biblioteca de anticorpos humanos combinatória recombinante, anticorpos isolados de um animal (por exemplo, um camundongo) que é transgênico para genes de imunoglobulina humana (ver, por exemplo, Taylor et al. Nucl. Acids Res. (1992) 20:6287-6295) ou anticorpos preparados, expressos, criados ou isolados por qualquer outro meio que envolva o splicing das sequências gênicas de imunoglobulina humana para outras sequências de DNA. Tais anticorpos humanos recombinantes têm regiões variáveis e constantes derivadas de sequências de imunoglobulina da linhagem germinativa humana. Em certas modalidades, no entanto, esses anticorpos humanos recombinantes podem ser sujeitos a mutagênese in vitro (ou, quando um animal transgênico para sequências Ig humanas é usado, mutagênese somática in vivo), e assim as sequências de aminoácidos das regiões VH e VL dos anticorpos recombinantes são sequências que, embora derivadas e relacionadas com sequências VH e VL de linhagem germinativa humana, podem não existir naturalmente no repertório de linhagem germinativa de anticorpos humanos in vivo.

[0046] "Proteínas de fusão Fc" compreendem parte ou todas as duas ou mais proteínas, uma das quais é uma porção Fc de uma molécula de imunoglobulina, que não são encontradas juntas na natureza. A preparação de proteínas de fusão compreendendo certos polipeptídeos heterólogos fundidos com várias porções de polipeptídeos derivados de anticorpos (incluindo o domínio Fc) foi descrita, por exemplo, por Ashkenazi et al., PNAS USA (1991) 88:10535; Byrn et al., Nature (1990) 344:677; e Hollenbaugh et al., Current Protocols in Immunology (1992) Suppl. 4, pp. 10.19.1 - 10.19.11.

“Proteínas de fusão de receptor Fc” compreendem uma ou mais de um ou mais domínio(s) extracelular de um receptor acoplado a uma fração Fc que, em algumas modalidades, compreende uma região de dobradiça por um domínio CH2 ou CH3 de uma imunoglobulina. Em algumas modalidades, a proteína de fusão Fc contém duas ou mais cadeias receptoras distintas que se ligam a um ou mais ligante(s).

[0047] Em certas modalidades, uma "proteína de fusão Fc" é uma molécula "trap" (bloqueadora), que é uma molécula receptora decoy que inclui dois componentes receptores distintos que imitam os domínios de ligação de um receptor endógeno correspondente e a porção Fc de um anticorpo. Exemplos não limitativos de moléculas armadilha incluem uma armadilha de IL-1 (por exemplo, riloncept, que contém a região de ligação ao ligante de IL-1RAcP fundida com a região extracelular de IL-1R1 que por sua vez é fundida com o Fc de hIgG1) (por exemplo, SEQ ID NO: 1) (ver Patente US. Nº 6,927,004) ou uma armadilha de VEGF (por exemplo, aflibercept, que contém o domínio 2 de Ig do receptor VEGF Flt1 fundido ao domínio 3 de Ig do receptor VEGF Flk1, que por sua vez é fundido para Fc de hIgG1. Ver, por exemplo, as patentes US. Nº 7,087,411, 7,279,159; ver também Patente US. Nº 5,610,279 para etanercept (armadilha de TNF).

[0048] "Glicosilação" inclui a formação de glicoproteínas em que os oligossacarídeos estão ligados à cadeia lateral de um resíduo de asparagina (Asn) (ou seja, N-ligado) ou um resíduo de serina (Ser) ou treonina (Thr) (ou seja, O-ligado) de uma proteína. "Glicoproteínas" incluem qualquer proteína que contenha um glicano ligado a O ou um glicano ligado a N. Os glicanos podem ser homo- ou heteropolímeros de resíduos de monossacarídeos, que podem ser lineares ou ramificados. Sabe-se que a glicosilação ligada a N inicia primariamente no retículo endoplasmático, enquanto a glicosilação ligada a O é mostrada como iniciada no aparelho ER ou Golgi. O termo "N-glicano" é usado de forma intercambiável com "oligossacarídeo ligado a N."

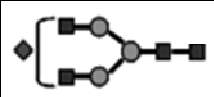
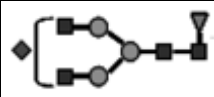
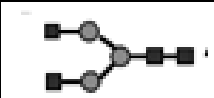
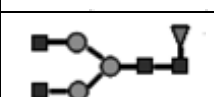
O termo "O-glicano" é usado de forma intercambiável com "oligossacarídeo ligado a O."

[0049] Uma "proteína N-glicano" inclui proteínas que contêm ou podem aceitar oligossacarídeos ligados a N. Os N-glicanos podem ser compostos de N-acetilgalactosamina (GalNAc), manose (Man), fucose (Fuc), galactose (Gal), ácido neuramínico (NANA) e outros monossacarídeos, no entanto os N-glicanos geralmente têm um pentassacarídeo comum estrutura incluindo: três manoses e dois açúcares de N-acetilglucosamina (GlcNAc). Proteínas com a sequência consecutiva de aminoácidos, Asn-X-Ser ou Asn-X-Thr, onde X é qualquer aminoácido exceto prolina, podem fornecer um sítio de ligação para os N-glicanos.

[0050] N-glicanos incluem os oligossacarídeos ligados a N listados na Tabela 1. As designações abreviadas dos oligossacarídeos listados são utilizadas neste documento como nomes simplificados para descrever o oligossacarídeo. Assim, por exemplo, um N-glicano A1 contém uma arginina ligada a um oligossacarídeo que consiste em (SA)(Gal)2(GlcNAc)2(Man)3(GlcNAc)3.

Tabela 1: Oligossacarídeos ligados a N

Nome da molécula*	Designação abreviada	Massa esperada (g/mol)	Representação gráfica**
(SA)(Gal)2(GlcNAc)2(Man)3(GlcNAc)3	A1	2051,7	
(SA)(Gal)2(GlcNAc)2(Man)3(GlcNAc)3(Fuc)	A1F	2197,7	
(SA)2(Gal)2(GlcNAc)2(Man)3(GlcNAc)3	A2	2343,2	
(SA)2(Gal)2(GlcNAc)2(Man)3(GlcNAc)3(Fuc)	A2F	2488,8	
(Man)5(GlcNAc)2	Man5	1354,4	
(Gal)2(GlcNAc)2(Man)3(GlcNAc)3	NA2	1760,6	
(Gal)2(GlcNAc)2(Man)3(GlcNAc)3(Fuc)	NA2F	1906,6	

(Gal)(GlcNAc)2(Man)3(GlcNAc)3	NA2G1	1598,5	
(Gal)(GlcNAc)2(Man)3(GlcNAc)3(Fuc)	NA2G1F	1744,1	
(GlcNAc)2(Man)3(GlcNAc)2	NGA2	1436,5	
(GlcNAc)2(Man)3(GlcNAc)2(Fuc)	NGA2F	1582,5	

*Abreviações para monossacarídeos são ácido siálico (SA), galactose (Gal), manose (Man), GlcNAc (N-acetilglucosamina) e fucose (Fuc). **Código de Glicano: triângulo = fucose; quadrado = N-acetilglucosamina; círculo = manose; estrela = ácido siálico.

Triagem

[0051] "Hidrolisados" são materiais complexos derivados da hidrólise de material vegetal, animal, soro de leite, levedura e similares. O termo "hidrolisado" é usado de forma intercambiável com "hidrolisado de proteína". "Hidrolisados vegetais" (hidrolisados de proteínas de plantas) são materiais vegetais hidrolisados, como farinha de arroz, farinha de trigo, farinha de milho, farinha de soja e similares. Os hidrolisados de proteínas podem ser fabricados por três métodos gerais: hidrólise ácida, hidrólise alcalina e hidrólise enzimática. Para aplicações biológicas, incluindo manufatura bioterapêutica, os hidrolisados de proteínas são principalmente produzidos por hidrólise enzimática. Por exemplo, um hidrolisado de soja produzido pela digestão com pepsina pode ser chamado de "peptona de soja" ou um hidrolisado de levedura produzido pela digestão com tripsina pode ser chamado de "triptona de levedura." Franek et al., *Biotechnol. Prog.* 16(5):688-92 (2000) é incorporada neste documento para hidrolisados de proteínas vegetais e métodos para fabricá-los.

[0052] Em algumas modalidades, o hidrolisado em questão é um hidrolisado vegetal. Numa modalidade específica, o hidrolisado de proteína em questão é um hidrolisado de soja. "Hidrolisado de soja" é um produto de soja digerido enzimaticamente, derivado de grãos de soja, que é em grande parte quimicamente indefinido. Geralmente, o hidrolisado de soja é composto

por um conglomerado de aminoácidos, proteínas, carboidratos, minerais e vitaminas. O hidrolisado de soja é um hidrolisado de proteína derivado de planta que está disponível comercialmente, por exemplo, em solução de alta concentração (por exemplo, solução HyClone™ HyQ Hidrolisado de Soja) ou pó (por exemplo, Sigma Aldrich ® S1674 (Amisoy™), hidrolisado de proteína de soja). Uma "remessa" ou "lote" de hidrolisado de soja, conforme utilizado neste documento, refere-se a uma quantidade fabricada de hidrolisado de soja resultante da hidrólise do grão de soja. Por exemplo, cada processo de hidrólise pode resultar em uma "remessa" ou "lote" único de hidrolisado de soja com concentrações variadas de componentes, como vitaminas, aminoácidos, peptídeos e açúcares. O hidrolisado de soja é comumente usado com meio de cultura celular sem proteína animal para o crescimento de linhagens celulares de mamíferos durante a produção de agentes bioterapêuticos comerciais, como anticorpos. Mais especificamente, o hidrolisado de soja é adicionado a um meio de cultura celular antes ou durante a inoculação com células. As células são então cultivadas no meio contendo hidrolisado, até serem colhidas. Devido à natureza indefinida do hidrolisado de soja, as remessas de hidrolisado de soja variam de remessa para remessa (ou lote para lote), o que pode levar a inconsistências na fabricação comercial de agentes bioterapêuticos.

[0053] A presente divulgação identificou que as concentrações de certos componentes em uma remessa de hidrolisado de soja afetam a qualidade e a composição das proteínas produzidas na cultura celular utilizando o hidrolisado de soja. A presente divulgação fornece métodos para a triagem de remessas de hidrolisado de soja, a fim de selecionar certas remessas de hidrolisado de soja que contêm uma quantidade desejável de um componente, como, por exemplo, ornitina, putrescina, citrulina, arginina ou uma combinação destes.

[0054] Em certas modalidades, o método de triagem inclui medir a

quantidade de ornitina ou putrescina em pelo menos uma porção (isto é, uma amostra) de uma remessa de hidrolisado de soja. Numa modalidade específica, uma amostra de hidrolisado de soja é pesada e uma porção desta é dissolvida até uma concentração desejada. Em algumas modalidades, a solução de hidrolisado de soja é então diluída em um solvente para uma segunda concentração desejada (por exemplo, 1 g/L a 25 g/L) e a composição das soluções resultantes de hidrolisado de soja pode ser determinada.

[0055] Em algumas modalidades, a etapa de medição emprega um método adequado para determinar a composição molecular de uma amostra de hidrolisado de soja, incluindo, por exemplo, detecção colorimétrica realizada após a reação de ninidrina pós-coluna ou compostos positivos para ninidrina eluída por cromatografia, como HPLC ou UPLC, e as unidades usadas para expressar a quantidade medida de cada componente (por exemplo, ornitina ou putrescina) podem ser quaisquer unidades adequadas (por exemplo, micromoles/L, mg/L ou g/L). Em algumas modalidades, medir a quantidade de ornitina ou putrescina inclui medir a concentração de ornitina em uma amostra ou medir a quantidade total de ornitina em uma amostra de hidrolisado de soja. No entanto, uma quantidade de ornitina ou putrescina é medida e quaisquer unidades são usadas para expressar a quantidade medida, a concentração de ornitina ou putrescina na remessa selecionada de hidrolisado de soja é menor ou igual a 0,67 mg de ornitina ou putrescina por g de soja.

[0056] Numa modalidade, é obtida uma amostra de uma remessa de hidrolisado de soja e os conteúdos de ornitina ou putrescina da amostra são medidos por cromatografia dos aminoácidos em uma coluna de troca iônica com detecção posterior de ninidrina na coluna. Mais especificamente, em uma modalidade específica, os métodos de triagem incluem hidrólise ácida de uma amostra de hidrolisado de soja e reconstituição em um tampão de amostra. A amostra hidrolisada é então sujeita à separação de troca catiônica de alto

desempenho em, por exemplo, uma coluna de uma resina de poliestireno sulfonado (Dowex 50) seguida de uma derivatização pós-coluna que permite a detecção sensível de aminoácidos individuais dentro de uma amostra. Ver, por exemplo, Moore e Stein. *J. Biol. Chem.* (1954) Vol. 211 pp. 907-913; Nemkov ,et al., *Amino Acids* 2015 Nov; 47(11): 2345–2357; Wahl e Holzgrabe, “Amino acid analysis for pharmacopoeial purposes,” *Talanta* 154:150-163, 1 de julho de 2016. Após o desenvolvimento da cor pós-coluna pelo reagente Ninidrina, a absorvância é medida na faixa roxa da ninidrina, por exemplo, 570 nm. A aquisição de dados é realizada usando o software de cromatografia (por exemplo, o software de cromatografia EZChrom Elite for Hitachi versão 3.1.5b) para fornecer um cromatograma quantitativo mostrando micromoles/L por aminoácido, mg/L por aminoácido ou g/L por aminoácido.

[0057] Um versado na técnica apreciará que outros métodos para a identificação e medição de aminoácidos em uma composição de amostra podem ser utilizados de acordo com os métodos da divulgação de presença, como métodos de cromatografia de derivatização pré-coluna ou cromatografia líquida de fase reversa usando cromatografia líquida e espectroscopia de massa.

[0058] Em certas modalidades, a cromatografia líquida-espectrometria de massa é usada para triar uma amostra de hidrolisado de soja. Por exemplo, uma amostra de uma remessa de hidrolisado de soja pode ser obtida conforme estabelecido neste documento e sujeita a uma execução de cromatografia, ou uma série de cromatografias executadas em um sistema de cromatografia líquida de alta performance (HPLC), como o Agilent 1100 ou o Agilent 1200SL. A análise por espectrometria de massa pode ser realizada para fornecer dados quantitativos de alta resolução descrevendo a composição da amostra de hidrolisado de soja que está sendo medida.

[0059] Em algumas modalidades, a presente divulgação fornece um

método que inclui a triagem de remessas de hidrolisado de soja para uma quantidade desejada de um componente, como ornitina, putrescina e/ou citrulina, e a seleção das remessas de hidrolisado de soja que possuem uma quantidade desejada de tal componente. Por exemplo, uma amostra incluindo uma porção de uma remessa de pó de hidrolisado de soja pode ser triada conforme descrito acima e comparada com um perfil padrão de aminoácido gerado nas mesmas condições da amostra. Como mostrado nas FIGS 1A-1B, os cromatogramas resultantes fornecerão a concentração de cada componente de aminoácido presente na amostra de hidrolisado de soja (por exemplo, micromoles/L por aminoácido, mg/L por aminoácido ou g/L por aminoácido). A análise do cromatograma facilita a identificação de remessas de hidrolisado de soja (ou seja, amostras) que contêm uma concentração desejada de um componente, como ornitina, putrescina e/ou citrulina. Cada remessa de hidrolisado de soja que inclui uma quantidade desejada de um componente ou componentes específicos é então selecionado para uso posterior, por exemplo, em cultura celular, conforme descrito neste documento. A Figura 1, painel A, descreve uma remessa rejeitada após a identificação de aminoácidos. Na Figura 1, o painel B representa um exemplo de uma remessa aceitável de hidrolisado de soja executada sob condições idênticas. O pico de aminoácidos correspondente à ornitina está circulado nas duas figuras. A concentração de ornitina ou putrescina pode ser determinada gerando uma curva padrão e interpolando a concentração de ornitina ou putrescina da amostra. Como alternativa, a quantidade relativa de ornitina ou putrescina pode ser determinada determinando a área sob a curva para o pico de ornitina ou putrescina e dividindo-a pelo total de áreas sob o pico para todos os aminoácidos ou comparando a área do pico com um padrão.

[0060] Em certas modalidades, a concentração desejada do componente de hidrolisado de soja (por exemplo, ornitina ou putrescina) a ser selecionada é de 5 mg/L ou menos. Numa modalidade, a concentração

desejada de ornitina ou putrescina em uma remessa de hidrolisado de soja a ser selecionada varia de 0,5 mg/L a 5,0 mg/L ou de 0,5 mg/L a 2,0 mg/L. Em outras modalidades, a concentração de ornitina ou putrescina em uma remessa selecionada de hidrolisado de soja varia de 0,5 mg/L a 4,5 mg/L, 0,5 mg/L a 4,0 mg/L, 0,5 mg/L a 3,5 mg/L, 0,5 mg/L a 3,0 mg/L, 0,5 mg/L a 2,5 mg/L, 0,5 mg/L a 2,0 mg/L, 0,5 mg/L a 1,5 mg/L ou 0,5 mg/L a 1,0 mg/L. Em algumas modalidades, a concentração de ornitina ou putrescina em uma remessa selecionada de hidrolisado de soja varia de 1,0 mg/L a 5,0 mg/L, 1,5 mg/L a 5,0 mg/L, 2,0 mg/L a 5,0 mg/L, 2,5 mg/L a 5,0 mg/L, 3,0 mg/L a 5,0 mg/L, 3,5 mg/L a 5,0 mg/L, 4,0 mg/L a 5,0 mg/L ou 4,5 mg/L a 5,0 mg/L.

[0061] Em modalidades específicas, a concentração desejada de ornitina ou putrescina em uma remessa de hidrolisado de soja é de pelo menos 0,5 mg/L, 0,6 mg/L, 0,7 mg/L, 0,8 mg/L, 0,9 mg/L, 1,1 mg/L, 1,2 mg/L, 1,3 mg/L, 1,4 mg/L, 1,5 mg/L, 1,6 mg/L, 1,7 mg/L, 1,8 mg/L, 1,9 mg/L, 2,0 mg/L, 2,1 mg/L, 2,2 mg/L, 2,3 mg/L, 2,4 mg/L, 2,5 mg/L, 2,6 mg/L, 2,7 mg/L, 2,8 mg/L, 2,9 mg/L, 3,0 mg/L, 3,1 mg/L, 3,2 mg/L, 3,3 mg/L, 3,4 mg/L, 3,5 mg/L, 3,6 mg/L, 3,7 mg/L, 3,8 mg/L, 3,9 mg/L, 4,0 mg/L, 4,1 mg/L, 4,2 mg/L, 4,3 mg/L, 4,4 mg/L, 4,5 mg/L, 4,6 mg/L, 4,7 mg/L, 4,8 mg/L, 4,9 mg/L ou é de 5,0 mg/L de ornitina ou putrescina.

[0062] Em outras modalidades, a concentração desejada de ornitina ou putrescina em uma remessa de hidrolisado de soja não é superior a 0,67 mg de ornitina por g de soja. Ainda em outras modalidades, a concentração desejada de ornitina ou putrescina em uma remessa de hidrolisado de soja não é superior a 0,27 mg de ornitina por g de soja. Noutra modalidade, a concentração desejada de ornitina ou putrescina em uma remessa de hidrolisado de soja não é superior a 0,24 mg de ornitina ou putrescina por g de soja. Em algumas modalidades, a concentração desejada de ornitina ou putrescina em uma remessa de soja é de 0,067 mg a 0,67 mg de ornitina ou putrescina por g de soja. Ainda em outras modalidades, a concentração

desejada de ornitina ou putrescina em uma remessa de hidrolisado de soja cai na faixa de 0,067 mg a 0,27 mg de ornitina por g de soja. Em ainda outra modalidade, a concentração desejada de ornitina ou putrescina em uma remessa de hidrolisado de soja cai na faixa de 0,067 mg a 0,24 mg de ornitina ou putrescina por g de soja.

[0063] Em uma modalidade, a quantidade relativa em massa de ornitina ou putrescina (% p/p) no hidrolisado de soja selecionado (p/p = massa de ornitina ou putrescina/massa total de hidrolisado) é $\leq 0,067\%$, como 0,0001%, 0,0002%, 0,0003%, 0,0004%, 0,0005%, 0,0006%, 0,0007%, 0,0008%, 0,0009%, 0,001%, 0,0015%, 0,002%, 0,0025%, 0,003%, 0,0035%, 0,004%, 0,0045%, 0,005%, 0,0055%, 0,006%, 0,0061%, 0,0062%, 0,0063%, 0,0064%, 0,0065%, 0,0066%, todos em p/p.

[0064] Numa modalidade, o hidrolisado de proteína vegetal é selecionado com base na produção de uma glicoproteína com um atributo de qualidade específico. A qualidade da glicoproteína pode ser determinada avaliando o nível de um ou mais N-glicanos específicos na glicoproteína, ou avaliando o nível de um ou mais açúcares específicos na glicoproteína ou uma combinação de vários atributos. Por exemplo, uma glicoproteína com um nível específico de fucose, por exemplo, 5-10 moles de fucose por mole de glicoproteína, pode ser um critério de atributo de qualidade; ou um nível específico de ácido siálico, por exemplo, 5-15 moles de ácido siálico por mole de glicoproteína; ou uma razão específica de N-glicano A1 por total de todos os N-glicanos, por exemplo, 10-17% (p/p) pode ser considerada como tendo o atributo de qualidade necessário. Um hidrolisado de proteína vegetal que permita a produção da referida glicoproteína seria considerado selecionável.

[0065] Em uma modalidade, o hidrolisado de proteínas vegetais é selecionado produzindo uma glicoproteína em uma célula cultivada em um meio contendo o potencial hidrolisado de proteínas vegetais selecionado (potencialmente selecionável) (por exemplo, hidrolisado de soja), purificando

a glicoproteína, sujeitando a glicoproteína à impressão digital de oligossacarídeos, e determinar a quantidade relativa de N-glicano A1, calculando a área sob o pico associado ao N-glicano A1 e dividindo esse valor pela área total sob os picos de todos os N-glicanos, e selecionando um hidrolisado de proteína vegetal que habilitou a produção de uma glicoproteína com uma quantidade relativa de N-glicano A1 de $\geq 10\%$, $\geq 10,5\%$, 10-17%, 10%, 10,5%, 11%, 11,5%, 12%, 12,5%, 13%, 13,5%, 14%, 14,5%, 15%, 15,5%, 16%, 16,5%, 17%, 17,5% ou 18%.

Cultura Celular

[0066] A presente divulgação fornece um método para a cultura celular que expressam uma proteína de interesse em um meio de cultura celular usando uma remessa selecionada de hidrolisado de soja, conforme descrito acima. A presente divulgação descobriu, pela primeira vez, que o uso de remessas selecionadas de hidrolisado de soja compreendendo 5,0 mg/L de ornitina ou menos em meios de cultura celular reduz a variabilidade de lote para lote e melhora a qualidade do produto proteico. A presente divulgação descobriu, pela primeira vez, que o uso de remessas selecionadas de hidrolisado de soja compreendendo 5,0 mg/L de putrescina ou menos em meios de cultura celular reduz a variabilidade de lote para lote e melhora a qualidade do produto proteico.

[0067] "Cultura celular" ou "cultura" significa o crescimento e a propagação de células de fora de um organismo ou tecido multicelular. As condições de cultura adequadas para células de mamífero são conhecidas na técnica. Ver, por exemplo, *Animal cell culture: A Practical Approach*, D. Rickwood, ed., Oxford University Press, New York (1992). As células de mamífero podem ser cultivadas em suspensão ou ligadas a um substrato sólido. Biorreatores de leiteo fluidizado, biorreatores de fibra oca, garrafas de roletes, frascos de agitação ou biorreatores de tanque agitado, com ou sem microcarreadores, e operados de modo descontínuo, descontínuo alimentado,

contínuo, semi-contínuo ou de perfusão estão disponíveis para cultura celular de mamíferos. Os meios de cultura celular ou meio de alimentação concentrado podem ser adicionados à cultura continuamente ou a intervalos durante a cultura. Por exemplo, uma cultura pode ser alimentada uma vez por dia, a cada dois dias, a cada três dias, ou pode ser alimentada quando a concentração de um componente específico do meio, que está sendo monitorado, fica fora da faixa desejada.

[0068] Conforme usado neste documento, os termos "meio de cultura celular", "meio", "meio celular", "meio de cultura celular" ou "meio de cultura" refere-se a qualquer solução nutritiva usada para o crescimento de células, por exemplo, células animais ou de mamíferos, e que geralmente fornece pelo menos um ou mais componentes dentre os seguintes: uma fonte de energia (geralmente na forma de um carboidrato, como glicose); um ou mais de todos os aminoácidos essenciais, e geralmente os vinte aminoácidos básicos, mais a cisteína; vitaminas e/ou outros compostos orgânicos tipicamente necessários em baixas concentrações; lipídios ou ácidos graxos livres; e oligoelementos, por exemplo, compostos inorgânicos ou elementos de ocorrência natural que normalmente são necessários em concentrações muito baixas, geralmente na faixa micromolar. Em algumas modalidades, um meio de cultura celular é formado pela combinação de um hidrolisado de soja ou outra proteína vegetal com um ingrediente adicional.

[0069] Conforme usado neste documento, "ingrediente adicional" inclui qualquer um ou mais componentes do meio de cultura celular, incluindo mas não limitado a água, uma fonte de energia, um ou mais de todos os aminoácidos essenciais e, geralmente, os vinte aminoácidos básicos, além de cisteína; vitaminas e/ou outros compostos orgânicos normalmente necessários em baixas concentrações, lipídios ou ácidos graxos livres e oligoelementos.

[0070] Em modalidades específicas, o meio de cultura celular é

suplementado com uma quantidade de uma remessa selecionada de hidrolisado de soja. Em certas modalidades, o meio de cultura celular é suplementado com cerca de 0,5 g/L a cerca de 25 g/L de um hidrolisado de soja selecionado. Em algumas modalidades, o meio de cultura celular é suplementado com cerca de 0,5 g/L, 1 g/L, 1,5 g/L, 2 g/L, 2,5 g/L, 2 g/L, 2,5 g/L, 3 g/L, 3,5 g/L, 4 g/L, 4,5 g/L, 5 g/L, 5,5 g/L, 6 g/L, 6,5 g/L, 7 g/L, 7,5 g/L, 8 g/L, 8,5 g/L, 9 g/L, 9,5 g/L, 10 g/L, 10,5 g/L, 11 g/L, 11,5 g/L, 12 g/L, 12,5 g/L, 13 g/L, 13,5 g/L, 14 g/L, 14,5 g/L, 15 g/L, 15,5 g/L, 16 g/L, 16,5 g/L, 17 g/L, 17,5 g/L, 18 g/L, 18,5 g/L, 19 g/L, 19,5 g/L, 20 g/L, 20,5 g/L, 21 g/L, 21,5 g/L, 22 g/L, 22,5 g/L, 23 g/L, 23,5 g/L, 24 g/L, 24,5 g/L ou cerca de 25 g/L de uma remessa selecionada de hidrolisado de soja.

[0071] Em uma modalidade, a concentração de ornitina ou putrescina no meio de cultura celular após a adição do hidrolisado de proteínas vegetais é ≤ 5 mg/L, 0,6 – 3 mg/L, 0,01 mg/L, 0,02 mg/L, 0,03 mg/L, 0,04 mg/L, 0,05 mg/L, 0,06 mg/L, 0,07 mg/L, 0,08 mg/L, 0,09 mg/L, 0,010 mg/L, 0,015 mg/L, 0,02 mg/L, 0,025 mg/L, 0,03 mg/L, 0,035 mg/L, 0,04 mg/L, 0,045 mg/L, 0,05 mg/L, 0,055 mg/L, 0,06 mg/L, 0,065 mg/L, 0,07 mg/L, 0,075 mg/L, 0,08 mg/L, 0,085 mg/L, 0,09 mg/L, 0,095 mg/L, 0,1 mg/L, 0,15 mg/L, 0,2 mg/L, 0,25 mg/L, 0,3 mg/L, 0,35 mg/L, 0,4 mg/L, 0,45 mg/L, 0,5 mg/L, 0,55 mg/L, 0,6 mg/L, 0,65 mg/L, 0,7 mg/L, 0,75 mg/L, 0,8 mg/L, 0,85 mg/L, 0,9 mg/L, 0,95 mg/L, 1 mg/L, 1,5 mg/L, 2 mg/L, 2,5 mg/L, 3 mg/L, 3,5 mg/L, 4 mg/L, 4,5 mg/L ou 5 mg/L.

[0072] Numa modalidade, as células sendo cultivadas são células de uma linhagem celular capaz de produzir uma proteína bioterapêutica. Exemplos não limitativos de linhagens celulares que são usadas para produzir agentes bioterapêuticos de proteínas incluem, inter alia, células primárias, células BSC, células HeLa, células HepG2, células LLC-MK, células CV-1, células COS, células VERO, células MDBK, células MDCK, células CRFK, células RAF, células RK, células TCMK-1, células LLCPK, células PK15,

células LLC-RK, células MDOK, células BHK, células BHK-21, células CHO, células CHO-K1, células NS-1, células MRC-5, WI-38, BHK, 3T3, 293, RK, células Per.C6 células de embriões de galinha. Em uma modalidade, a linhagem celular é uma linhagem celular de CHO ou uma ou mais de várias variantes celulares de CHO específicas otimizadas para produção de proteínas em larga escala, por exemplo, CHO-K1 ou células EESYR® derivado de CHO-K1 (expressão e estabilidade aprimoradas regiões) (Patente US. Nº 7,771,997).

[0073] Em uma modalidade, as células que são cultivadas e expressam a glicoproteína heteróloga são uma população de células obtida pela expansão clonal de uma célula (ou seja, a célula progenitora) que abriga e expressa um polinucleotídeo que codifica a glicoproteína ou uma subunidade da glicoproteína, em que a glicoproteína é uma proteína complexa de múltiplas subunidades, como um anticorpo. Em algumas modalidades, pelo menos 50%, pelo menos 60%, pelo menos 70%, pelo menos 80%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98%, pelo menos 99% ou cerca de 100% das células constituintes da população de células obtidas ou descendentes por expansão clonal a partir da célula progenitora contêm o polinucleotídeo que codifica a glicoproteína e expressa a glicoproteína.

[0074] Células de mamíferos, como células CHO, podem ser cultivadas em recipientes de cultura celular de pequena escala, como em recipientes de 125 ml com cerca de 25 ml de meio, recipientes de 250 ml com cerca de 50 a 100 ml de meio, recipientes de 500 ml com cerca de 100 a 200 ml de meio. Alternativamente, as culturas podem ser de grande escala, como, por exemplo, recipientes de 1000 ml com cerca de 300 a 1000 ml de meio, recipientes de 3000 ml com cerca de 500 ml a 3000 ml de meio, recipientes de 8000 ml com cerca de 2000 ml a 8000 ml de meio, e recipientes de 15000 ml com cerca de 4000 ml a 15000 ml de meio. As culturas para fabricação (ou seja, culturas celulares de produção) podem conter 10.000 L de mídia ou

mais. Culturas celulares em larga escala ou "culturas celulares de produção", como para a fabricação clínica de proteínas terapêuticas, são normalmente mantidas por dias ou mesmo semanas, enquanto as células produzem a(s) proteína(s) desejada(s). Durante esse período, a cultura pode ser suplementada com um meio de alimentação concentrado contendo componentes, como nutrientes e aminoácidos, que são consumidos durante o curso da cultura.

[0075] Em certas modalidades, é utilizado um meio de alimentação concentrado. Meio de alimentação concentrado pode basear-se em qualquer formulação dos meios da cultura celular. Tal meio de alimentação concentrado pode conter a maioria dos componentes do meio de cultura celular em, por exemplo, cerca de 5X, 6X, 7X, 8X, 9X, 10X, 12X, 14X, 16X, 20X, 30X, 50X, 100X, 200X, 400X, 600X, 800X, ou mesmo cerca de 1000X do seu valor útil normal. O meio de alimentação concentrado é frequentemente usado em processos de cultura descontínua alimentada.

[0076] Em algumas modalidades, o meio de cultura celular é suplementado com "adições no ponto de uso", também conhecidas como adições, ingredientes no ponto de uso ou produtos químicos no ponto de uso, durante o curso do crescimento celular ou produção de proteínas. As adições no ponto de uso incluem qualquer um ou mais de um fator de crescimento ou outras proteínas, um tampão, uma fonte de energia, um sal, um aminoácido, um metal e um quelante. Outras proteínas incluem transferrina e albumina. Os fatores de crescimento, que incluem citocinas e quimiocinas, são geralmente conhecidos na técnica e estimulam o crescimento celular ou, em alguns casos, a diferenciação celular. Um fator de crescimento é geralmente uma proteína (por exemplo, insulina), um pequeno peptídeo ou um hormônio esteroide, como estrogênio, DHEA, testosterona e similares. Em alguns casos, um fator de crescimento pode ser um produto químico não natural que promove a proliferação celular ou produção de proteínas, como por exemplo, tetra-hidrofolato (THF), metotrexato e similares. Exemplos não limitativos de

fatores de crescimento de proteínas e peptídeos incluem angiopoietinas, proteínas morfogenéticas dos ossos (BMPs), fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), fator de crescimento epidérmico (EGF), eritropoietina (EPO), fator de crescimento de fibroblastos (FGF), fator neurotrófico derivado de linhagem de célula glial (GDNF), fator estimulador de colônias de granulócitos (G-CSF), fator estimulador de colônias de macrófagos de granulócitos (GM-CSF), fator de diferenciação de crescimento-9 (GDF9), fator de crescimento de hepatócitos (HGF), fator de crescimento derivado de hepatomas (HDGF), insulina, fator de crescimento semelhante à insulina (IGF), fator de estimulação da migração, miostatina (GDF-8), fator de crescimento neuronal (NGF) e outras neurotrofinas, fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), trombopoietina (TPO), fator de crescimento transformador alfa ($TGF-\alpha$), fator de crescimento transformador beta ($TGF-\beta$), fator de necrose tumoral alfa ($TNF-\alpha$), fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), agonistas da via de sinalização wnt, fator de crescimento placentário (PlGF), somatotrofina bovina fetal (FBS), interleucina-1 (IL-1), IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7 e similares. Numa modalidade, o meio de cultura celular é suplementado com o fator de crescimento de insulina de adição no ponto de uso. Numa modalidade, a concentração de insulina no meio, ou seja, a quantidade de insulina no meio de cultura celular após a adição é de cerca de 0,1 μM a 10 μM . Uma ou mais adições no ponto de uso também podem ser incluídas na formulação de meios de algumas modalidades.

[0077] Os tampões são geralmente conhecidos na técnica. A invenção não está restrita a nenhum tampão ou tampões específicos, e qualquer versado na técnica pode selecionar um tampão ou sistema de tampão apropriado para uso com uma linhagem celular específica que produz uma proteína específica. Numa modalidade, um tampão de adição no ponto de uso é o sistema $\text{NaHCO}_3/\text{CO}_2$. Numa modalidade, o tampão de adição no ponto de uso

compreende NaHCO₃. Em outra modalidade, o tampão é HEPES.

[0078] As fontes de energia para uso como adição de ponto de uso na cultura celular também são bem conhecidas na técnica. Sem limitação, em uma modalidade, a fonte de energia de adição no ponto de uso é a glicose. Dados os requisitos particulares e específicos de uma linhagem celular específica e a proteína a ser produzida, em uma modalidade, a glicose pode ser adicionada a uma concentração de cerca de 1 a 20 mM no meio.

[0079] Os quelantes são igualmente bem conhecidos na técnica da cultura celular e produção de proteínas. O EDTA tetrassódico desidratado e o citrato são dois quelantes comuns utilizados na técnica, embora outros quelantes possam ser empregados na prática desta invenção. Numa modalidade, um quelante de adição no ponto de uso é o di-hidrato de EDTA tetrassódico. Em uma modalidade, um quelante de adição no ponto de uso é citrato, como Na₃C₆H₅O₇.

[0080] Em uma modalidade, a cultura celular pode ser suplementada com um ou mais aminoácidos de adição no ponto de uso, como glutamina. Outras adições no ponto de uso incluem um ou mais dos vários sais metálicos, como sais de ferro, níquel, zinco e cobre. Numa modalidade, o meio de cultura celular é suplementado com qualquer um ou mais de sulfato de cobre, sulfato de zinco, cloreto férrico; e sulfato de níquel.

[0081] Em uma modalidade, o meio é suplementado em intervalos durante a cultura celular de acordo com um processo descontínuo alimentado. A cultura descontínua alimentada é geralmente conhecida na técnica e empregada para a produção otimizada de proteínas. Ver, por exemplo, YM Huang et al., *Biotechnol Prog.* (2010) 26 (5) pp.1400-1410.

[0082] Em outro aspecto da presente divulgação, células cultivadas em meio compreendendo hidrolisado de soja contendo ornitina ou putrescina em uma concentração desejada (isto é, menor ou igual a 5,0 mg/L, por exemplo, de 0,5 mg/L a 5,0 mg/L ou de 0,5 mg/L a 2,0 mg/L) produzem uma

proteína de interesse com qualidade melhorada, em comparação com células cultivadas em meio compreendendo hidrolisado de soja contendo ornitina ou putrescina a uma concentração superior a 5 mg/L. Em certas modalidades, a melhor qualidade da proteína é medida por: presença ou ausência de glicosilação em um ou mais aminoácidos na proteína de interesse, quantidade de glicano na proteína de interesse, presença de ácido siálico em um ou mais sítios de glicosilação sobre a proteína de interesse ou uma combinação destes. Conforme usado neste documento, o produto proteico "qualidade melhorada", "qualidade aprimorada" ou "alta qualidade" também pode se referir à qualidade mais consistente, por exemplo, modificações pós-traducionais observadas em um lote de produção de proteínas bioterapêuticas. Qualidade consistente inclui ter, por exemplo, um perfil de glicosilação desejável repetível após a replicação das linhas de produção. A consistência, com relação à qualidade, refere-se a um grau de uniformidade e padronização, enquanto as remessas de produção replicados são essencialmente livres de variação.

[0083] Em certas modalidades, o produto proteico (proteína de interesse) é um anticorpo, um anticorpo humano, um anticorpo humanizado, um anticorpo quimérico, um anticorpo monoclonal, um anticorpo multiespecífico, um anticorpo biespecífico, um fragmento de anticorpo de ligação ao antígeno, um anticorpo de cadeia única, um diacorpo, triacorpo ou tetracorpo, um fragmento Fab ou um fragmento F(ab')₂, um anticorpo IgD, um anticorpo IgE, um anticorpo IgM, um anticorpo IgG, um anticorpo IgG1, um anticorpo IgG2, um anticorpo IgG3 ou um anticorpo IgG4. Em uma modalidade, o anticorpo é um anticorpo IgG1. Numa modalidade, o anticorpo é um anticorpo IgG2. Numa modalidade, o anticorpo é um anticorpo IgG4. Em uma modalidade, o anticorpo é um anticorpo quimérico IgG2/IgG4. Em uma modalidade, o anticorpo é um anticorpo quimérico IgG2/IgG1. Em uma modalidade, o anticorpo é um anticorpo quimérico IgG2/IgG1/IgG4.

[0084] Em algumas modalidades, o anticorpo é selecionado do grupo que consiste em um anticorpo morte celular programada 1 (por exemplo, um anticorpo anti-PD1, conforme descrito na Pub. do Pedido de Patente US N° US2015/0203579A1), um antiligante de morte celular programada 1 (por exemplo, um anticorpo anti-PD-L1 conforme descrito na Pub. do Pedido de Patente US N° US2015/0203580A1), um anticorpo anti-Dll4, um anticorpo anti-angiopoetina 2 (por exemplo, um anticorpo anti-ANG2 conforme descrito na Patente US. N° 9,402,898), um anticorpo anti-proteína semelhante à angiopoietina 3 (por exemplo, um anticorpo anti-AngPt13 conforme descrito na Patente US. N° 9,018,356), um anticorpo de receptor de fator de crescimento derivado de antiplaquetas (por exemplo, um anticorpo anti-PDGFR conforme descrito na Patente US. 9,265,827), um anticorpo anti-Erb3, um anticorpo anti-receptor de prolactina (por exemplo, anticorpo anti-PRLR conforme descrito na Patente US. 9,302,015), um anticorpo anti-complemento 5 (por exemplo, um anticorpo anti-C5 conforme descrito na Pub. do Pedido de Patente US. US2015/0313194A1), um anticorpo anti-TNF, um anticorpo anti-receptor de fator de crescimento epidérmico (por exemplo, um anticorpo anti-EGFR conforme descrito na Patente US. 9,132,192 ou um anticorpo anti-EGFRvIII conforme descrito na Pub. do Pedido de Patente US N° US2015/0259423A1), um anticorpo anti-proteína convertase subtilisina kexina-9 (por exemplo, um anticorpo anti-PCSK9 conforme descrito na Patente US. N° 8,062,640 ou Pub. do Pedido de Patente US N° US2014/0044730A1), um anticorpo anti-fator de crescimento e diferenciação-8 (por exemplo, um anticorpo anti-GDF8, também conhecido como anticorpo anti-miostatina, conforme descrito nas Patentes US. 8,871,209 ou 9,260,515), um receptor anti-glucagon (por exemplo, anticorpo anti-GCGR conforme descrito na Pub. do Pedido de Patente US N° US2015/0337045A1 ou US2016/0075778A1), um anticorpo anti-VEGF, um anticorpo anti-IL1R, um anticorpo receptor de interleucina 4 (por exemplo, um anticorpo anti-IL4R

conforme descrito na Pub. do Pedido de Patente US N° US2014/0271681A1 ou Patente US. 8,735,095 ou 8,945,559), um anticorpo anti-interleucina 6 receptor (por exemplo, um anticorpo anti-IL6R, conforme descrito nas Patentes US. N° 7,582,298, 8,043,617 ou 9,173,880), um anticorpo anti-IL1, um anticorpo anti-IL2, um anticorpo anti-IL3, um anticorpo anti-IL4, um anticorpo anti-IL5, um anticorpo anti-IL6, um anticorpo anti-IL7, um anti-interleucina 33 (por exemplo, anticorpo anti-IL33 conforme descrito nas Patentes US. Pedido Pub. N° US2014/0271658A1 ou US2014/0271642A1), um anticorpo anti-vírus respiratório sincicial (por exemplo, anticorpo anti-RSV conforme descrito na Pub. do Pedido de Patente US N° US2014/0271653A1), um anti-cluster de diferenciação 3 (por exemplo, um anticorpo anti-CD3, conforme descrito nas Pub. dos Pedidos de Patentes US N° US2014/0088295A1 e US20150266966A1, e no Pedido US. N° 62/222,605), um anti-cluster de diferenciação 20 (por exemplo, um anticorpo anti-CD20 conforme descrito nas Pub. dos Pedidos de Patentes US N° US2014/0088295A1 e US20150266966A1 e na Patente US. 7,879,984), um anticorpo anti-CD19, um anticorpo anti-CD28, um anti-cluster de diferenciação-48 (por exemplo, anticorpo anti-CD48, conforme descrito na Patente US. 9,228,014), um anticorpo anti-Fel d1 (por exemplo, conforme descrito na Patente US. 9,079,948), um antivírus da síndrome respiratória do oriente médio (por exemplo, um anticorpo anti-MERS conforme descrito na Pub. do Pedido de Patente US N° US2015/0337029A1), um anticorpo anti-vírus Ebola (por exemplo, conforme descrito na Pub. do Pedido de Patente US N° US2016/0215040), um anticorpo anti-vírus do zika, um anticorpo anti-gene de ativação linfocitária 3 (por exemplo, um anticorpo anti-LAG3 ou um anticorpo anti-CD223), um anticorpo anti-fator de crescimento neuronal (por exemplo, um anticorpo anti-NGF, conforme descrito na Pub. do Pedido de Patente US N° US2016/0017029 e Patente US. 8,309,088 e 9,353,176) e um anticorpo anti-activina A. Em algumas modalidades, o anticorpo biespecífico

é selecionado do grupo que consiste em um anticorpo biespecífico anti-CD3 x anti-CD20 (conforme descrito nas Pub. do Pedidos de Patentes US N° US2014/0088295A1 e US20150266966A1), um anticorpo biespecífico anti-CD3 x anti-mucina 16 (por exemplo, um anticorpo biespecífico anti-CD3 x anti-Muc16) e um anticorpo biespecífico anti-CD3 x de antígeno de membrana prostático específico (por exemplo, um anticorpo biespecífico anti-CD3 x anti-PSMA). Em algumas modalidades, a proteína de interesse é selecionada do grupo que consiste em alirocumabe, sarilumabe, fasinumabe, nesvacumabe, dupilumabe, trevogrumabe, evinacumabe e rinucumabe. Todas as publicações mencionadas nesta divulgação são incorporadas neste documento por referência na sua totalidade.

[0085] Em outras modalidades, a proteína de interesse é uma proteína recombinante que contém uma fração Fc e outro domínio (por exemplo, uma proteína de fusão Fc). Em algumas modalidades, uma proteína de fusão Fc é uma proteína de fusão Fc de receptor, que contém um ou mais domínios extracelulares de um receptor acoplado a uma fração Fc. Em algumas modalidades, a fração Fc compreende uma região de dobradiça seguida por um domínio CH2 e CH3 de uma IgG. Em algumas modalidades, a proteína de fusão Fc do receptor contém duas ou mais cadeias receptoras distintas que se ligam a um único ligante ou a múltiplos ligantes. Por exemplo, uma proteína de fusão Fc é uma proteína armadilha, como por exemplo uma armadilha de IL-1 (por exemplo, riloncept, que contém a região de ligação ao ligando IL-1RAcP fundida com a região extracelular de Il-1R1 fundida com Fc de hIgG1; ver Patente US. N° 6.927.004, que é incorporada neste documento por referência na sua totalidade), uma armadilha de VEGF (por exemplo, aflibercept ou ziv-aflibercept, que contém o domínio 2 de Ig do receptor VEGF Flt1 fundido ao domínio 3 de Ig do receptor VEGF Flk1 fundido para Fc de hIgG1, ver Patente US. 7,087,411 e 7,279,159; ou conbercept, que contém o domínio 2 de Ig do receptor VEGF Flt1 fundido com o domínio 3

de Ig do receptor VEGF Flk1 fundido com o domínio 4 de Ig do receptor VEGF Flk1 fundido com Fc de hIgG1; ver Patente US. 8,216,575), ou uma armadilha de TNF (por exemplo, etanercept, que contém o receptor de TNF fundido a Fc de hIgG1; ver Patente US. Nº 5,610,279). Em outras modalidades, uma proteína de fusão Fc é uma proteína de fusão ScFv-Fc, que contém um ou mais de um ou mais domínios de ligação ao antígeno, como um fragmento de cadeia pesada variável e um fragmento de cadeia leve variável, de um anticorpo acoplado a uma fração Fc.

Produção de Proteínas

[0086] Uma proteína de interesse pode ser expressa por uma célula hospedeira usando métodos conhecidos pelos versados na técnica. Geralmente, qualquer proteína de interesse adequada para expressão em células de mamíferos pode ser produzida pelos métodos presentes, no entanto as glicoproteínas se beneficiarão especialmente dos presentes métodos. Por exemplo, em modalidades específicas, a proteína de interesse é um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno deste, um anticorpo biespecífico ou fragmento deste, um anticorpo quimérico ou fragmento deste, um ScFv ou fragmento deste, uma proteína marcada com Fc (por exemplo, proteína Trap) ou fragmento deste, um fator de crescimento ou um fragmento deste, uma citocina ou um fragmento deste, ou um domínio extracelular de um receptor da superfície celular ou um fragmento deste.

[0087] As glicoproteínas com glicanos ligados à asparagina (ligados a N) são onipresentes nas células eucarióticas. A biossíntese desses glicanos e suas transferências para polipeptídeos ocorrem no retículo endoplasmático (ER). As estruturas de N-glicano são ainda modificadas por várias glicosidases e glicosil-transferases no ER e no complexo de Golgi. A produção de proteínas usando os métodos presentes é direcionada para melhorar a consistência da estrutura desejada de N-glicano, a fim de eliminar epítomos imunogênicos ("glicotopos"). A análise estrutural detalhada das

proteínas ligadas ao glicano pode estar correlacionada às características funcionais da proteína. Tal análise que caracteriza a glicosilação de proteína envolve tipicamente várias etapas: i) uma liberação enzimática ou química dos glicanos ligados; ii) derivatização dos glicanos liberados por meio de aminação redutora com aminas aromáticas ou alifáticas ou permetilação; iii) análise dos glicanos. Muitas variações de análise de padrões de glicosilação são conhecidas pelos versados na técnica. As glicoproteínas podem transportar vários tipos de glicofomas que ocupam vários locais em quantidades específicas e, portanto, sua complexidade pode dificultar a reprodução em certos métodos de produção. A consistência de tipo e quantidade de glicofoma é mensurável e representa um resultado desejável para a produção terapêutica de proteína.

[0088] A presente divulgação mostra que a produção de numerosas remessas de uma proteína de interesse na cultura descontínua ou semidescontínua, cultivando células que expressam a proteína de interesse em meios que compreendem hidrolisado de soja com concentrações específicas de ornitina ou putrescina resultam em qualidade aumentada das proteínas que são produzidas e consistência aprimorada de remessa para remessa. Portanto, outro aspecto da presente divulgação fornece uma pluralidade de preparações de proteínas que foram produzidas cultivando células em meios que compreendem remessas separadas de hidrolisado de soja contendo uma quantidade predeterminada de ornitina ou putrescina. Em certas modalidades, cada remessa de hidrolisado de soja selecionada para uso em cultura de células tem uma concentração de 0,67 mg de ornitina ou putrescina por g de soja ou menos, particularmente de 0,0067 mg a 0,67 mg de ornitina ou putrescina por g de soja, ou de 0,0067 a 0,27 mg ornitina ou putrescina por g de soja.

[0089] Em outras modalidades, a concentração de ornitina ou putrescina em um meio de cultura de células contendo hidrolisado de soja

varia de 0,5 mg/L a 4,5 mg/L, 0,5 mg/L a 4,0 mg/L, 0,5 mg/L a 3,5 mg/L, 0,5 mg/L a 3,0 mg/L, 0,5 mg/L a 2,5 mg/L, 0,5 mg/L a 2,0 mg/L, 0,5 mg/L a 1,5 mg/L ou 0,5 mg/L a 1,0 mg/L. Em algumas modalidades, a concentração de ornitina ou putrescina no meio de cultura de células contendo hidrolisado de soja varia de 1,0 mg/L a 5,0 mg/L, 1,5 mg/L a 5,0 mg/L, 2,0 mg/L a 5,0 mg/L, 2,5 mg/L a 5,0 mg/L, 3,0 mg/L a 5,0 mg/L, 3,5 mg/L a 5,0 mg/L, 4,0 mg/L a 5,0 mg/L ou 4,5 mg/L a 5,0 mg/L.

[0090] Em modalidades específicas, um meio de cultura de células contendo hidrolisado de soja inclui ornitina ou putrescina na quantidade de 0,5 mg/L, 0,6 mg/L, 0,7 mg/L, 0,8 mg/L, 0,9 mg/L, 1,1 mg/L, 1,2 mg/L, 1,3 mg/L, 1,4 mg/L, 1,5 mg/L, 1,6 mg/L, 1,7 mg/L, 1,8 mg/L, 1,9 mg/L, 2,0 mg/L, 2,1 mg/L, 2,2 mg/L, 2,3 mg/L, 2,4 mg/L, 2,5 mg/L, 2,6 mg/L, 2,7 mg/L, 2,8 mg/L, 2,9 mg/L, 3,0 mg/L, 3,1 mg/L, 3,2 mg/L, 3,3 mg/L, 3,4 mg/L, 3,5 mg/L, 3,6 mg/L, 3,7 mg/L, 3,8 mg/L, 3,9 mg/L, 4,0 mg/L, 4,1 mg/L, 4,2 mg/L, 4,3 mg/L, 4,4 mg/L, 4,5 mg/L, 4,6 mg/L, 4,7 mg/L, 4,8 mg/L, 4,9 mg/L ou 5,0 mg/L.

[0091] Em outras modalidades, a concentração desejada de ornitina ou putrescina em uma remessa de meios contendo hidrolisado de soja não é superior a 5,0 mg/L. Ainda em outras modalidades, a concentração desejada de ornitina ou putrescina em uma remessa de meios contendo hidrolisado de soja não é superior a 2,0 mg/L. Noutra modalidade, a concentração desejada de ornitina ou putrescina em uma remessa de meios contendo hidrolisado de soja não é superior a 1,8 mg/L. Em algumas modalidades, a concentração desejada de ornitina ou putrescina em uma remessa de meios contendo soja é de 0,5 mg/L a 5,0 mg/L. Ainda em outras modalidades, a concentração desejada de ornitina ou putrescina em uma remessa de meios contendo hidrolisado de soja cai na faixa de 0,5 mg/L a 2,0 mg/L. Em ainda outra modalidade, a concentração desejada de ornitina ou putrescina em uma remessa de meios contendo hidrolisado de soja cai na faixa de 0,5 mg/L a 1,8

mg/L.

[0092] Em certas modalidades, a qualidade da proteína de interesse ou a quantidade de certos glicanos produzidos em cada preparação de proteína de uma pluralidade de preparações de proteína é aprimorada quando comparada a uma preparação de proteína produzida por um método que inclui a cultura de células em meios suplementados com hidrolisado de soja contendo ornitina ou putrescina a uma concentração superior a 5 mg/L. Em certas modalidades, a qualidade de proteína aprimorada exibida por cada preparação de proteína é medida pela: presença ou ausência de glicosilação em um ou mais aminoácidos da proteína de interesse, quantidade de glicano na proteína de interesse, presença de ácido siálico em um ou mais locais de glicosilação na proteína de interesse ou uma combinação dos mesmos. Numa modalidade, a qualidade da proteína corresponde ao estado de glicosilação de membros individuais de uma população de proteínas produzidas em cultura. Em certas modalidades, a qualidade é aprimorada modulando as substituições de glicosilação presentes nas glicoproteínas individuais de uma população de proteínas produzidas em cultura, cultivando as células em meios suplementados com hidrolisado de soja com uma concentração de 5,0 mg/L ou menos de ornitina ou putrescina, de 0,5 mg/L a 5,0 mg/L de ornitina ou putrescina, ou de 0,5 mg/L a 2,0 mg/L de ornitina ou putrescina.

[0093] Numa modalidade, a qualidade da proteína é determinada comparando a abundância de pelo menos uma molécula de glicano em cada remessa de proteínas de uma pluralidade de preparações de proteína para a abundância da(s) mesma(s) molécula(s) de glicano em outra remessa de proteínas. O termo "abundância", conforme utilizado neste documento, refere-se à porcentagem de proteínas que possuem uma molécula de glicano em particular em um lote de produção em particular ou à quantidade de proteínas que possuem uma molécula de glicano em particular em relação à quantidade de todos os tipos de moléculas de glicano em um lote de produção. Em

algumas modalidades, a molécula de glicano é selecionada do grupo que consiste em A1, A1F, A2, A2F, Man5, NA2, NA2F, NA2G1, NA2G1F, NGA2 e NGA2FI. Numa modalidade específica, a molécula de glicano é A1 (por exemplo, Pico 11 da Figura 2).

[0094] As proteínas de interesse produzidas pelos métodos de cultura de células da presente divulgação exibem características de qualidade favoráveis. A qualidade da proteína pode ser medida, por exemplo, usando métodos bem conhecidos aos versados na técnica, como cromatografia de troca catiônica fraca, foco isoelétrico capilar, cromatografia por exclusão de tamanho, cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), ELISA e/ou análise de western blot. Em algumas modalidades, a qualidade da proteína é medida por espectrometria de massa, como eletroforese capilar acoplada à espectrometria de massas (CE-MS). Em modalidades específicas, a qualidade da proteína é determinada comparando as leituras de espectrometria de massa de cada remessa de proteínas a partir de uma pluralidade de preparações de proteína.

[0095] A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) com detecção fluorescente de lotes de produção exemplificativos mostra que as proteínas de interesse (glicoproteínas) produzidas a partir de células cultivadas em meios que incluem o hidrolisado de soja com uma concentração de ornitina ou putrescina de 0,5 mg/L a 5,0 mg/L têm mais padrões de glicosilação e expressão de glicano consistentes, conforme exemplificado nas Tabelas 2-4, neste documento.

Perfil de Oligossacarídeo

[0096] A extensão e distribuição de cadeias de açúcar N-ligadas específicas nas glicoproteínas podem ser determinadas por meio do perfil de oligossacarídeos. Em uma modalidade, a glicoproteína é desglicosilada com o peptídeo: N-glicosidase F (PNGase F) para clivar e remover os oligossacarídeos N-ligados a partir das cadeias laterais da asparagina. Os

oligossacarídeos são então derivatizados com um reagente fluorescente, como o ácido antranílico. As cadeias de açúcar são, por conseguinte, separadas por HPLC de troca aniônica de fase normal e detectadas com um detector de fluorescência, gerando um cromatograma de HPLC.

[0097] Noutra modalidade, como parte da análise geral de caracterização de carboidratos, os glicopeptídeos individuais são isolados seguidos de digestão com tripsina de glicoproteína reduzida e alquilada. Os glicopeptídeos trípticos individuais são separados por HPLC de fase reversa, acoplada a uma coluna C18 subsequente para maior resolução, conforme necessário. Os oligossacarídeos são liberados a partir de cada um dos glicopeptídeos separados por digestão com PNGase F, derivatizados com ácido antranílico, e analisados por HPLC de fluorescência para obter um perfil oligossacarídico específico da região da glicoproteína. Em uma modalidade em que a glicoproteína é riloncept (SEQ ID NO: 1), resíduos de asparagina em N37, N87, N91, N98, opcionalmente N176, N189, N279, N418, N511, N551, N567, N581, N615 e N730 são glicosilados. Numa modalidade, qualquer um ou mais dos resíduos N37, N98, N418 e N511 do riloncept (posições de resíduos correlacionadas com a SEQ ID NO: 1) contêm um oligossacarídeo A1. Numa modalidade em que a glicoproteína é aflibercept (SEQ ID NO: 2), os resíduos de asparagina em N36, N68, N123, N196 e N282 são glicosilados. Numa modalidade, qualquer um ou ambos os resíduos N123 e N196 do aflibercept (posições de resíduos correlacionadas com a SEQ ID NO: 2) contêm um oligossacarídeo A1.

[0098] Noutra modalidade, os conjuntos de oligossacarídeos da glicoproteína são gerados por desglicosilação das proteínas com PNGase F, seguida por derivatização do ácido antranílico e subsequente extração em fase sólida (SPE). As massas de oligossacarídeos são então medidas usando MALDI-TOF em um modo linear negativo com 2, 4, 6-tri-hidroxiacetofenona (THAP) como matriz.

[0099] Cada massa observada é atribuída a uma estrutura oligossacarídica única com base nas massas de glicanos N-ligadas comumente observados em proteínas recombinantes. As atribuições de massa esperadas de todos os picos estão resumidas na Tabela 1. As massas esperadas são a massa média calculada com base nas estruturas de cadeia de açúcar N-ligadas propostas com adição de massa de resíduo de ácido antranílico. As composições de monossacarídeos também são listadas com base nas estruturas de cadeia de açúcar N-ligadas propostas.

[00100] Em outra modalidade, um ensaio quantitativo de impressão digital de oligossacarídeos usando eletroforese capilar é usado para caracterizar a estrutura de N-glicano (oligossacarídeo) da glicoproteína em questão. A glicoproteína é desnaturada e depois desglicosilada por meio de tratamento com PNGase F. Os oligossacarídeos liberados são então isolados por precipitação seguido da remoção da proteína. Os conjuntos de oligossacarídeos isolados são marcados com o fluoróforo 1,3,6-trissulfonato de 8-aminopireno (APTS). Os oligossacarídeos marcados são então separados por eletroforese capilar e monitorados com um detector de fluorescência induzido por laser usando um comprimento de onda de excitação de 488 nm e comprimento de onda de emissão de 520 nm.

[00101] Um eletroferograma é gerado, conforme mostrado na Figura 2 para a glicoproteína aflibercept, com todos os picos quantificáveis numerados (total de 21 picos neste exemplo). É determinada a área total do pico integrada (área total do pico) para a impressão digital de oligossacarídeos. A quantidade relativa de cada oligossacarídeo pode ser determinada dividindo a área do pico para esse oligossacarídeo específico (por exemplo, área do pico A1) pela área total do pico.

[00102] Em algumas modalidades, a qualidade da glicoproteína em questão é avaliada determinando o nível de sialilação (a quantidade de resíduos siálicos por glicoproteína) ou fucosilação (a quantidade de resíduos

de fucose por glicoproteína). Numa modalidade, o número total de ácidos siálicos em uma glicoproteína é determinado usando um ensaio quantitativo por HPLC. Neste ensaio, os ácidos siálicos são liberados a partir da glicoproteína usando hidrólise ácida suave, depois são derivatizados com o-fenilenodiamina, separados por HPLC, e detectados com detectores de UV ou de fluorescência. A quantificação do ácido siálico pode ser avaliada em relação a uma curva padrão usando, por exemplo, sialilactose. O teor de ácido siálico é calculado a partir das moles de ácido siálico liberadas e das moles da glicoproteína usada na reação.

[00103] Em uma modalidade, o conteúdo de ácido siálico da glicoproteína riloncept é de cerca de 30 – 70 moles de ácido siálico por 1 mole de glicoproteína (mol/mol), cerca de 35 – 65 mol/mol, 30 mol/mol, 31 mol/mol, 32 Mol/mol, 33 mol/mol, 34 mol/mol, 35 mol/mol, 36 mol/mol, 37 mol/mol, 38 mol/mol, 39 mol/mol, 40 mol/mol, 41 mol/mol, 42 mol/mol, 43 mol/mol, 44 mol/mol, 45 mol/mol, 46 mol/mol, 47 mol/mol, 48 mol/mol, 49 mol/mol, 50 mol/mol, 51 mol/mol, 52 Mol/mol, 53 mol/mol, 54 mol/mol, 55 mol/mol, 56 mol/mol, 57 mol/mol, 58 mol/mol, 59 mol/mol, 60 mol/mol, 61 mol/mol, 62 mol/mol, 63 mol/mol, 64 mol/mol, 65 mol/mol, 66 mol/mol, 67 mol/mol, 68 mol/mol, 69 mol/mol ou 70 mol/mol.

[00104] Em uma modalidade, o conteúdo de ácido siálico da glicoproteína aflibercept é de cerca de 5 – 15 moles de ácido siálico por 1 mole de glicoproteína (mol/mol), cerca de 8 – 12 mol/mol, 4 mol/mol, 5 mol/mol, 6 mol/mol, 7 mol/mol, 8 mol/mol, 9 mol/mol, 10 mol/mol, 11 mol/mol, 12 mol/mol, 13 mol/mol, 14 mol/mol, 15 mol/mol, 16 mol/mol, 17 mol/mol, 18 mol/mol, 19 mol/mol ou 20 mol/mol.

[00105] Numa modalidade, o perfil de oligossacarídeo é empregado para determinar a extensão e a distribuição da sialilação das cadeias de açúcar N-ligadas na glicoproteína. A glicoproteína é desglicosilada com PNGase F e depois derivatizada com o reagente fluorescente, ácido antranílico. Os

oligossacarídeos são então separados por HPLC de troca aniônica de fase normal e detectados com um detector de fluorescência para gerar um cromatograma por HPLC do perfil de oligossacarídeo. O número Z (que mede o grau médio de sialilação) da glicoproteína é calculado a partir da seguinte fórmula:

$$\frac{(OSA * O) + (ISA * 1) + (2SA * 2) + (3SA * 3) + \dots + (nSA * n)}{(OSA + 15A + 2SA + 35A + \dots + n5A)}$$

[00106] Para determinar o número Z, a área de cada pico a partir do perfil de oligossacarídeos é integrada. O ácido siálico total é calculado como a soma das áreas dos 0 picos de ácido siálico/cadeia multiplicados por 0, os 1 picos de ácido siálico/cadeia multiplicados por 1, os 2 picos de ácido siálico/cadeia multiplicados por 2 e os 3 siálicos picos de ácido/cadeia multiplicados por 3, etc. O número total de cadeias de açúcar é gerado como a soma das áreas de todos os picos. O número Z é a área total de ácido siálico dividida pela área total da cadeia de açúcar.

[00107] Em uma modalidade, o número Z do ácido siálico da glicoproteína riloncept é de cerca de 1,3 – 1,6, 1,4 – 1,5, 1,41 – 1,48, 1,3, 1,31, 1,32, 1,33, 1,34, 1,35, 1,36, 1,37, 1,38, 1,39, 1,4, 1,41, 1,42, 1,43, 1,44, 1,45, 1,46, 1,47, 1,48, 1,49, 1,5, 1,51, 1,52, 1,53, 1,54, 1,55, 1,56, 1,57, 1,58, 1,59 ou 1,60.

[00108] Em uma modalidade, o número Z do ácido siálico da glicoproteína aflibercept é de cerca de 0,5 – 2, 1 – 1,5, 1 – 1,2, 0,5, 0,51, 0,52, 0,53, 0,54, 0,55, 0,56, 0,57, 0,58, 0,59, 0,6, 0,61, 0,62, 0,63, 0,64, 0,65, 0,66, 0,67, 0,68, 0,69, 0,7, 0,71, 0,72, 0,73, 0,74, 0,75, 0,76, 0,77, 0,78, 0,79, 0,8, 0,81, 0,82, 0,83, 0,84, 0,86, 0,87, 0,88, 0,89, 0,9, 0,91, 0,92, 0,93, 0,94, 0,95, 0,96, 0,97, 0,98, 0,99, 1, 1,01, 1,02, 1,03, 1,04, 1,05, 1,06, 1,07, 1,08, 1,09, 1,1, 1,11, 1,12, 1,13, 1,14, 1,15, 1,16, 1,17, 1,18, 1,19, 1,2, 1,21, 1,22, 1,23, 1,24, 1,25, 1,26, 1,27, 1,28, 1,29 ou 1,3.

EXEMPLOS

[00109] Os seguintes exemplos são apresentados de modo a prover àqueles versados na técnica como fazer e utilizar os métodos e composições da neste documento, e não se destinam a limitar o escopo do que os inventores consideram sua invenção. Esforços têm sido feitos para garantir a precisão com relação aos números usados (por exemplo, quantidades, temperatura, etc.), mas alguns erros e desvios experimentais devem ser considerados. A menos que indicado de outra forma, as partes são partes em peso, peso molecular é o peso molecular médio, temperatura é em graus centígrados e pressão é atmosférica ou próxima à atmosférica.

Exemplo 1: Triagem de Hidrolisado de Soja para Determinar a Concentração de Aminoácidos.

[00110] Uma amostra de hidrolisado de soja foi pesada e uma porção de 20 gramas da mesma foi dissolvida em 1 L de água até uma concentração inicial de 20 g/L. A solução de hidrolisado de soja resultante foi então diluída adicionalmente em água até uma concentração desejada para uso em cultura de células e a composição molecular da solução de hidrolisado de soja resultante foi determinada utilizando cromatografia.

[00111] A concentração de aminoácidos na amostra de hidrolisado de soja foi medida por cromatografia em uma coluna de troca iônica com detecção de ninidrina pós-coluna. Consultar, por exemplo, Moore e Stein. J. Biol. Chem. (1954) vol. 211 pp. 907-913. As amostras de hidrolisado de soja foram diluídas para permitir separação e resolução sensíveis de picos individuais (aminoácidos) como eluídos da coluna de HPLC e comparados com um padrão. Cada área de pico do cromatograma, conforme mostrado nas Figuras 1A e 1B, foi comparado a um padrão para determinar a concentração de cada eluato.

[00112] Para determinar se uma remessa de pó de hidrolisado de soja contém menos de 0,67 miligrama de ornitina ou putrescina por grama de soja, o cromatograma de cada amostra representativa é comparado a um padrão.

Por exemplo, a Figura 1A mostra uma remessa de hidrolisado de soja com um eluato contendo ornitina no tempo de retenção 89,02, que revela uma área de pico equivalente a 1,57 mg de ornitina por g de soja de ornitina, em comparação com o padrão. A Figura 1B ilustra uma remessa de hidrolisado de soja com uma concentração de ornitina inferior a 0,67 mg de ornitina por g de soja. As remessas de hidrolisado de soja com entre 0,067 e 0,67 mg de ornitina por g de soja foram selecionados para uso em métodos de cultura de células para produzir proteínas bioterapêuticas com glicosilação de proteínas mais consistente de lote para lote. No entanto, as remessas de hidrolisado de soja contendo ornitina em uma concentração superior a 0,67 mg de ornitina por g de soja foram empregadas em outras experiências, conforme descrito abaixo, para determinar os efeitos da concentração de hidrolisado de ornitina na produção de proteína.

Exemplo 2: Expressão e Perfil de Glicosilação de uma Proteína de Interesse.

[00113] As células CHO que expressam uma proteína trap (bloqueador, proteína de fusão receptor-Fc, armadilha VEGF) foram cultivadas em meio proprietário, incluindo o hidrolisado de soja contendo quantidades variáveis de ornitina, putrescina e citrulina, ou uma combinação dos mesmos, a fim de determinar quais componentes de aminoácidos afetam qualidade das proteínas produzidas. A Tabela 2 mostra que os níveis de ornitina no hidrolisado se correlacionam negativamente com a qualidade dos lotes de produção de proteína, conforme indicado pela área aumentada sob a curva para um N-glicano essencial para lotes de proteína produzidos como resultado da cultura de células CHO em meios suplementado com hidrolisado de soja contendo ornitina em uma concentração inferior a 5,0 mg/L, independentemente da concentração de citrulina.

[00114] Conforme mostrado na Tabela 2 e representado na Figura 3, os lotes de produtos de proteína trap VEGF produzidos por células cultivadas em meios incluindo hidrolisado de soja com uma concentração de ornitina de 2,0

mg/L ou menos produzem produto proteicos de melhor qualidade, quando comparadas às células cultivadas em meios compreendendo mais de 5,0 mg/L de ornitina, citrulina ou putrescina.

TABELA 2

Concentração de aminoácidos de soja	Quantidade relativa de A1 N-glicano (% da área sob a curva)
1,6 mg/L de ornitina	12,5
6,6 mg/L de ornitina	9,8
31,6 mg/L de ornitina	9,3
36,6 mg/L putrescina	9,0
1,6 mg/L de ornitina; 0 mg/L de citrulina	12,0
1,6 mg/L de ornitina; 30 mg/L de citrulina	11,5
31,6 mg/L de ornitina 0 mg/L de citrulina	8,8

[00115] A análise detalhada do glicano foi realizada usando cromatografia baseada em métodos conhecidos para HPLC e tags de ácido antranílico fluorescente (AA) (Anumula e Dhume, Glycobiology (1998) 8 (7) pp. 685-694) para cada lote de glicoproteína para determinar se a ornitina teve um impacto nos perfis de glicosilação de proteína. Conforme mostrado na Tabela 3, cultivar células em meios que incluem hidrolisado de soja compreendendo menor ou igual a 0,67 mg de ornitina por g de soja resulta em uma produção de proteína mais consistente de lote para lote. Mais especificamente, ~ 90% dos lotes de produção cultivados em meios compreendendo hidrolisado de soja selecionado atendem aos critérios de produção da FDA. Por outro lado, apenas 57% dos lotes de produção cultivados em meios compreendendo hidrolisado de soja com mais de 5 mg/L de ornitina atendem aos critérios de produção da FDA (área sob a curva para um pico específico de N-glicano). Conforme mostrado na Tabela 3, os lotes de produtos de proteína VEGF-trap produzidos por células cultivadas em meios que incluem hidrolisado de soja com uma concentração de ornitina de 0,67 mg de ornitina por g de soja ou menos exibem aumento da qualidade do produto e qualidade mais consistente de lote para lote.

Tabela 3:

mg de ornitina por g de soja	Lotes com quantidade de glicano superior a 10,5% (parâmetro de qualidade)	Lotes de produtos de proteína adequados	Lotes de produtos de proteína com falha
≤ 0,67	21	19/21	21/2
> 0,67	4	4/7	3/7

[00116] Cada lote de produção também foi comparado (em relação ao perfil de glicano) com um padrão de referência que representa uma remessa terapeuticamente aceitável para a proteína de armadilha de VEGF exemplar. A análise representativa do glicano é mostrada na Tabela 4 para lotes de proteína produzidos a partir de células cultivadas em meio suplementado com hidrolisado de soja, resultando em concentração final de ornitina entre 0,5 mg/L e 2,0 mg/L. Comparado com a referência, cada proteína trap produzida compreende um perfil de glicano consistente com picos dentro de uma faixa aceitável (75% dos lotes analisados). Por outro lado, cada lote produzido por células cultivadas em meio suplementado com hidrolisado de soja contendo mais de 5,0 mg/L de ornitina não cumpriu os critérios de aceitação da FDA. Conforme mostrado na Tabela 4, lotes de produtos de proteína produzidos por células cultivadas em meios incluindo hidrolisado de soja com uma concentração de ornitina de 0,5 mg /L a 2,0 mg/L ou menos produzem lotes de qualidade superior, conforme demonstrado pelos níveis de N-glicano A1 caindo abaixo dos critérios de aceitação do produto, do que células cultivadas em meios compreendendo mais hidrolisado de soja com uma concentração de ornitina superior a 5,0 mg/L.

TABELA 4:

Glicano	A2	A2F	A1	A1F	NGA2F	NA2G1F	NA2	NA2F	ornitina (mg/L)
Critérios de aceitação do lote do produto (% da área sob a curva)	4-9	10-23	10-17	11-19	5-17	8-13	4-11	2-8	_____
Remessa n° 1 de hidrolisado de soja	6,4	15,2	12,5	14,1	9,9	9,6	6,7	4,4	1,8
Remessa n° 2 de hidrolisado de soja	7,0	16,8	13,2	13,9	9,6	9,9	6,7	4,1	0,5
Remessa n° 3 de hidrolisado de soja	7,0	18,5	11,9	13,5	9,5	10,2	5,9	4	1,5

Lote n° 4 de hidrolisado de soja	9,7	18,1	14,7	11,0	8,5	9,5	5,5	3,6	0,6
Lote n° 5 de hidrolisado de soja	6,0	16,6	9,8	13,5	11,6	9,9	5,8	4,3	13,6
Lote n° 6 de hidrolisado de soja	5,6	15,7	9,2	14,2	12,1	10,5	6,3	4,5	28,6

[00117] A Figura 4 mostra a forte correlação negativa entre o nível de ornitina na qualidade do hidrolisado de soja e glicoproteína (aflibercept), conforme demonstrado pelos níveis de N-glicano A1.

Exemplo 3: Títulos de Produção de Glicoproteínas

[00118] Foram testados 16 lotes de hidrolisados de soja quanto à capacidade de afetar a metabolômica da produção de células CHO de riloncept. Aproximadamente 426 analitos de hidrolisado de soja foram medidos e comparados com o título final da glicoproteína e o metabolismo do lactato. A Figura 5 mostra os gráficos de carregamento das correlações entre os analitos de hidrolisado de soja e o título máximo de lactato e glicoproteína final. As determinações do título de lactato e glicoproteína demonstram uma correlação negativa de ornitina no hidrolisado de soja.

Exemplo 4: Confirmação de Marcador com Estudo de Picos

[00119] As Figuras 6A e 6B representam culturas de células CHO sob meios de controle e condições de alimentação que receberam um pico de ornitina ou putrescina para demonstrar o efeito da ornitina e putrescina, respectivamente, no crescimento celular e glicosilação. A Tabela 6B destaca o efeito no pico 11, que é particularmente pronunciado.

[00120] Tendo descrito modalidades da invenção com referência aos desenhos anexos, deve ser entendido que a invenção não está limitada às modalidades precisas e que várias alterações e modificações podem ser efetuadas no mesmo pelos versados na técnica sem se afastar do escopo ou espírito da invenção, conforme definido nas reivindicações anexas

REIVINDICAÇÕES

1. Método, caracterizado pelo fato de que compreende:

cultivar uma população de células que expressam uma glicoproteína heteróloga recombinante em meios de cultura de células compreendendo hidrolisado de soja para produzir a glicoproteína heteróloga recombinante, e em que o hidrolisado de soja compreende $\leq 0,067\%$ (p/p) de ornitina ou putrescina.

2. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a população de células é obtida por expansão clonal de uma célula que expressa uma glicoproteína heteróloga recombinante.

3. Método de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que o hidrolisado de soja compreende $0,003\% - 0,027\%$ (p/p) de ornitina ou putrescina.

4. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo fato de que os meios de cultura compreendem ≤ 5 mg/L de ornitina ou putrescina.

5. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizado pelo fato de que os meios de cultura compreendem $0,6 - 3$ mg/L de ornitina ou putrescina.

6. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, caracterizado pelo fato de que a glicoproteína é uma molécula trap (bloqueador).

7. Método de acordo com a reivindicação 6, caracterizado pelo fato de que a molécula trap é selecionada do grupo que consiste em etanercept, riloncept e aflibercept.

8. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, caracterizado pelo fato de que a glicoproteína compreende um N-glicano A1 e pelo menos uma outra espécie de N-glicano, em que a quantidade relativa de N-glicano A1 é $\geq 10\%$ (p/p) da quantidade total de todas as

espécies de N-glicano da glicoproteína.

9. Método, caracterizado pelo fato de que compreende:

a. cultivar uma célula que expressa uma proteína glicosilada em um meio de cultura celular para produzir a glicoproteína;

b. purificar a proteína glicosilada;

c. submeter a proteína glicosilada purificada à análise de impressões digitais de oligossacarídeos;

d. determinar a quantidade relativa de um N-glicano A1 em comparação com a quantidade total de espécies de N-glicano da glicoproteína;

e

e. selecionar um hidrolisado de soja que forneça pelo menos 10% (p/p) de N-glicano A1 em comparação com a quantidade total de espécies de N-glicano da glicoproteína.

10. Método de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelo fato de que o hidrolisado de soja selecionado compreende $\leq 0,067\%$ (p/p) de ornitina ou putrescina.

11. Método de acordo com a reivindicação 9 ou 10, caracterizado pelo fato de que o hidrolisado de soja selecionado compreende 0,003% - 0,027% (p/p) de ornitina ou putrescina.

12. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 9 a 11, caracterizado pelo fato de que os meios de cultura compreendem 0,6 – 3 mg/L de ornitina ou putrescina.

13. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 9 a 12, caracterizado pelo fato de que a glicoproteína é uma molécula trap.

14. Método de acordo com a reivindicação 13, caracterizado pelo fato de que a molécula trap é selecionada do grupo que consiste em etanercept, riloncept e aflibercept.

15. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 9 a 14, caracterizado pelo fato de que a glicoproteína compreende 8-12 moles

de ácido siálico por mol de glicoproteína, ou 35-65 moles de ácido siálico por mol de glicoproteína.

16. Método para selecionar um hidrolisado de soja para uso na fabricação de uma glicoproteína, sendo o método caracterizado pelo fato de que compreende:

a. medir a quantidade de ornitina ou putrescina em um hidrolisado de soja;

b. selecionar um hidrolisado de soja com $\leq 0,067\%$ (p/p) de ornitina ou putrescina; e

c. combinar o hidrolisado de soja selecionado com um ingrediente adicional para formar um meio de cultura de células com ≤ 5 mg/L de ornitina ou putrescina.

17. Método de acordo com a reivindicação 16, caracterizado pelo fato de que o hidrolisado de soja selecionado compreende 0,003%-0,027% (p/p) de ornitina ou putrescina.

18. Método de acordo com a reivindicação 16 ou 17, caracterizado pelo fato de que o meio de cultura compreende 0,6-3 mg/L de ornitina ou putrescina.

19. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 16 a 18, caracterizado pelo fato de que a glicoproteína é uma molécula trap.

20. Método de acordo com a reivindicação 19, caracterizado pelo fato de que a molécula trap é selecionada do grupo que consiste em etanercept, riloncept e aflibercept.

21. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 16 a 20, caracterizado pelo fato de que a glicoproteína compreende um N-glicano A1 e pelo menos uma outra espécie de N-glicano, em que a quantidade relativa de N-glicano A1 é $\geq 10\%$ (p/p) da quantidade total de todas as espécies de N-glicano da glicoproteína.

22. Glicoproteína, caracterizada pelo fato de que compreende

um N-glicano A1 e pelo menos uma outra espécie de N-glicano, em que a quantidade relativa do N-glicano A1 é de pelo menos 10% (p/p) da quantidade total de N-glicanos da referida glicoproteína.

23. Glicoproteína de acordo com a reivindicação 22, caracterizada pelo fato de que a referida glicoproteína é uma molécula trap.

24. Glicoproteína de acordo com a reivindicação 23, caracterizada pelo fato de que a molécula trap é selecionada do grupo que consiste em etanercept, riloncept e aflibercept.

25. Glicoproteína de acordo com a reivindicação 22, caracterizada pelo fato de que a referida glicoproteína compreende ainda um N-glicano A2, um N-glicano A2F, um N-glicano A1F, um N-glicano NGA2F, um N-glicano NA2G1F, um N-glicano NA2 e um N-glicano NA2F.

26. Glicoproteína de acordo com qualquer uma das reivindicações 22 a 25, caracterizada pelo fato de que a quantidade relativa do N-glicano A1 é determinada comparando-se a área sob o pico do N-glicano A1 com as áreas totais sob o pico para todos os N-glicanos de uma impressão digital de oligossacarídeos obtida por eletroforese capilar.

27. Glicoproteína de acordo com qualquer uma das reivindicações 22 a 26, caracterizada pelo fato de que a quantidade relativa do N-glicano A1 é de 10% - 17% (p/p).

28. Glicoproteína de acordo com a reivindicação 24, caracterizada pelo fato de que a glicoproteína é riloncept com 35-65 moles de ácido siálico por mol de glicoproteína.

29. Glicoproteína de acordo com a reivindicação 28, caracterizada pelo fato de que o riloncept compreende um N-glicano A1 em qualquer um ou mais dos resíduos N37, N98, N418 e N511 da SEQ ID NO: 1.

30. Glicoproteína de acordo com a reivindicação 24, caracterizada pelo fato de que a glicoproteína é aflibercept com 8-12 moles de ácido siálico por mol de glicoproteína.

31. Glicoproteína de acordo com a reivindicação 30, caracterizada pelo fato de que o aflibercept compreende um N-glicano A1 em qualquer um ou mais dos resíduos N123 e N196 da SEQ ID NO: 2.

32. Método, caracterizado pelo fato de que compreende:

a. digerir enzimaticamente o extrato de soja em um recipiente de reação sem resíduos para fabricar um hidrolisado de soja;

b. medir a quantidade de ornitina ou putrescina em um hidrolisado de soja; e

c. selecionar o hidrolisado de soja com $\leq 0,067\%$ (p/p) de ornitina ou putrescina para uso em um meio de cultura de células.

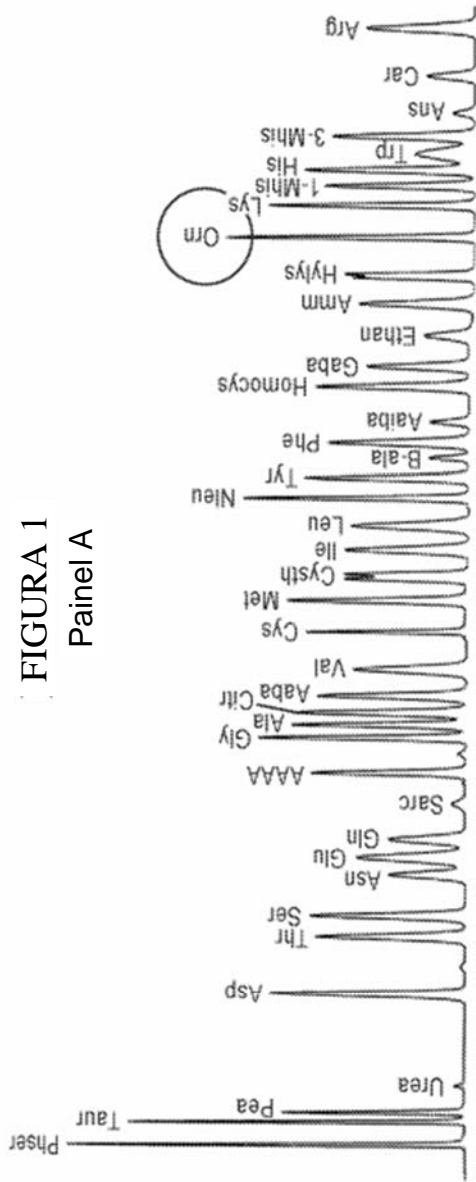
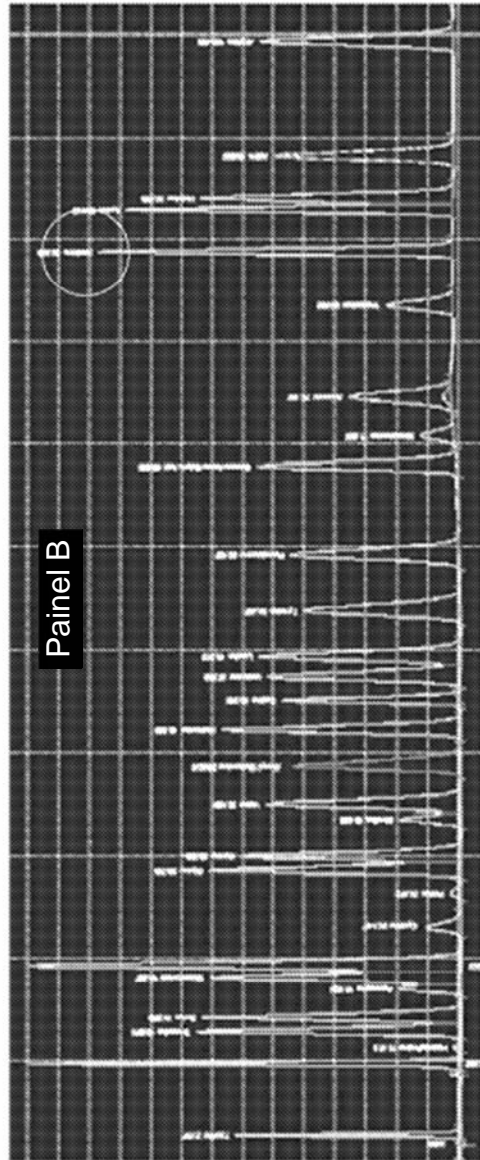


FIGURA 1
Painel A



Painel B

FIGURA 2

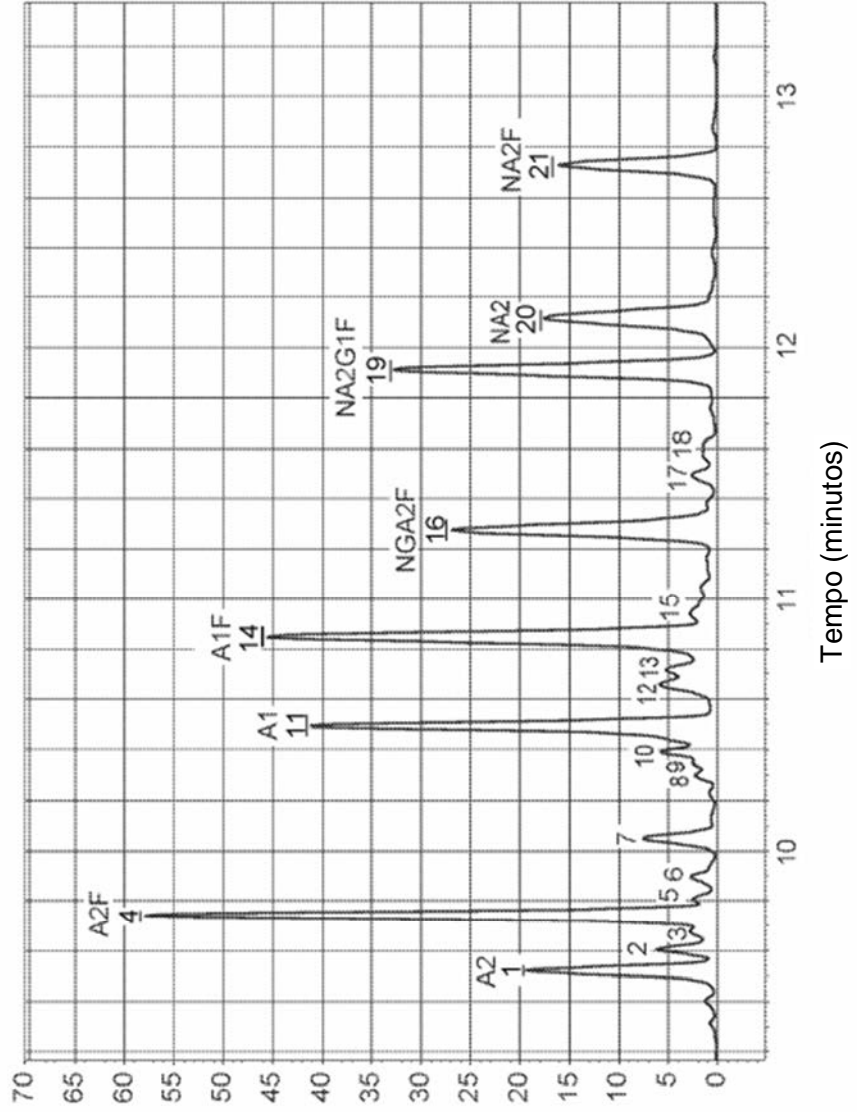


FIGURA 5

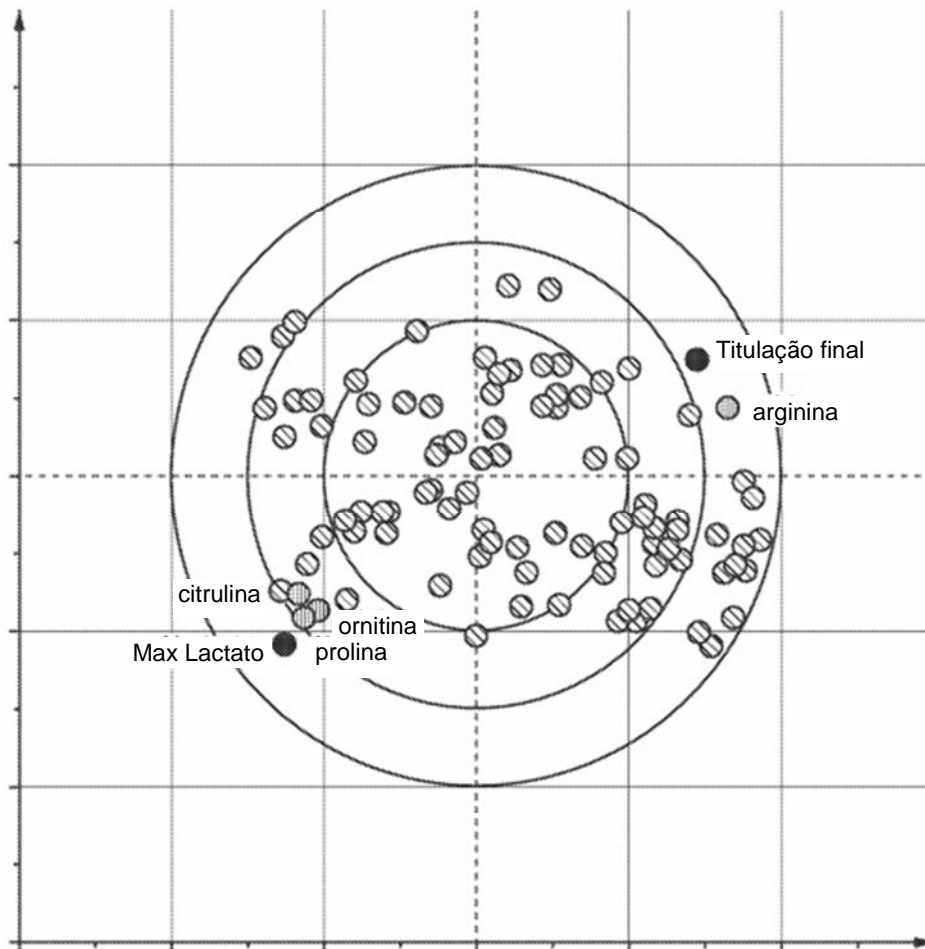
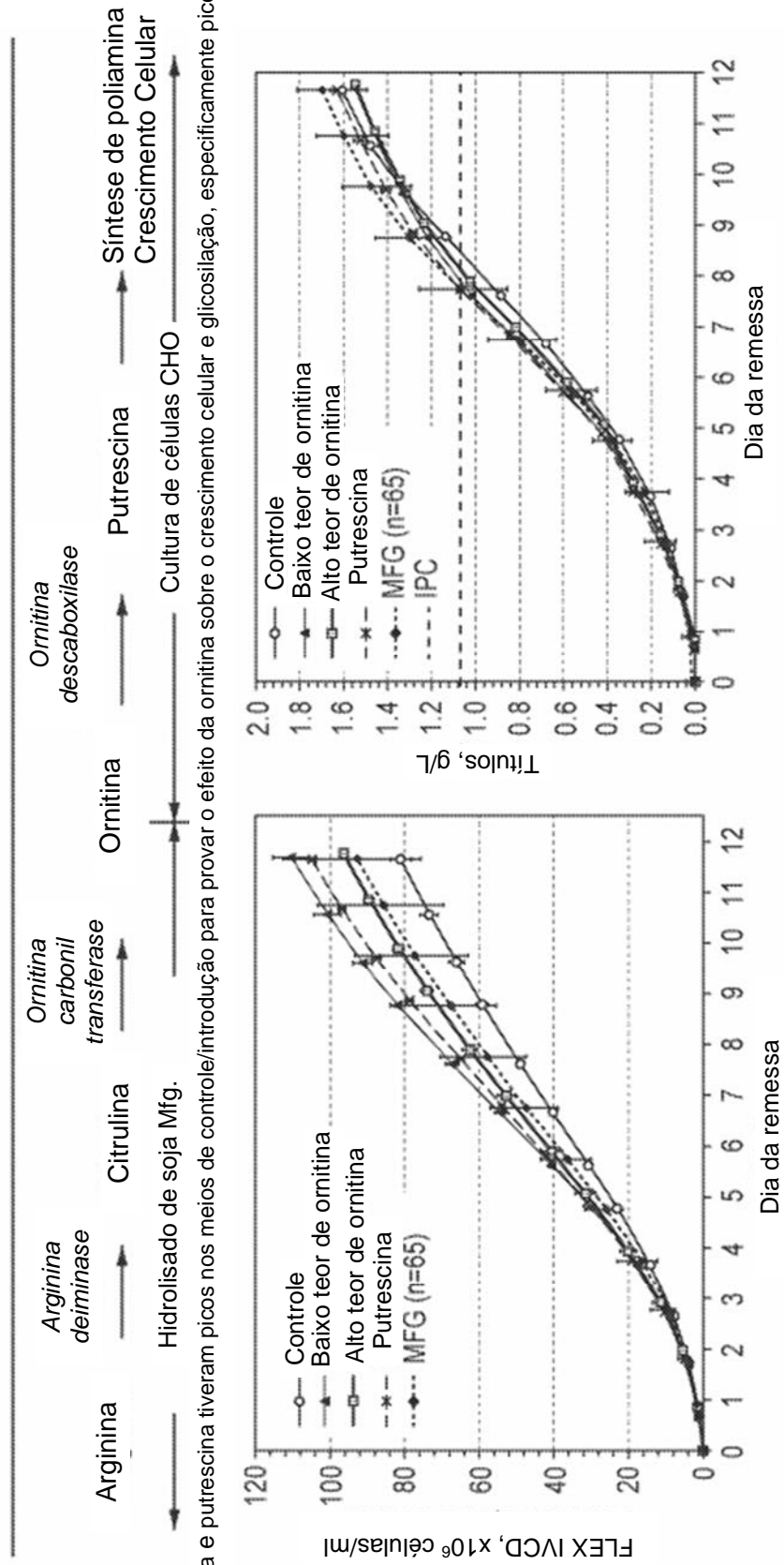


FIGURA 6A



A ornitina e putrescina tiveram picos nos meios de controle/introdução para provar o efeito da ornitina sobre o crescimento celular e glicosilação, especificamente pico 11.

FIGURA 6B

Condição	Controle	Pico de baixo teor de ornitina	Pico de alto teor de ornitina	Pico de putrescina
Conc., mg/L	1.6	6.6	31.6	36.6
Títulos, g/L	1.61	1.55	1.55	1.63
IVCD, x10 ⁶ células-dia/ml	80.9	110.4	96.2	104.8
Pico 11, %	12.5	9.8	9.3	9.0

RESUMO**MÉTODO PARA SELECIONAR UM HIDROLISADO DE SOJA, E, GLICOPROTEÍNA**

O presente pedido fornece um método para triar remessas de hidrolisado de soja para uma quantidade desejada de um componente do mesmo, como ornitina ou putrescina, e selecionar apenas as remessas de hidrolisado de soja que possuem uma quantidade desejada de tal componente. A presente divulgação também estabelece métodos para cultivar células em meios suplementados com remessas selecionadas de soja para produzir lotes mais consistentes e de alta qualidade de uma proteína de interesse. Adicionalmente, a presente divulgação fornece uma pluralidade de preparações de proteínas que foram produzidas, cada um, cultivando-se células em meios suplementados com remessas separadas de hidrolisado de soja contendo uma quantidade desejada de ornitina ou putrescina, em que cada remessa de proteína produzida exibe qualidade aprimorada da proteína de interesse ou quantidade de proteína de qualidade produzida.

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

Código de Controle

Campo 1



Campo 2



Outras Informações:

- Nome do Arquivo: P140214list.txt
- Data de Geração do Código: 03/01/2020
- Hora de Geração do Código: 14:39:17
- Código de Controle:
 - Campo 1: 5C0D95AA99C26FC6
 - Campo 2: F383F8679DE31723