





## **AVALIAÇÃO DO PADRÃO DE GLICOSILAÇÃO DE UM ANTICORPO MONOCLONAL PRODUZIDO POR CÉLULAS CHO**

**Juissan Medalith Aguedo Ariza**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Instituto de Química, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientadora: Leda dos Reis Castilho

**RIO DE JANEIRO**

**Mai de 2017**

**AVALIAÇÃO DO PADRÃO DE GLICOSILAÇÃO DE UM ANTICORPO  
MONOCLONAL PRODUZIDO POR CÉLULAS CHO**

Juissan Medalith Aguedo Ariza

Orientadora: Leda dos Reis Castilho

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Instituto de Química, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências.

Aprovada por:

---

Profa. Leda dos Reis Castilho, Dr.-Ing. (Orientadora)

---

Prof. Richard Hemmi Valente, D. Sc.

---

Dr. Rimenys Junior Carvalho

**RIO DE JANEIRO**

**Mai de 2017**

C957

Ariza, Juvisan Medalith Aguedo.

Avaliação do padrão de glicosilação de um anticorpo monoclonal produzido por células CHO/ Juvisan Medalith Aguedo Ariza – Rio de Janeiro: UFRJ/IQ, 2017.

100f.

Dissertação (Mestrado em Ciências) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Química, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, 2017.

Orientadora: Leda dos Reis Castilho

1. Células CHO. 2. Anticorpo monoclonal. 3. Purificação. 4. N-glicosilação. 5. HILIC-HPLC. 6. MALDI-TOF/TOF. I. Castilho, Leda dos Reis. (Orient.). II. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Instituto de Química. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. III. Título.

CDD: 542



## RESUMO

### AVALIAÇÃO DO PADRÃO DE GLICOSILAÇÃO DE UM ANTICORPO MONOCLONAL PRODUZIDO POR CÉLULAS CHO

Juissan Medalith Aguedo Ariza  
Orientadora: Leda dos Reis Castilho

Resumo de Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Instituto de Química, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências.

Os anticorpos monoclonais (mAbs) representam a classe mais importante entre as proteínas terapêuticas. Os biofármacos baseados em mAbs incluem também conjugados mAb-droga e proteínas de fusão-com a porção constante (Fc) de um anticorpo. O padrão de glicosilação de mAbs pode influenciar a estrutura, função, farmacocinética, farmacodinâmica e imunogenicidade da molécula. Assim, a glicosilação pode ter impacto na segurança e eficácia do produto e é considerada um atributo de qualidade crítico (CQA) pela indústria e agências reguladoras de medicamentos.

No presente trabalho, foi investigado o padrão de glicosilação de um mAb da classe IgG<sub>1</sub>, humanizado e produzido por células da linhagem CHO nos modos de batelada e perfusão, utilizando cromatografia de interação hidrofílica (HILIC-HPLC) e espectrometria de massas MALDI-TOF/TOF. O mAb foi purificado a partir do sobrenadante de cultivo celular utilizando cromatografia de afinidade com Proteína A e tratado com PNGase F para liberar os glicanos. Para a análise HILIC-HPLC, os glicanos foram marcados com 2-aminobenzamida, separados utilizando uma coluna TSKgel Amida-80, e foram propostas estruturas glicosiladas com base na base de dados Glycobase 3.2.4. A análise repetida das amostras após tratamento com diferentes exoglicosidases ajudou a elucidar a estrutura das cadeias de oligossacarídeos. O método HILIC-HPLC proporcionou uma quantificação relativa de glicanos do anticorpo por meio de uma única análise. Verificou-se que o grau de fucosilação era de 99%, enquanto que os graus de manosilação e sialilação eram de 0,6% e 0,4%, respectivamente. A glicofoma predominante foi G0F (48,6%), seguida por G1F (43,3%), G2F (6,4%) e G2S1 (0,4%). Os glicanos híbridos representaram 0,7% das glicofomas. A análise MALDI-TOF/TOF confirmou esta distribuição de glicofomas e mostrou que as massas dos glicanos principais eram as esperadas (1485,6 Da para G0F, 1647,6 Da para G1F e 1809,7 Da para G2F). As técnicas utilizadas neste trabalho permitiram avaliar comparativamente a composição do perfil de N-glicosilação do mAb estudado, podendo, portanto, ser consideradas como métodos de rotina para a detecção e quantificação de micro-heterogeneidades de N-glicosilação em amostras de anticorpos monoclonais.

Palavras-chave: 1. Células CHO. 2. Anticorpo monoclonal. 3. Purificação. 4. N-glicosilação. 5. HILIC-HPLC. 6. MALDI-TOF/TOF.

**RIO DE JANEIRO**  
**Mai de 2017**

## **ABSTRACT**

### **EVALUATION OF THE GLYCOSYLATION PATTERN OF A MONOCLONAL ANTIBODY PRODUCED BY CHO CELLS**

Juvisan Medalith Aguedo Ariza

Advisor: Leda dos Reis Castilho

Abstract of Dissertation submitted to Postgraduate Program in Biochemistry, Chemistry Institute, Federal University of Rio de Janeiro, as part of the requirements for obtaining the degree of Master of Sciences.

Monoclonal antibodies (mAbs) represent the most important class among therapeutic proteins. Biopharmaceuticals based on mAbs also include mAb-drug conjugates and fusion proteins-with the constant (Fc) portion of an antibody. The glycosylation pattern of mAbs can influence the structure, function, pharmacokinetics, pharmacodynamics and immunogenicity of the molecule. Thus, glycosylation can have an impact on the safety and efficacy of the product and is considered a critical quality attribute (CQA) by industry and drug regulatory agencies.

In the present work, was investigated the glycosylation pattern of a humanized mAb of the IgG1 class and produced by CHO cells line in the batch and perfusion modes using hydrophilic interaction chromatography (HILIC-HPLC) and MALDI-TOF/TOF. The mAb was purified from the cell culture supernatant using Protein A affinity chromatography and treated with PNGase F to release the glycans. For HILIC-HPLC analysis, the glycans were labeled with 2-aminobenzamide, separated using a TSKgel Amide-80 column, and glycosylated structures were proposed based on the Glycobase 3.2.4 database. Repeated analysis of the samples after treatment with different exoglycosidases helped elucidate the structure of the oligosaccharide chains. The HILIC-HPLC method provided a relative quantification of glycans of the antibody by a single analysis. The degree of fucosylation was found to be 99%, while the degrees of mannosylation and sialylation were 0.6% and 0.4%, respectively. The predominant glycoform was G0F (48.6%), followed by G1F (43.3%), G2F (6.4%) and G2S1 (0.4%). Hybrid glycans represented 0.7% of glycoforms. The MALDI-TOF/TOF analysis confirmed this glycoform distribution and showed that the masses of the major glycans were as expected (1485.6 Da for G0F, 1647.6 Da for G1F and 1809.7 Da for G2F). The techniques used in this work allowed comparing the composition of the N-glycosylation pattern of the studied mAb and could therefore be considered as routine methods for the detection and quantification of N-glycosylation micro-heterogeneities in samples of monoclonal antibodies.

Keywords: 1. CHO Cells. 2. Monoclonal Antibody. 3. Purification. 4. N-glycosylation. 5. HILIC-HPLC. 6. MALDI-TOF/TOF.

**RIO DE JANEIRO**  
**Mai de 2017**

## LISTA DE FIGURAS

|  |    |
|--|----|
| Figura 1: Sistemas de expressão utilizados na fabricação de produtos biofarmacêuticos  | 25 |
| Figura 2. Proteína A, ligante usado durante a etapa de captura na cromatografia de afinidade .....   | 29 |
| Figura 3. Estrutura do núcleo de N-glicanos .....  | 31 |
| Figura 4. Precursor de N-glicano ligado ao dolicol carreador.....  | 32 |
| Figura 5. N-glicano nativo no RE.....  | 32 |
| Figura 6. Representação esquemática da biossíntese de um N-glicano no Cis, Medial e Trans -Golgi.....  | 34 |
| Figura 7. Vias de glicosilação de N-glicanos .....   | 35 |
| Figura 8. Estruturas representativas das oito classes de O-ligação. ....   | 36 |
| Figura 9. Estrutura de N-glicosilação ligada a Asn297em uma IgG1 .....   | 45 |
| Figura 10. Detalhe das principais rotas para a caracterização de glicoproteínas, glicopeptídeos e glicanos.....                                | 47 |
| Figura 11. Sílica covalentemente ligada aos grupos carbamoil não iônicos .....   | 48 |
| Figura 12. Combinação de separação e ligação de hidrogênio .....   | 49 |
| Figura 13. Derivatização com 2-aminobenzamida (2-AB) por meio de aminação reductiva.....   | 49 |
| Figura 14: Perfil HILIC-HPLC de N-glicanos liberados a partir de IgG de soro humano  | 50 |
| Figura 15. Especificidade de corte de exoglicosidases .....  | 60 |
| Figura 16. Representação simbólica dos monossacarídeos, posição e tipo de ligação .....  | 61 |
| Figura 17. Preparo das amostras para análise de N-glicosilação.....  | 62 |
| Figura 18. Resultados da corrida realizada com a coluna de proteína A HiTrap <sup>TM</sup> MabSelect <sup>TM</sup> usando tampão glicina ..... | 65 |
| Figura 19. Quantificação por HPLC-Prot A, referente às amostras da purificação com tampão glicina .....  | 66 |
| Figura 20. Resultados da corrida realizada com a coluna de proteína A HiTrap <sup>TM</sup> MabSelect <sup>TM</sup> usando tampão fosfato ..... | 67 |
| Figura 21. Quantificação por HPLC-Prot A, referente às amostras da purificação com tampão fosfato .....  | 68 |

|  |    |
|--|----|
| Figura 22. Resultados do ensaio de SDS-PAGE, em condições redutoras, referente às frações da purificação com tampão glicina .....                            | 69 |
| Figura 23. Resultados do ensaio de SDS-PAGE, em condições redutoras, referente às frações da purificação com tampão fosfato .....                            | 69 |
| Figura. 24 Perfil de N-glicosilação do mAb obtido pela análise HILIC-HPLC .....  | 71 |
| Figura. 25. Avaliação do padrão de N-glicosilação de uma IgG comercial e amostra cultivada no modo batelada .....  | 73 |
| Figura. 26. Análise com exoglicosidases de N-Glicanos liberados, marcados com 2-AB e analisados por HILIC-HPLC .....   | 77 |
| Figura.27. Perfil de N-glicosilação obtido por HILIC-HPLC, indicando os glicanos propostos após análise de exoglicosidases. ....                             | 79 |
| Figura 28. Abundância relativa das diferentes glicofomas presentes nas amostras do mAb purificadas a partir de sobrenadante de cultivo em perfusão.....      | 80 |
| Figura 29. Nível de galactosilação relativa das glicofomas G0F, G1F, G2F e G2S1 .....  | 82 |
| Figura 30. Abundância relativa das glicofomas fucosiladas e não fucosiladas, detectadas usando HILIC-HPLC após liberação por PNGaseF e marcação com 2-AB ... | 84 |
| Figura 31. Espectro dos N-glicanos do anticorpo obtido por MALDI TOF/TOF realizado em modo íon positivo .....  | 87 |
| Figura 32. Análise MS/MS do pico G0F m/z 1486.....   | 90 |
| Figura 33. Análise MS/MS do pico G1F m/z 1648.....   | 91 |

## LISTA DE TABELAS

|   |    |
|---|----|
| Tabela 1. Anticorpos monoclonais mais vendidos .....  | 19 |
| Tabela 2. Anticorpos monoclonais aprovados para comercialização (dados de 2014).....  | 20 |
| Tabela 3. Resumo dos impactos-chave da glicosilação sobre a farmacocinética e farmacodinâmica de mAbs e proteínas de fusão Fc .....             | 40 |
| Tabela 4. Efeito dos meios de cultura e das variáveis do processo de cultivo de células e meios sobre a glicosilação .....                      | 43 |
| Tabela 5. Estruturas glicosiladas comumente encontradas na porção Fc de um anticorpo terapêutico .....  | 46 |
| Tabela 6. Características dos lotes de sobrenadante utilizados neste trabalho.....  | 54 |
| Tabela 7. Método de separação dos derivados 2AB. ....   | 58 |
| Tabela 8. Preparo da mistura de reação para as exoglicosidases .....  | 59 |
| Tabela 9. Condições utilizadas para os experimentos realizados com o sobrenadante de cultivo em perfusão .....                                  | 64 |
| Tabela 10. Comparação do desempenho e massa do mAb eluido para ambos métodos de purificação .....   | 70 |
| Tabela 11. Possíveis estruturas preliminares de N-glicanos representados por nomenclatura. ....   | 73 |
| Tabela 12. N-glicanos propostos representados por nomenclatura (estruturas propostas conforme os valores de UG segundo a Glycobase 3.2.4) ..... | 78 |
| Tabela 13. Valores em m/z das principais glicofomas detectadas, valores sem massa do íon sódio, valores na Glycobase e glicanos propostos. .... | 88 |
| Tabela 14. Valores em m/z das principais glicofomas liberadas do mAb. ....  | 89 |

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2-AB – 2 aminobenzamida  
ABS – sialidase de *Arthrobacter ureafaciens*  
AC – cromatografia de afinidade  
ADA – anticorpos anti-drogas  
ADC – conjugados droga- anticorpo  
ADCC – Citotoxicidade mediada por células dependente de anticorpos  
ADCP – células dependentes de anticorpos  
AG – aparelho de Golgi  
anti-VEGF – anti- fator de crescimento endotelial vascular  
anti-HER2 – anti- receptor de fator de crescimento epidérmico humano tipo 2  
anti-EGF – anti-fator de crescimento epidermal  
Asn – asparagina  
ATCC – *American Type Culture Collection*  
BKF –  $\alpha$ -fucosidase de rim bovino  
BTG –  $\beta$ -galactosidase de testículos bovinos  
CCR4 – receptor de quimioquina C-C tipo 4  
CD – aglomerado de diferenciação (*cluster of differentiation*)  
CDC – citotoxicidade dependente do complemento  
CHO – células de ovário de hamster chinês  
CLL – leucemia linfocítica crônica  
CQAs – atributos de qualidade críticos  
EcD – dissociação de captura de elétrons  
EMA – agência regulatória europeia de medicamentos  
EU – União Europeia  
EUA – Estados Unidos da América  
EtD – dissociação de transferência de elétrons  
Fab – fragmento de ligação ao antígeno  
Fc – fragmento cristalizável  
FcRn – receptor de Fc neonatal  
FDA – agência regulatória americana (Food and Drug Administration)  
FPP – farnesil pirofosfato  
FUT8 – fucosiltransferase 8  
Gal – galactose  
GDP- Man – guanosina difosfato manose  
GlcNAc – N-acetil glicosamina  
Gln – glutamina  
Glu – ácido glutâmico  
GnT – acetilglicosaminil transferases  
GU – unidade de glicose  
GUH –  $\beta$ -N-acetil-hexosaminidase de *Streptococcus pneumoniae*  
HAMA – anticorpo humano anti-murino  
HC – cadeia pesada do anticorpo  
HCP – proteínas da célula hospedeira  
HILIC – cromatografia líquida de interação hidrofílica  
HPLC – cromatografia líquida de alto desempenho

ICH – conferência internacional para harmonização  
IFN – interferon  
IgG – imunoglobulina  
IL – interleucina  
INN – nomenclatura internacional não-proprietária  
IPP – isopentenil pirofosfato  
JBH –  $\beta$ -N-acetil-hexosaminidase de *Canavalia ensiformis*  
JBM –  $\alpha$ -manosidase de *Canavalia ensiformis*  
LC – cadeia leve do anticorpo  
LC-MS – espectrometria de massas acoplada à cromatografia líquida  
mAb – anticorpo monoclonal (*monoclonal antibody*)  
MALDI- ionização e dessorção a laser assistida por matriz  
MS – espectrometria de massas  
TOF– tempo de voo  
ManR – receptor de manose  
NANA – ácido N-acetilneuramínico  
NHL – linfoma não Hodgkin  
NH<sub>2</sub> – amina  
NGNA – ácido N-glicolilneuramínico  
NS0 – linhagem de células de mieloma  
NK– células exterminadoras naturais  
OKT3 – anticorpo monoclonal murino dirigido contra o antígeno CD3 de células T  
PBS – tampão fosfato salino  
pCO<sub>2</sub> – pressão parcial de CO<sub>2</sub>  
PD-1 – proteína de morte celular programada 1  
Pd – farmacodinâmica  
PMDA – Agência regulatória do Japão  
PPC – parâmetro de processo crítico  
PK – farmacocinética  
QbD – qualidade por desenho/planejamento (quality by design)  
RANKL – ligante do receptor do fator nuclear kapa B  
RE – retículo endoplasmático  
RI – receptor de região Fc de anticorpo do tipo I  
RII – receptor de região Fc de anticorpo do tipo II  
RIII – receptor de região Fc de anticorpo do tipo III  
RIIa – receptor de região Fc de anticorpo do tipo IIa  
RIIc – receptor de região Fc de anticorpo do tipo IIc  
RIIIA – receptor de região Fc de anticorpo do tipo IIIA  
SDS-PAGE – eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio  
SP2 – linhagem de células de mieloma murino  
SPG –  $\beta$ -galactosidase de *Streptococcus pneumoniae*  
TC-LECC – meio de cultivo da empresa Xell AG customizado para o  
LECC/COPPE/UFRJ  
TNF- $\alpha$  - fator de necrose tumoral  $\alpha$   
UI – unidade internacional  
UND – não digerida  
VEGFR2 – receptor do fator de crescimento endotelial vascular

YB2 – linhagem celular de mieloma de rato

## SUMÁRIO

|          |  |    |
|----------|--|----|
| 1        | INTRODUÇÃO .....   | 16 |
| 2        | REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....   | 17 |
| 2.1      | Anticorpos monoclonais (mAbs) terapêuticos.....                                  | 20 |
| 2.2      | Funções efectoras dos mAbs.....  | 23 |
| 2.3      | Anticorpos produzidos por Glico-engenharia.....                                  | 24 |
| 2.4      | Atuais sistemas de produção aprovados para IgG .....                             | 24 |
| 2.5      | Diferenças na glicosilação decorrentes de diferentes sistemas de expressão ..... | 25 |
| 2.6      | Cultivos de células animais para produção de mAbs .....                          | 26 |
| 2.6.1    | Modos de operação .....  | 27 |
| 2.7      | Purificação de mAbs .....  | 28 |
| 2.7.1    | Cromatografia de afinidade.....  | 29 |
| 2.8      | Biosíntese de N-glicanos .....   | 30 |
| 2.8.1    | Formação de N-glicanos .....   | 30 |
| 2.8.1.1  | Síntese de N-glicanos no retículo endoplasmático (RE) .....                      | 32 |
| 2.8.1.2  | Processamento de N-glicanos no aparelho de Golgi (AG) .....                      | 33 |
| 2.8.2    | O-Glicanos .....   | 35 |
| 2.9      | Atributos de qualidade críticos (CQAs) .....                                     | 36 |
| 2.10     | Consequências da glicosilação .....  | 37 |
| 2.10.1   | Eficácia.....  | 37 |
| 2.10.2   | Farmacocinética .....  | 38 |
| 2.10.3   | Imunogenicidade .....  | 39 |
| 2.11     | Anticorpos afucosilados .....  | 41 |
| 2.12     | Glicosilação e estabilidade .....  | 41 |
| 2.13     | Microheterogeneidade e Macroheterogeneidade.....                                 | 42 |
| 2.14     | Condições de cultivo que afetam a glicosilação.....                              | 42 |
| 2.15     | Glicosilação de anticorpos monoclonais IgG1 recombinantes.....                   | 44 |
| 2.16     | Estratégias para a análise de glicosilação.....                                  | 47 |
| 2.16.1   | Sequência detalhada e análise de glicanos .....                                  | 47 |
| 2.16.2   | Cromatografia de interação hidrofílica (HILIC) .....                             | 48 |
| 2.16.2.1 | Derivatização dos glicanos com o fluoróforo 2-aminobenzamida (2-AB) .....        | 49 |
| 2.16.3   | Análise de glicanos por MALDI -TOF/TOF MS.....                                   | 50 |

|         |  |    |
|---------|--|----|
| 3       | OBJETIVOS .....  | 52 |
| 3.1     | Objectivo Geral.....   | 52 |
| 3.2     | Objetivos Específicos .....  | 52 |
| 4       | METODOLOGIA .....  | 53 |
| 4.1     | Cultivo Celular.....   | 53 |
| 4.1.1   | Linhagem celular.....  | 53 |
| 4.1.2   | Cultivo em biorreatores e obtenção de sobrenadante.....                                | 53 |
| 4.2     | Purificação do mAb .....   | 54 |
| 4.2.1   | Equipamento, coluna cromatográfica e tampões .....                                     | 54 |
| 4.2.2   | Método de purificação.....   | 54 |
| 4.2.3   | Avaliação do rendimento das etapas de purificação .....                                | 55 |
| 4.3     | Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) e coloração com nitrato de prata..... | 55 |
| 4.4     | Quantificação do mAb purificado.....   | 55 |
| 4.5     | Determinação da concentração de proteínas totais .....                                 | 56 |
| 4.6     | Avaliação do perfil de N-glicosilação do anticorpo purificado .....                    | 56 |
| 4.6.1   | Clivagem dos glicanos com PNGasa F .....   | 56 |
| 4.6.2   | Recuperação dos glicanos e precipitação das proteínas .....                            | 56 |
| 4.6.3   | Derivatização com 2-aminobenzamida (2AB) e eliminação do excesso do 2AB .....          | 57 |
| 4.6.4   | Análise por HILIC-HPLC .....   | 57 |
| 4.6.4.1 | Preparo das amostras para injeção .....  | 57 |
| 4.6.4.2 | Preparo do Sistema HILIC-HPLC .....  | 58 |
| 4.6.5   | Digestões sucessivas com exoglicosidases .....   | 59 |
| 4.6.5.1 | Preparo da mistura de reação .....   | 59 |
| 4.6.5.2 | Remoção das enzimas após digestão .....  | 60 |
| 4.6.6   | Nomenclatura dos glicanos .....  | 60 |
| 4.7     | Análise de glicanos por MALDI-TOF/TOF MS .....   | 63 |
| 4.7.1   | Purificação de glicanos não derivatizados usando cartuchos Glycoclean H.....           | 63 |
| 4.7.2   | Preparo das amostras para análise MALDI-TOF/TOF MS .....                               | 63 |
| 4.7.3   | Aquisição por MALDI-TOF/TOF MS.....  | 63 |
| 4.7.4   | Análise MS/MS.....   | 64 |
| 5       | RESULTADOS E DISCUSSÃO .....   | 64 |
| 5.1     | Purificação do mAb .....   | 64 |
| 5.2     | Confirmação da massa molecular e da identidade.....                                    | 69 |
| 5.3     | Avaliação do perfil de N-glicosilação do mAb .....                                     | 70 |

|        |   |    |
|--------|---|----|
| 5.3.1  | Clivagem dos glicanos com PNGasa F.....                               | 70 |
| 5.3.2  | Análise do perfil global de N-glicosilação do mAb por HILIC-HPLC..... | 71 |
| 5.4.   | Análise de glicanos por MALDI -TOF/TOF MS.....                        | 84 |
| 5.4.1  | Análise dos glicopeptídeos.....                                       | 85 |
| 5.4.2. | Análise de glicanos livres.....                                       | 85 |
| 5.4.3. | Proposição de estruturas.....   | 85 |
| 5.4.4. | Análise MS/MS .....   | 90 |
| 6      | CONCLUSÕES E SUGESTÕES.....   | 92 |
| 6.1.   | Conclusões.....   | 92 |
| 6.2.   | Sugestões.....  | 93 |
| 7      | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....                                       | 94 |

## 1. INTRODUÇÃO

Os anticorpos monoclonais terapêuticos (mAbs) representam a classe mais importante de proteínas terapêuticas recombinantes no mercado. Mais de 40 anticorpos e anticorpos conjugados foram aprovados pela *Food and Drug Administration* (FDA) ou pela *European Medicines Agency* (EMA). A maioria dos mAbs é utilizada no tratamento do câncer e de doenças autoimunes. As vendas anuais de anticorpos terapêuticos excederam o US\$ 69.8 bilhões no ano de 2013, representando mais da metade do total das vendas de todos os produtos biofarmacêuticos (WALSH, 2014).

Atualmente, todos os anticorpos terapêuticos aprovados são imunoglobulinas do tipo G (IgG) ou derivados, tais como: fragmentos Fab, proteínas de fusão Fc, conjugados droga-anticorpo (ADC), radioimunoconjugados ou anticorpos biespecíficos.

Os métodos de purificação de proteínas são extremamente importantes no processo de produção dos mAbs, principalmente devido aos elevadíssimos graus de pureza requeridos pelas agências regulatórias para produtos injetáveis de uso humano. O processo padrão para a purificação de um mAb, a partir de cultivo de células, envolve tipicamente a etapa de captura por cromatografia de afinidade com proteína A (MEHTA, 2016).

A maioria dos mAbs (no mercado ou em desenvolvimento) são produzidas em células de ovário de hamster chinês (CHO). No que se refere à estrutura de um mAb, são glicoproteínas tetraméricas com massas moleculares de aproximadamente 150 kDa. Elas são compostas por duas cadeias pesadas (HC, cerca de 50kDa) e duas cadeias leves (LC, cerca de 25kDa). Tipicamente, possuem um sítio de N-glicosilação em cada cadeia pesada localizada na região Fc CH2 (BECK ; SANGLIER-CIANFE, 2012).

Vários fatores podem afetar a glicosilação, tais como as características da linhagem celular, as condições de cultivo e os componentes dos meios de cultivo das células, podendo afetar a atividade biológica, a eficácia, a estabilidade, a imunogenicidade, a farmacocinética, a citotoxicidade dependente do complemento (CDC) e a citotoxicidade celular dependente de anticorpos (ADCC). Por exemplo, a presença de uma N-acetilglucosamina bissectora (GlcNAc) na IgG, decorrente da depleção de resíduos de fucose (por exemplo, por *knockdown* genético de  $\alpha$ -1,6-fucosiltransferase), em oligossacarídeos na região de ligação conservada aos receptores Fc $\gamma$ , resulta em um incremento de até 100 vezes na atividade ADCC (SHIELDS et al., 2002). Sendo assim, a glicoengenharia está sendo desenvolvida como um método para controlar a composição dos glicanos e aprimorar as propriedades farmacológicas dos mAbs. Mogamulizumab (PotELiGEO®) foi o primeiro anticorpo produzido por glicoengenharia que foi aprovado para comercialização, e é um ponto de referência no campo dos anticorpos terapêuticos (BECK ; REICHERT, 2012).

De uma forma geral, sabe-se que a atividade biológica dos mAbs é crucialmente associada à glicosilação ligada na região Fc, variando conforme as glicofornas. Os glicanos nos mAbs produzidos a partir de células CHO são principalmente de tipo biantenário complexo, diferindo nos níveis de ácido siálico terminal, galactose terminal (0, 1 ou 2). Além dos glicanos complexos, são observadas em menor quantidade outros tipos de glicanos, incluindo padrões do tipo alta manose e formas híbridas. Os diferentes tipos de glicanos encontrados ao se produzir um mAb consistem no que se denomina microheterogeneidade.

Em geral, a micro-heterogeneidade dos oligossacarídeos das glicoproteínas, produzidas a partir de células CHO, é dependente das condições de cultivo (BYRNE, 2014). Isto implica que a qualidade dos anticorpos monoclonais terapêuticos deve ser cuidadosamente monitorada e avaliada ao longo do desenvolvimento do produto e do processo produtivo (PACIS et al., 2011). Adicionalmente, os glicanos dos mAbs estão frequentemente presentes em níveis baixos, desafiando a sensibilidade das tecnologias analíticas. Não existe atualmente um método universal para a identificação rápida e confiável da estrutura dos glicanos. Portanto, se deve buscar o melhor método ou combinação de métodos para sua análise (MARIÑO et al., 2010).

Neste contexto, a proposta deste trabalho foi purificar um mAb anti-IL8 produzido por células CHO e avaliar o seu perfil de glicosilação. Para isto, foram introduzidas algumas das principais tecnologias usadas para a análise estrutural de N-glicanos, como HILIC-HPLC e MALDI-TOF/TOF, permitindo, assim, considerar estes métodos para a detecção e quantificação de micro-heterogeneidades de N-glicosilação em amostras de anticorpos monoclonais.

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1. Anticorpos monoclonais (mAbs) terapêuticos**

A inovadora descoberta da tecnologia de hibridomas para a obtenção de mAbs por Kohler e Milstein em 1975 proporcionou a possibilidade de criar anticorpos de especificidade definida como uma alternativa terapêutica. Contudo, a primeira geração de mAbs não foi inicialmente aprovada para uso humano devido à imunogenicidade associada com os anticorpos terapêuticos iniciais que eram de origem murina. Os anticorpos murinos geralmente induzem respostas de anticorpos anti-drogas (ADA) em seres humanos, resultando potencialmente em graves efeitos adversos. O anticorpo Ortoclone OKT3 (anti-CD3) foi o primeiro mAb aprovado em 1986 para uso na rejeição de transplantes em humanos. Sendo de origem murina, o OKT3 induz a liberação de citocinas e causa a depuração acelerada do fármaco devido às respostas de anticorpo anti-murino humano (HAMA). Contudo, devido a seu uso em aplicação única para evitar a rejeição a transplantes, isto não impediu a sua aprovação. A promessa real de mAb como uma alternativa terapêutica de sucesso foi realizada um pouco mais de uma década mais

tarde, quando um mAb quimérico murino-humano contra CD20, rituximab, foi aprovado para o tratamento de linfoma não Hodgkin (NHL) em 1997. O desenvolvimento de moléculas quiméricas e, posteriormente, humanizadas foi possível devido aos avanços na biologia molecular, genética e engenharia de proteínas. A revolução na biologia molecular tornou possível a humanização de anticorpos murinos, reduzindo grandemente a imunogenicidade em seres humanos, tornando-se possível a administração durante um longo período de tempo. Tal avanço nas tecnologias de anticorpos resultou no desenvolvimento de inúmeros mAbs terapêuticos ao longo das últimas décadas (JEFFERIS, 2005, 2009; LIU, 2015).

Hoje, mais de 40 mAbs e drogas derivada de mAbs têm sido aprovadas para uso humano com muitos deles atingindo status de *blockbuster*. Dentre eles, Humira alcançou vendas de até 11 bilhões de dólares (Tabela 1) (WALSH, 2014). Estima-se que, no futuro próximo, cerca de 30% dos novos biofármacos serão anticorpos ou derivados de anticorpos. Os derivados de anticorpos incluem proteínas de fusão Fc, conjugados droga- anticorpo (ADC), imunocitocinas (fusão anticorpo-citocina) e fusões anticorpo-enzima (LIU, 2015). Os mAbs e os medicamentos derivados de anticorpos cobrem muitas áreas terapêuticas, com a maioria dos produtos hoje aprovados sendo aplicados na oncologia e na área autoimune/alergia/inflamação. A Tabela 2 mostra mais detalhes de terapias baseadas em anticorpos e proteínas de fusão Fc aprovados para comercialização (LIU, 2015).

**Tabela 1 Anticorpos monoclonais mais vendidos.** Adaptado de WALSH (2014).

| Classificação | Produto                                  | Vendas (Bilhões) | Ano da primeira aprovação | Empresa                               | Expiração da patente (UE) | Expiração da patente (EUA) |
|---------------|--|------------------|---------------------------|---------------------------------------|---------------------------|----------------------------|
| 1             | Humira (adalimumabe; anti-TNF)           | 11.00            | 2002                      | AbbVie & Eisai                        | 2018                      | 2016                       |
| 2             | Enbrel (etanercepte; anti-TNF)           | 8.76             | 1998                      | Amgen, Pfizer, Takeda Pharmaceuticals | 2015                      | 2028                       |
| 3             | Remicade (infliximabe; anti-TNF)         | 8.37             | 1998                      | J&J, Merck & Mitsubishi Tanabe Pharma | 2015                      | 2018                       |
| 4             | Rituxan/MabThera (rituximabe; anti-CD20) | 7.91             | 1997                      | Biogen-IDEC, Roche                    | 2013                      | 2016                       |
| 5             | Avastin (bevacizumabe; anti-VEGF)        | 6.97             | 2004                      | Roche/Genentech                       | 2019                      | 2017                       |
| 6             | Herceptin (trastuzumabe; anti-HER2)      | 6.91             | 1998                      | Roche/Genentech                       | 2014                      | 2019                       |
| 7             | Lucentis (ranibizumabe; anti-VEGF)       | 4.27             | 2006                      | Roche/Genentech, Novartis             | 2016                      | 2016                       |
| 8             | Erbix (cetuximabe; anti-EGF)             | 1.92             | 2004                      | Bristol-Myers Squibb, Merck Serono    | 2014                      | 2016                       |
| 9             | Eylea (aflibercept; anti-VEGF)           | 1.88             | 2011                      | Regeneron, Bayer                      | 2020                      | 2021                       |

**Tabela 2. Anticorpos monoclonais aprovados para comercialização. Fonte: LIU (2015).**

| Mecanismo de ação  | Nome comercial | INN                                 | Alvo          | IgG Subclases   | Primeiras indicações aprovadas                  | Área terapêutica |
|--|----------------|-------------------------------------|---------------|-----------------|---|------------------|
| Inibidores de ponto de verificação (Imunoterapia)            | Yervoy         | Ipilimumabe                         | CTLA-4        | IgG1 humano     | Melanoma avançado                               | Oncologia        |
|  | Keytruda       | Keytruda                            | PD-1          | IgG4 humanizado | (Melanoma refractário Melanoma avançado (Japão) | Oncologia        |
| Terapia direcionada envolvendo ADCC, CDC e outros Mecanismos | Opdivo         | Nivolumabe                          | PD-1          | IgG4 humano     |   | Oncologia        |
|  | Rituran        | Rituximabe                          | CD20          | IgG1 quimérico  | Linfoma não-Hodgkin                             | Oncologia        |
|  | Herceptin      | Trastuzumabe                        | Her2          | IgG1 humanizado | Câncer de mama Her2-positivo                    | Oncologia        |
|  | Avastin        | Bevacizumabe                        | VEGF          | IgG1 humanizado | Câncer escamoso, renal                          | Oncologia        |
|  | Erbix          | Cetuximabe                          | EGFR          | IgG1 quimérico  | Cabeça e pescoço, kras-ye                       | Oncologia        |
|  | Campath        | Alemtuzumabe                        | CD52          | IgG1 humano     | Câncer colorretal                               | Oncologia        |
|  | Vectibix       | Panitumumabe                        | EGFR          | IgG2 humano     | Leucemia linfocítica crônica de células B       | Oncologia        |
|  | Arzezra        | Ofatumumabe                         | CD20          | IgG1 humano     | Carcinoma colorretal metastático                | Oncologia        |
| Conjugado anticorpo-droga                                    | Perieta        | Pertuzumabe                         | HER2          | IgG1 humanizado | Linfócitos crônicos de célula B                 | Oncologia        |
|  | Cyramza        | Ramucirumabe                        | VEGFR2        | IgG1 humana     | Leukemia  | Oncologia        |
| Radioterapia orientada                                       | Kadcyla        | Trastuzumabe emtansine              | HER2          | IgG1 humanizado | Câncer de mama Her2-positivo                    | Oncologia        |
|  | Adcentris      | Brentuxim ad vedorin                | CD30          | IgG1 quimérico  | Refractário HL, refratário SALCL de recaída     | Oncologia        |
|  | Mylotarg       | Gemtuzumabe ozogamicin              | CD33          | IgG1 humanizado | Leucemia mielóide aguda                         | Oncologia        |
| Citocina inflamatória Inibidores                             | Bexxar         | Tositumomabe-iodo-131               | CD20          | IgG2 murino     | (Retirado)                                      | Oncologia        |
|  | Zevalin        | Ibritumomabe-tiuxetam Y90 ou In 111 | CD20          | IgG1 murino     | Linfoma não-Hodgkin                             | Oncologia        |
| Citocina inflamatória Inibidores                             | Remicade       | Infliximabe                         | TNF- $\alpha$ | IgG1 quimérico  | Linfoma não-Hodgkin                             | Oncologia        |
|  | Simponi        | Golimumabe                          | TNF- $\alpha$ | IgG1 humano     | Artrite reumatóide, doenças de crohn            | Imunologia       |

Tabela 2. Continuação

| Mecanismo de ação       | Nome comercial    | INN             | Alvo                 | IgG Subclases   | Primeiras indicações aprovadas                                 | Área terapêutica |
|-------------------------|-------------------|-----------------|----------------------|-----------------|--|------------------|
|                         | Humira            | Adalimumabe     | TNF- $\alpha$        | IgG1 humano     | Artrite reumatóide,<br>doenças de crohn                        | Imunologia       |
|                         | Cimzia            | Certolizumabe   | TNF- $\alpha$        | IgG1 humanizado | Doenças de crohn,<br>artrite reumatóide.<br>Psoríase em placas | Imunologia       |
|                         | Stelara           | Ustekinumabe    | IL-12/IL23           | IgG1 humano     | Síndromes periódicas<br>associadas à criopirina                | Imunologia       |
|                         | Ilaris            | Canakinumabe    | IL-1 $\beta$         | IgG1 humano     | Lúpus eritematoso sistêmico                                    | Imunologia       |
|                         | Benlysta          | Belimumabe      | Blys                 | IgG1 humano     |  |                  |
| Bloqueio do receptor    | Actemra/roactemra | Teciliz umabe   | IL-6R                | IgG1 humanizado | Artrite reumatóide,  | Imunologia       |
|                         | Simulect          | Basiliximabe    | IL-2Ra               | IgG1 quimérico  | Rejeições de transplantes                                      | Imunologia       |
| Inibidor de IgE         | Otorclone OKT3    | Muromonabe OKT3 | CDS                  | IgG2 murino     | Rejeições de transplantes                                      | Asma Imunologia  |
| Inibidor da integrina   | Xolair            | Omalizumabe     | IgE                  | IgG1 humanizado | Colite ulcerativa e  | Imunologia       |
|                         | Entyvso           | Vedolizumabe    | $\alpha$ 4 $\beta$ 7 | IgG1 humanizado | Doença de Crohn  | Imunologia       |
|                         | Tyrabi            | Natalizumabe    | $\alpha$ 4           | IgG4 humanizado | Esclerose múltipla   | Imunologia       |
| Anti- seção             | Synagia           | Palivizumabe    | RSV F                | IgG1 humanizado | Infecção por RVS   | Infecção         |
|                         | Abthrax           | Raxibezumabe    | Anthrax soxin        | IgG1 humano     | Infecção por antraz  | Infecção         |
| Regeneração óssea       | Prolia/Xgeva      | Denosumabe      | RANKL                | IgG2 humano     | Osteoporose Isquemia/ angina                                   | Doença óssea     |
|                         |                   |                 | GPIIb/IIIa           |                 | Paroxístico noturno  |                  |
| Antiplaca               | Reopre            | Abeiximabe      | C3                   | IgG1 quimérico  | Hemoglobinúria   | Cardiovascular   |
| Inibidor do complemento | Soliris           | Eculiumabe      |                      | IgG2 humanizado |  | Hematologia      |
| Anti-VEGF               |                   |                 | VEGF                 |                 | Degeneração macular<br>relacionada à idade                     | Oftalmologia     |
|                         | Lucentiz          | Ranibizumabe    |                      | IgG1 humanizado |  |                  |

## 2.2. Anticorpos produzidos por glicoengenharia

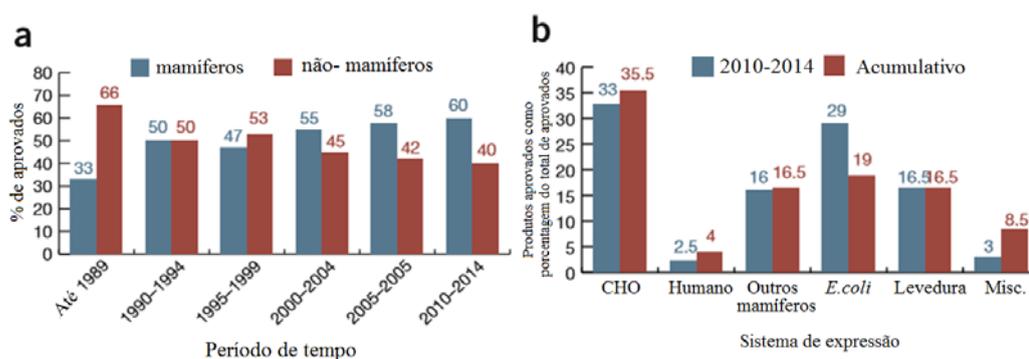
Tal como as IgG naturais, todos os mAbs terapêuticos recombinantes aprovados são glicosilados. A variação na composição ou na estrutura dos glicanos pode causar mudanças conformacionais do domínio Fc, podendo alterar a afinidade de ligação do receptor de Fc, resultando em alterações das funções efetoras imunitárias (LIU, 2015; REUSCH; TEJADA, 2015).

Na última década, as empresas biofarmacêuticas têm colocado enormes esforços no desenvolvimento de mAbs com funções efetoras aprimoradas (*biobetters*). O melhor exemplo talvez seja o Gazyva® (obinutuzumabe) desenvolvido pela Roche/Glycart, que é um mAb de terceira geração tipo II anti-CD20 humanizado feito por glicoengenharia com actividade ADCC melhorada. O Gazyva® demonstrou eficácia superior ao Rituxan® (rituximabe) em ensaios clínicos para o tratamento da leucemia linfocítica crônica (CLL), levando à aprovação pela FDA dos EUA em novembro de 2013. Versões aprimoradas de anticorpos o trastuzumabe, cetuximabe, rituximabe e infliximabe derivadas destas tecnologias também estão em desenvolvimento (BECK; REICHERT, 2012; LIU, 2015).

## 2.3. Atuais sistemas de produção para IgG aprovados

Outra tendência evidente ao longo dos anos é o aumento constante dos sistemas de expressão baseados em células de mamíferos em relação aos sistemas não-mamíferos (Figura 1a). Um dos principais requisitos é a capacidade de realizar as modificações pós-tradução da proteína de forma similar a células humanas. Os sistemas baseados em células de ovário de hamster chinês (CHO) continuam sendo o sistema de expressão mais utilizado para a produção de anticorpos terapêuticos e proteínas de fusão Fc que já atingiram o mercado. A Figura 1b mostra que um pequeno número de produtos, principalmente enzimas de substituição com requisitos específicos de modificações pós-tradução, são produzidos em várias linhagens celulares humanas. Outras células de mamíferos utilizadas industrialmente incluem linhagens de células de mieloma murino NS0, Sp2/0 e BHK-21 (células de rim de hamster neonato). Embora o uso de *Escherichia coli* como um sistema de expressão continua diminuindo, continua sendo sistema de expressão não-mamífero mais comum (WALSH, 2014).

A maioria destas linhagens celulares tem sido adaptada com sucesso para crescer em cultivo em suspensão, sendo que a sua capacidade para crescer em suspensão as torna candidatas preferidas para cultivo em larga escala em biorreatores e produção em grande volume (até 20.000 L). Tais escalas de produção são características essenciais para o fornecimento de anticorpos utilizados em doenças crônicas para o mercado mundial. Os anticorpos mais vendidos são produzidos atualmente em escala multi-tonelada por ano.



**Figura 1. Sistemas de expressão utilizados na fabricação de produtos biofarmacêuticos.** (a) Aplicação relativa de sistemas de expressão de mamíferos versus não-mamíferos na produção de biofármacos aprovados nos períodos indicados. (b) Aprovações de produtos, cumulativas (1982-2014) e para o período (2010-julho de 2014), no contexto de sistemas de expressão empregados. Adaptado de WALSH (2014).

#### 2.4. Diferenças na glicosilação de diferentes sistemas de expressão

Diferentes células hospedeiras podem adicionar diferentes tipos de glicanos a anticorpos recombinantes. Os glicanos presentes na Fc da IgG de soro humano são principalmente de tipo biantenário complexo, de núcleo fucosilado, com glicofomas predominantemente do tipo G0F, G1F e G2F e quantidades muito pequenas de glicofomas sialiladas. Adicionalmente, existe também uma pequena porcentagem de IgG humana com glicanos afucosilados, com ou sem um resíduo de GlcNAc bissectante. A IgG humana recombinante produzida em células CHO tem padrões de glicosilação ou glicofomas semelhantes à IgG de soro humano (BECK et al., 2008; LIU, 2015).

As células de mieloma de murino (NS0 e SP2/0) podem adicionar açúcares que não são naturalmente encontrados em IgG humana e são conhecidos como sendo imunogênicos contendo, por exemplo, o epítipo Gal - Gal (Gal1-3Gal  $\beta$ 1-4GlcNAc-R) e o NGNA. O NGNA é o ácido sialico predominante nas glicoproteínas produzidas em células murinas e somente vestígios foram encontrados em CHO que produziram glicoproteínas. As glicofomas não humanas produzidas por hospedeiros de expressão murina podem apresentar implicações importantes em termos de imunogenicidade do mAb terapêutico. A linhagem celular de mieloma de rato YB2/0 produz mAb recombinante com baixo teor de Fuc, gerando ADCC até 50 vezes superior àquela observada em produtos obtidos em células CHO. Por outro lado, glicoproteínas sintetizadas em levedura são afucosiladas e possuem oligossacarídeos com elevado teor de manose, sendo que o número de resíduos de manose varia entre linhagens. Uma linhagem modificada de *Pichia pastoris* foi desenvolvida com sucesso para produzir glicofomas humanas em IgG-Fc humana. No caso de uso de plantas como sistema de expressão, foram obtidos resultados significativos na humanização da glicosilação e na remoção de vias enzimáticas que geram resíduos imunogênicos em glicoproteínas de plantas (BECK et al., 2008; LIU, 2015).

Os sistemas de expressão bacteriana comuns, tais como *E. coli*, tradicionalmente não têm capacidade para glicosilar proteínas em conformações N ou O. Células eucarióticas inferiores, tais

como leveduras e fungos, estão tipicamente associadas à produção de proteínas recombinantes hipermanosiladas. Glicoproteínas produzidas em plantas possuem principalmente estruturas de N-glicano sem resíduos de ácido siálico. Células de inseto, por sua vez, são capazes de produzir apenas oligossacarídeos do tipo oligomanoses, tais como Man<sub>9</sub>GlcNAc<sub>2</sub> (BYRNE, 2014; GHADERI et al., 2012)

O padrão de glicosilação das proteínas depende da expressão de várias glicosiltransferases que se encontram no complexo de Golgi das células. Diferenças na atividade relativa dessas enzimas entre espécies podem acarretar variação significativa na estrutura glicosilada resultante.

A atividade das enzimas GnT (acetilglicosaminil transferases), varia entre as linhagens de células de mamífero. Em particular GnT (III), a enzima responsável pela transferência de resíduo  $\beta$ 1,4 GlcNAc bisectado, está ausente em células CHO. Além disso, a sialilação de glicoproteínas varia fortemente entre as linhagens de células hospedeiras. Existem duas formas possíveis de sialilação (NANA e NGNA) encontradas em proteínas de células de mamíferos. Os níveis de NGNA são mais prevalentes em proteínas recombinantes derivadas de hibridoma de camundongo ou humano-camundongo (BYRNE, 2014).

A maior parte das linhagens celulares CHO utilizadas para a produção de proteínas recombinantes não apresenta atividade de  $\alpha$ 1-3-galactosiltransferase, resultando por tanto, em baixos níveis de NGNA em comparação com NANA. Contudo, tem-se notado que as células CHO tampouco possuem uma enzima  $\alpha$ 2,6-sialiltransferase funcional de forma que a síntese de ácido siálico terminal ocorre exclusivamente pela via da  $\alpha$ 2,3-sialiltransferase, resultando apenas em NANA  $\alpha$ 2,3-ligado. Ambas das enzimas sialiltransferases estão presentes em linhagens celulares de rato e humanas (BYRNE, 2014; HOSSLER; KHATTAK; LI, 2009).

## **2.5. Cultivos de células animais para produção de mAbs**

Nas duas últimas décadas, um aumento de mais de 100 vezes nas concentrações de mAbs produzidos em células CHO foi observado, largamente devido ao avanço nas técnicas de biologia molecular e cultivo de células. Nos processos de cultivo celular, as condições do processo afetam o comportamento das células, incluindo crescimento celular, metabolismo, produtividade de proteína recombinante e qualidade de proteína recombinante. Variáveis que afetam o crescimento celular e os rendimentos de proteína recombinante incluem temperatura, pH, gases dissolvidos (oxigênio (O<sub>2</sub>) e dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>)), osmolaridade, composição do meio de cultivo, estratégia de alimentação empregada, modo de operação, etc (BYRNE, 2014).

### **2.5.1. Modos de operação**

Três modos de operação são os principais usados no cultivo de células animais, dependendo dos métodos de alimentação do meio de cultivo: batelada, batelada alimentada e

perfusão. O cultivo em batelada é considerado um dos modos mais simples de cultivo e suas operações oferecem alta flexibilidade, menor risco de contaminação e desenvolvimento e validação de processos mais rápidos. Contudo, as condições variam ao longo de todo o processo.

Os processos em batelada alimentada são muito populares para a produção de proteínas recombinantes em culturas de células de mamíferos e têm sido operados até 20.000 L de volume de trabalho (CHON ; ZARBIS-PAPASTOITSIS, 2011). Uma das principais vantagens associadas com o cultivo em batelada alimentada é a concentração relativamente elevada de produto final presente no meio ao final do cultivo, em geral superior à concentração obtida em cultivos em perfusão. No entanto, como com qualquer modo de cultivo, existem desvantagens associadas a este método. As estratégias de alimentação envolvendo a adição de nutrientes (tais como glicose e glutamina) em formulações altamente concentradas incorporam o risco de osmolalidade excessiva no meio de cultivo, que pode inibir a produtividade. A adição de altas concentrações de glicose pode induzir uma mudança para o metabolismo fermentativo das células, resultando em rendimentos aumentados de lactato, limitando o crescimento celular e a produtividade devido ao *stress* prematuro nas células. Contudo, uma das principais causas de preocupação é o longo tempo de residência do mAb no ambiente de cultivo, aumentando o risco de a proteína ser exposta a proteases e glicosidases, causando degradação da mesma (BYRNE, 2014).

Os problemas associados ao modo de cultivo em batelada alimentada podem ser aliviados com o uso de uma estratégia de alimentação contínua. As principais vantagens dos modos de cultivo contínuo/perfusão são que a qualidade e a pureza do produto podem ser aumentadas, devido ao baixo tempo de residência do produto no biorreator, devido à contínua retirada da proteína e de meio do ambiente de cultivo, O baixo tempo de residência em um biorreator de perfusão permite a remoção rápida do produto, preservando assim a qualidade da molécula. Os processos contínuos podem ser operados com controle robusto, melhorando a qualidade do produto e minimizando a heterogeneidade (CASTILHO; ANSPACH; DECKWER, 2002; CROUGHAN; KONSTANTINOV; COONEY, 2015).

Geralmente, o mAb coletado de um biorreator em perfusão apresenta uma concentração mais baixa do que um biorreator em batelada alimentada. Contudo, o mAb produzido é coletado ininterruptamente em altas vazões, resultando em produtividades volumétricas (massa de produto por tempo e por volume de meio gasto) bastante superiores. Além disso, um biorreator em perfusão é adequado para a produção de produtos instáveis e, devido às produtividades volumétricas muito superiores, pode ser de escala muito menor do que os de processos em batelada alimentada. Embora, atualmente, o modo de perfusão ainda seja considerado por alguns complexo e difícil de operar, a popularização dos biorreatores com bolsas descartáveis e os novos sistemas de retenção de células tem resultado em um aumento significativo da popularidade dos processos em perfusão (BUNNAK et al., 2016).

## 2.6. Purificação de mAbs

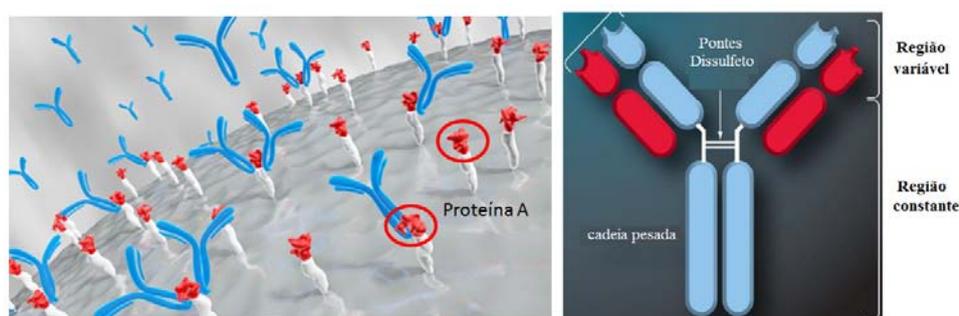
A cromatografia de afinidade com proteína A continua sendo o método de escolha para a purificação de anticorpos monoclonais (mAb). Tendo em conta os aumentos recentes das concentrações de produto e as doses elevadas para a terapia com mAbs, o processo de purificação tem se tornado comumente o gargalo nas operações de fabricação. Apesar das preocupações com o desprendimento do ligante, durabilidade, baixa capacidade e alto custo (tipicamente acima de US \$ 10.000 / L), as empresas continuam utilizando a Proteína A para purificação de mAbs (SHUKLA; THÖMMES, 2010).

Nos últimos anos, as resinas de proteína A foram aprimoradas, tornando-se mais rígidas, altamente porosas, permitindo vazões maiores a baixas quedas de pressão e apresentando altas capacidades adsorptivas de mAbs (MEHTA, 2016).

### 2.6.1. Cromatografia de afinidade

A cromatografia de afinidade consiste na separação de moléculas com base em uma interação reversível entre a proteína alvo e um ligante específico imobilizado em uma matriz cromatográfica, proporcionando alta seletividade, capacidade e resolução. Esta interação pode ser: (1) bioespecífica, tal como a ligação de um anticorpo à proteína A; ou (2) pseudoespecífica, tal como a ligação de uma proteína com resíduos de histidina expostos a íons metálicos imobilizados. O sucesso deste tipo de cromatografia está relacionado aos ligantes imobilizados covalentemente nas matrizes cromatográficas.

A proteína A é uma proteína de superfície celular de *Staphylococcus aureus*, que possui elevada afinidade pela região constante (Fc) de anticorpos. Ela tem uma massa molecular de 42 kDa e cinco domínios para ligação, sendo cada domínio capaz de ligar pelo menos 2 moléculas de IgG.



**Figura 2.** Proteína A, ligante usado durante a etapa de captura na cromatografia de afinidade.

Na cromatografia de afinidade, inicialmente a amostra é aplicada em condições de pH e força iônica que favorecem a ligação específica entre proteína e ligante imobilizado. Os compostos presentes na amostra, que majoritariamente possuem pouca ou nenhuma interação com o ligante de afinidade, passam diretamente pela matriz cromatográfica, gerando um pico referente à fração

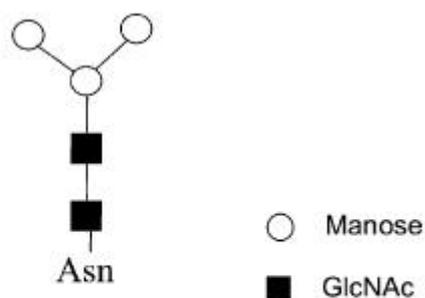
não adsorvida (*flow through*). O próximo passo utiliza um tampão de eluição para dessorver a proteína alvo do ligante. A eluição pode ser específica, utilizando um ligante competitivo, ou pode ser induzida por alterações de pH, força iônica e de polaridade. Durante esta etapa, a molécula de interesse é recolhida para análise posterior, para aplicação em etapas subsequentes de purificação ou para utilização final. Dentre as principais biomoléculas purificadas por processos cromatográficos de afinidade, estão os anticorpos. O fator de purificação pode ser da ordem de vários milhares e as recuperações de material ativo são geralmente muito elevadas.

## 2.7. Biossíntese de N-glicanos

A diversidade estrutural dos glicanos requer um elaborado processo de glicosilação associado a um alto custo energético para a célula, uma vez que os mesmos são produzidos através de diversos passos sequenciais e competitivos. Existem três maneiras conhecidas pelas quais um glicano pode ser covalentemente ligado a uma cadeia polipeptídica: 1- através do grupo NH<sub>2</sub> de um resíduo do aminoácido asparagina; 2- através do grupo OH, normalmente de serina ou treonina; 3- ou por meio de uma etanolamina fosfodiéster. A forma mais comum de glicosilação recombinante de proteínas é a primeira, muito conhecida como N-glicosilação, e por isso os N-glicanos são as formas de glicosilação mais amplamente estudadas (HOSSLER; KHATTAK; LI, 2009). A segunda forma de glicosilação resulta nos chamados O-glicanos.

### 2.7.1. Formação de N-glicanos

Todos as N-glicanos produzidas por células de mamíferos consistem basicamente de um núcleo pentassacarídico (Man<sub>3</sub>GlcNAc<sub>2</sub>) ligado a um resíduo de asparagina (Asn) de uma sequência consenso, por meio de uma ligação N-glicosídica. Para poder ser reconhecido, o resíduo de Asn deve fazer parte de uma sequência tripeptídica Asn-X-Ser/Thr, sendo que X pode ser qualquer aminoácido, exceto uma prolina. A sequência consenso tripeptídica frequentemente referida como um *sequon*. A posição do *sequon* na cadeia polipeptídica exerce influência na glicosilação da proteína. *Sequons* que são posicionados próximos das posições amino-terminal ou carboxi-terminal possuem a tendência de serem glicosilados menos eficientemente.

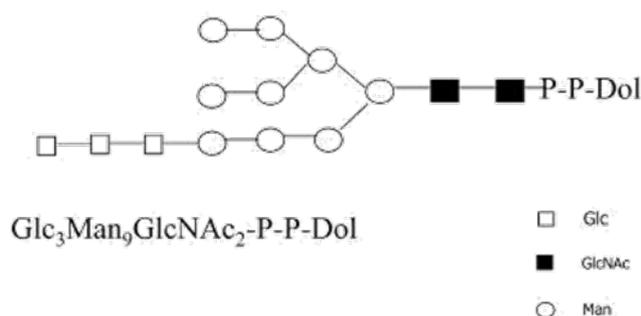


*Sequon* = Asn-X-Ser/Thr

**Figura 3.** Estrutura do núcleo de N-glicanos. Fonte: BYRNE (2014).

A biossíntese de N-glicanos e a ocupação do *sequon* ocorrem co-traducionalmente no retículo endoplasmático (RE). O processo inicia-se com a transferência enzimática de uma estrutura oligossacarídica de 14 monômeros pré-sintetizada ( $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ ) de um doador pirofosfato ligado a um dolicol para um resíduo de Asn na cadeia polipeptídica consenso da proteína.

O dolicol é formado como um produto final da via biossintética do prenol. É definido como um lipídeo poliisoprenoide com 80-100 unidades de carbono ou 16-20 unidades de isopreno, havendo uma subunidade saturada de  $\alpha$ -isopreno. A síntese do dolicol é catalisada por uma *cis*-prenil transferase. Esta enzima está envolvida no alongamento de um pirofosfato solúvel insaturado, farnesil pirofosfato (FPP), para o correto comprimento usando um isopentenil pirofosfato (IPP). O resultado é a formação de um poliprenil pirofosfato (Poli-P-P) hidrofóbico completamente insaturado, o qual é fixado na membrana do RE. A desfosforilação e a redução de uma unidade de  $\alpha$ -isopreno para a Poli-P-P é finalizada com a formação de um glicosil lipídico carreador, dolicol fosfato (Dol-P). No lado citosólico do RE, a estrutura oligossacarídica 14 monômeros é sintetizada por meio da adição de nucleotídeos associados a carboidratos (ex. uridina difosfato-N-acetilglicosamina, UDP-GlcNAc) e guanosina difosfato manose (GDP-Man)) ou intermediários lipídicos (ex. dolicol fosfato-manose, Dol-P-Man) e dolicol fosfato glicose, Dol-P-Glc)) para o Dol-p na formação de N-acetilglicosamina-fosfato (GlcNAc-PP-Dol). Esta reação é catalisada por uma glicosil transferase associada à membrana, N-acetilglicosamina-1-fosfotransferase (GlcNAc-1-fosfotransferase). Outra GlcNAc e cinco unidades de Manose são transferidas para a GlcNAc-PP-Dol para formar o intermediário  $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$  (Figura 4). Este intermediário é, então, transferido para o lúmen do RE, onde será estendido por meio da adição sequencial de mais quatro resíduos de manose e três de glicose (BYRNE, 2014).

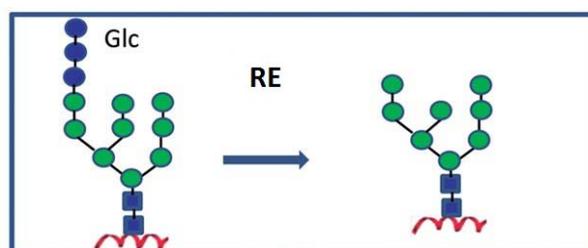


**Figura 4.** Precursor de N-glicano ligado ao dolicol carreador. Fonte: BYRNE (2014).

A enzima envolvida no reconhecimento do resíduo de Asn de um *sequon* e a subsequente transferência do oligossacarídeo é uma oligosacaril transferase (OST). Esta enzima existe como um complexo em diversas subunidades que estão ligadas à membrana do RE, a aproximadamente 65 resíduos de aminoácidos do sítio P do ribossomo.

#### 2.7.1.1. Preparação do N-glicano no retículo endoplasmático (RE)

As glicosidases e as manosidases localizadas na membrana do RE se envolvem em um processo conhecido como preparação de uma estrutura de N-glicano nativo. Este processo é iniciado pela enzima  $\alpha$ -1,2 glicosidase I (Gluc I), a qual é responsável pela remoção da unidade de glicose terminal da estrutura oligossacarídica de 14 açúcares. As próximas duas unidades de glicose são removidas sequencialmente através de uma reação catalisada pela enzima  $\alpha$ -1,3 glicosidase II (Gluc II). À estrutura glicídica é então adicionada uma estrutura de Man<sub>8</sub>GlcNAc<sub>2</sub> através da ação da Manosidase I (Man I) (Figura 5), antes de ser transportada para o compartimento *cis* do aparelho de Golgi (BYRNE, 2014).



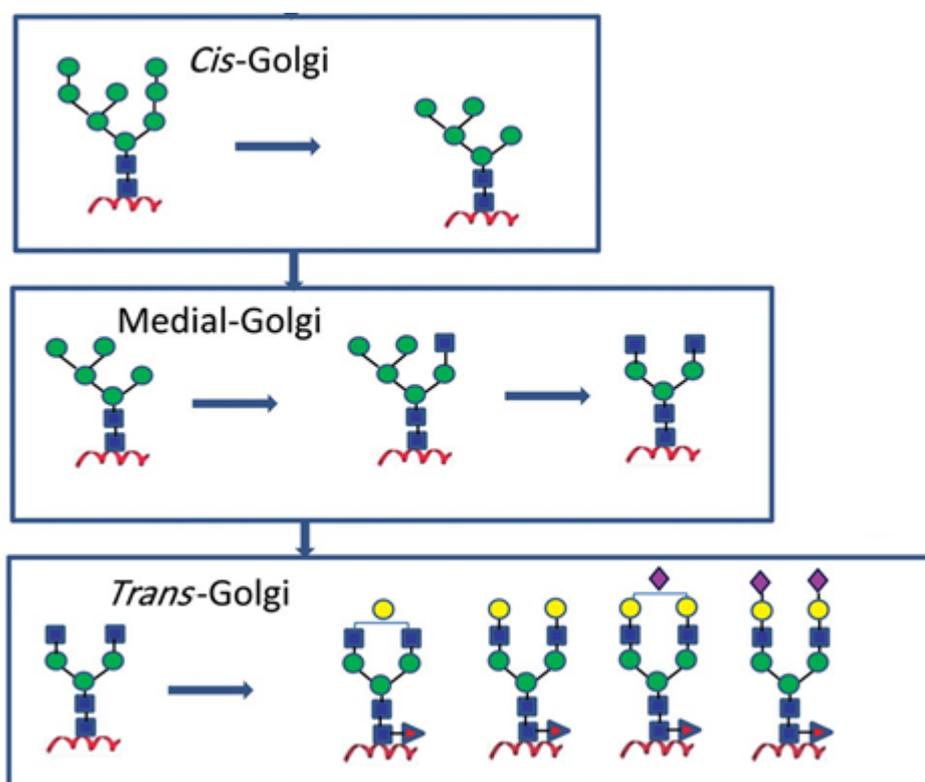
**Figura 5.** N-glicano nativo no RE. Fonte: LIU (2015).

#### 2.7.1.2. Processamento de N-glicanos no aparelho de Golgi (AG)

Dentro do AG, a atividade da Man I continua produzindo estruturas maiores de manose, Man<sub>5</sub>GlcNAc<sub>2</sub>. Esta estrutura é submetida a um processamento complexo no Cis, Medial e Trans Golgi (ver Figura 6), como resultado da atividade variável de uma série de enzimas. Diversas enzimas transferases são responsáveis pela adição sequencial de monossacarídeos, dentre eles: GlcNAc, galactose, fucose e ácido siálico, resultando no alongamento da estrutura glicídica. As

primeiras destas enzimas são as N-acetilglicosaminiltransferases (GnT), as quais são responsáveis pela conversão das estruturas maiores de manose em uma estrutura complexa, introduzindo cadeias sobre o núcleo da estrutura. Estas ações também permitem biseccionar a GlcNAc em duas cadeias. Como pode ser visto na Figura 7, a GnTI transfere resíduos de GlcNAc do nucleotídeo associado a carboidratos UDP-GlcNAc para o braço  $\alpha$ -1,3 manose da estrutura maior de manose. A estrutura híbrida resultante é convertida para uma estrutura híbrida de Man3 pela ação da enzima manosidase II (Man II). A GnTII transfere então um resíduo de GlcNAc para o braço de  $\alpha$ 1,6 manose livre da estrutura híbrida. A estrutura resultante é um complexo glicano biantenário. Antes do alongamento do complexo glicano por meio da ação das enzimas galactosil transferase e sialil transferase, outras GnT's podem adicionar mais ramificações ao glicano, como é ilustrado na Figura 7. A atividade combinada de GnTIV e GnTV conduz para uma estrutura tetra-ramificada denominada de M<sub>3</sub>Gn<sub>4</sub> (BYRNE, 2014).

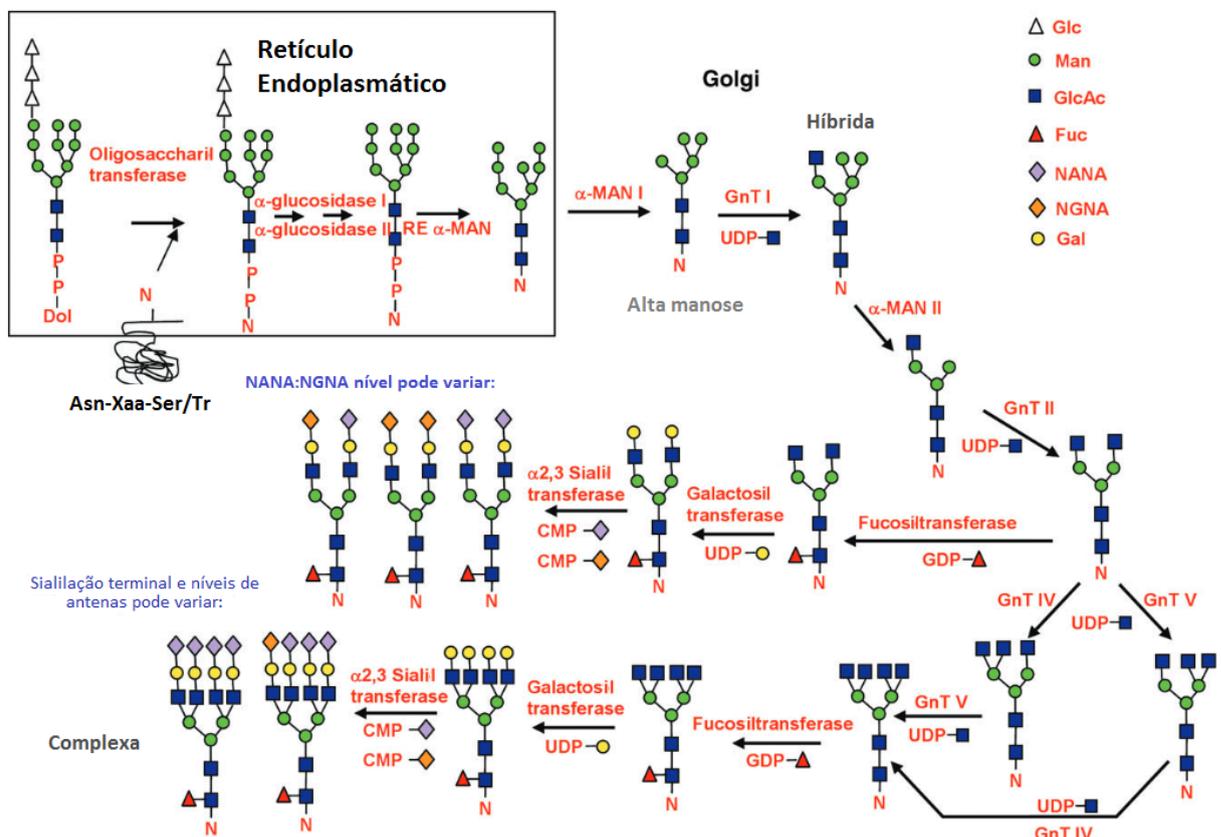
A ação das enzimas GnT é seguida pela fucosilação do complexo glicano birramificado. Esta reação é catalisada pela enzima  $\alpha$ 1,6 fucosiltransferase, que é uma proteína transmembrana do tipo II. Ela é responsável pela transferência de fucose de um doador de GDP-fucose para a Asn ligada a um resíduo GlcNAc. Após a fucolização, os N-glicanos são transportados para o compartimento *trans* do AG, local onde as estruturas glicídicas emergem e são sujeitas à ação das enzimas galactosil e sialil transferases (BYRNE, 2014).



**Figura 6.** Representação esquemática da biossíntese de um N-glicano no Cis, Medial e Trans -Golgi.

Fonte: LIU (2015).

A sialilação é o último estágio intracelular do processo de glicosilação. A sialilação envolve a transferência de ácido siálico do nucleotídeo associado a carboidrato, ácido citidiníco-5'-monofosfo-N-acetilneuramínico (CMP-NANA), para o resíduo de galactose na estrutura glicana. Esta reação é catalisada através da enzima sialil transferase. As duas ligações mais importantes para as glicoproteínas humanas são as ligações  $\alpha$ 2,3 e  $\alpha$ 2,6. Estas duas reações são catalisadas através das sialil  $\alpha$ 2,3 e  $\alpha$ 2,6 transferases, respectivamente. A enzima sialil  $\alpha$ 2,6 transferase está ausente em hamsters e as células CHO produzem glicoproteínas exclusivamente com resíduos de ácido siálico  $\alpha$ 2,3 terminais. Após a sialilação na região *trans* do AG, as glicoproteínas são transportadas para a *network trans* do AG, de onde emergem em vesículas destinadas a transportar o conjunto de glicoproteínas em questão (BYRNE, 2014).



**Figura 7.** Vias de glicosilação de N-glicanos. Adaptado: HOSSLER; KHATTAK; LI, (2009).

### 2.7.2. O-Glicanos

Os O-glicanos são estruturalmente menores do que os N-glicanos e são adicionados pós-traducionalmente à proteína completamente organizada estruturalmente. A O-glicosilação difere da N-glicosilação já que pode ser iniciada tanto no RE quanto no AG. A N-glicosilação foi notada iniciando unicamente no RE (HOSSLER; KHATTAK; LI, 2009). A O-glicosilação de proteínas começa com a transferência de N-acetilgalactosamina (GalNAc) de um UDP-GalNAc para o grupo hidroxila de um resíduo específico de serina ou treonina através de uma ligação O-glicosídica. Esta reação é catalisada pela enzima GalNAc transferase. Nenhuma sequência



heterogeneidade com impacto potencial na segurança e eficácia, tornando-se um parâmetro crítico de fabricação a ser monitorado. Por conseguinte, uma caracterização completa do conteúdo dos glicanos, a estrutura da cadeia do glicano, os oligossacarídeos e os sítios de glicosilação presentes no anticorpo são críticos (REUSCH; TEJADA, 2015).

## 2.9. Propriedades biológicas da glicosilação

A glicosilação desempenha um papel essencial nas funções das proteínas que possuem esta modificação pós-traducional. Os açúcares presentes na Fc dos anticorpos monoclonais são críticos já que podem influenciar a eficácia, farmacocinética e segurança do mAb (Tabela 3).

### 2.9.1. Eficácia

A estrutura dos glicanos pode ter um impacto positivo ou negativo sobre as funções efetoras Fc. TAO e MORRISON (1989) mostraram que as IgG1 e IgG3 aglicosiladas perderam a capacidade de se ligar a Fc (receptores RI e ativar o complemento). Diversos estudos subsequentes, usando IgGs humanizadas e anticorpos completamente humanos, confirmaram o carácter crítico da glicosilação sobre as funções efetoras mediadas pelo receptor Fc. O impacto mais impressionante dos glicanos nas funções efetoras de Fc é o mediado por Fuc, o qual é adicionado à estrutura do núcleo nos estágios tardios da biossíntese de glicanos no aparelho de Golgi. A fucosilação do núcleo inibe a ligação da IgG a FcγRIIIa e diminui a atividade ADCC. Com a linhagem de células CHO Lec 13 que é deficiente na adição de Fuc ao núcleo de glicosilação, SHIELDS et al. (2002) demonstraram que os anticorpos IgG afucosilados exibiram um aumento 100 vezes na atividade ADCC, melhorando assim a ligação ao receptor FcγRIIIa. Muitos estudos posteriores confirmaram este resultado e os métodos para produzir IgG afucosilada foram extensivamente investigados (IIDA et al., 2006; ITO et al., 2009; MORI et al., 2004; NATSUME et al., 2006; SATOH; IIDA; SHITARA, 2006). A primeira patente relacionada ao aumento da ADCC com uma IgG afucosilada foi publicada em 2000. Usando mAbs comerciais (rituximabe e trastuzumabe), foi demonstrado que a defucosilação aumenta a atividade de ADCC no mínimo em duas ordens de magnitude *in vitro* e *ex vivo*. Concluiu-se que o resíduo de Fuc ligado à região mais interna dos oligossacarídeos biantenários do tipo complexo desempenha o papel mais crítico no ADCC dos anticorpos terapêuticos (LIU, 2015; SATOH; IIDA; SHITARA, 2006; SHIELDS et al., 2002).

Glicoestruturas altamente galactosiladas aumentam, *in vitro*, a ligação C1q e a atividade de CDC, embora que a atividade de CDC não seja considerada relevante *in vitro*. Gal terminal parece não demonstrar desempenhar um papel importante na atividade de ADCC de uma IgG. THOMANN et al. (2015) mostraram que os níveis elevados de galactose terminal não apresentam efeito sobre ADCC em dois diferentes anticorpos terapêuticos desenvolvidos por glicoengenharia, indicando que a galactose terminal modularia a ADCC dependendo do nível de afucosilação. Por

outro lado, se o *CDC* é parte do mecanismo/modo de ação do anticorpo terapêutico, o impacto dos níveis de galactosilação deveria ser considerado durante a avaliação de critérios críticos de qualidade (REUSCH ; TEJADA, 2015).

Um alto conteúdo de manose (Man5/8/9) em uma IgG resulta em alta afinidade de ligação para FcγRIIIa e também alta atividade de *ADCC*. Esta alta atividade de *ADCC* pode ocorrer por causa da ausência de Fuc, uma vez que glicanos do tipo alta manose não possuem o núcleo fucosilado. O núcleo fucosilado requer a adição de GlcNAc pela GnT-1; por isso, somente os glicanos híbridos e complexos podem se tornar fucosilados. A manose aumenta a afinidade pelo receptor FcγRIIIa, resultando no melhoramento da atividade de *ADCC*; manose alta também reduz a ligação com C1q, conduzindo a uma baixa atividade de *CDC* (LIU, 2015).

A sialilação da Fc pode levar à diminuição da atividade de *ADCC* e, em alguns casos, pode até afetar a ligação ao alvo. Mesmo com quantidades baixas de glicanos sialilados, a influência da sialilação sobre a ligação FcγRIIIa e *ADCC* deve ser determinada como parte da avaliação de CQA (REUSCH; TEJADA, 2015).

### **2.9.2. Farmacocinética (PK)**

A PK de um anticorpo pode ser alterada por causa da ligação do glicano aos receptores presentes nos tecidos, normalmente resultando em uma rápida remoção do anticorpo da circulação. Os receptores de glicanos que foram atribuídos para a remoção de glicoproteínas *in vivo* incluem o receptor de manose (ManR) e o receptor de asialoglicoproteínas (ASGPR). O ASGPR e ManR são carboidrato-específicos. Um anticorpo de coelho com Gal terminal exposta (depois da remoção do ácido siálico) também exibiu uma rápida depuração sanguínea. Os mAbs glicosilados com glicanos com alta manose terminal mostraram uma rápida depuração do sangue. Portanto, o alto conteúdo de manose de mAbs terapêuticos deve ser considerado como um importante atributo na qualidade do produto que pode afetar as propriedades de PK (Liu et al., 2015).

A IgG de soro humano está, geralmente, sialilada em menos de 10% do total, enquanto que mAbs recombinantes produzidos em células CHO apresentam uma sialilação desprezível. Contudo, os mAbs produzidos em células de hibridomas murinos podem apresentar sialilação acima de 50% (Liu et al., 2015). Altos níveis de sialilação terminal de mAbs são importantes para evitar efeitos de receptores de asialoglicoproteínas. Estes receptores estão presentes no fígado e na superfície de macrófagos e são responsáveis pela remoção de glicoproteínas não sialiladas da circulação, reduzindo suas meias-vidas. Embora, Butler et al. (2009) tenham ressaltado a importância de alta sialilação terminal para proteínas terapêuticas. Naso et al. manipularam a sialidase em células hospedeiras, gerando mAbs com alto e baixo conteúdo de ácido siálico, e não observaram diferenças na PK em função do teor de ácido siálico.

### 2.9.3. Imunogenicidade

Proteínas terapêuticas podem se apresentar imunogênicas e também induzir respostas anticorpos-anti-drogas (*ADA*). A imunogenicidade dos mAbs terapêuticos pode causar respostas de hipersensibilidade, incluindo anafilaxia. A imunogenicidade pode ser causada, dentre outros fatores, por variações no padrão de glicosilação.

O produto Erbitux® (cetuximabe), manufaturado em células de mieloma murino (SP2/0), possui  $\alpha$ -Gal epítipo e é imunogênico em humanos. Foi reportado que cetuximab induziu a anafilaxia em alguns dos pacientes, onde este epítipo de  $\alpha$ -Gal foi detectado. De acordo com a literatura,  $\alpha$ -1,3-Gal pode ser um CQA relacionado à segurança/imunogenicidade. Estes compostos devem ser monitorados no caso de usar células Sp2/o ou NS0 na produção de anticorpos terapêuticos. Além disso, glicoproteínas recombinantes produzidas em linhagens de células do mieloma murino frequentemente contêm o ácido N-glicolil-neuramínico não humano (NGNA). Estudos recentes indicam que todos os seres humanos possuem anticorpos anti-NGNA, às vezes em níveis elevados. O cetuximabe, produzido em células do mieloma murino, é conhecido por conter NGNA, enquanto que o panitumumabe, produzido em células CHO, contém NGNA em nível insignificante. Assim, mAbs com glicanos que possuem NGNA podem ter potencial de causar imunogenicidade em humanos e devem ser evitados (REUSCH; TEJADA, 2015).

Por outro lado, as plantas são organismos atrativos para a produção de proteínas terapêuticas recombinantes. No entanto, anticorpos monoclonais derivados de plantas possuem N-glicanos complexos que contêm resíduos  $\beta$ (1,2) -xilose e  $\alpha$ 1,3-fucose que podem ser imunogênicos. Assim, no caso de usar plantas para a produção de anticorpos terapêuticos, estes compostos deveriam ser levados em consideração como CQAs (REUSCH; TEJADA, 2015).

| <b>Tabela 3.</b> Possíveis impactos de diferentes estruturas glicídicas sobre a ação de mAbs e proteínas de fusão Fc. Fonte:LIU (2015). |   |
|---|---|
| Glicanos  | Impactos  |
| Manose  | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Aumento da depuração de mAb</li> <li>• Melhoramento de Fc (RIIIa ligado/<i>ADCC</i> do mAb)</li> <li>• Redução de C1 ligado/<i>CDC</i> de mAb</li> </ul> |
| Fucose  | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Interferência na ligação com Fc (RIIIa).</li> <li>• Melhoria na atividade de Fc (RIIIa ligada/<i>ADCC</i>) em decorrência de defucosilação.</li> </ul>   |

|                         |  |
|-------------------------|--|
| Galactose               | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Aumento na depuração de mAb devido a galactoses expostas</li> <li>• Melhoria de <i>CDC</i> de mAb</li> </ul>                                |
| GlcNAc                  | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Melhoria na atividade Fc (RIIIa ligada/<i>ADCC</i>)</li> <li>• Aumenta a depuração de proteínas de fusão Fc</li> </ul>                      |
| Ácido siálico NANA      | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Redução crítica da depuração de proteínas de fusão Fc</li> <li>• Atividade anti-inflamatória</li> </ul>                                     |
| NGNA                    | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Interferência com Fc (RIIIa ligado e redução da atividade de <i>ADCC</i> de mAb</li> <li>• Indução de imunogenicidade em humanos</li> </ul> |
| Gal 1-3 Gal 1-4GlcNAc-R | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Indução de imunogenicidade e anafilaxia em humanos</li> </ul>   |

## **2.10. Estabilidade e glicosilação**

As proteínas são altamente susceptíveis à degradação proteolítica, antes mesmo de atingir as suas áreas alvo. A estabilidade proteolítica pode ser manipulada em proteínas através da alteração de estruturas de glicanos. A glicosilação enzimática de estruturas de glicano terminais (GlcNAc, galactose e ácido siálico) em anticorpos IgG resultou em maior estabilidade proteolítica na presença de papaína. A presença dos glicanos proporcionou impedimento estérico em torno do esqueleto peptídico de aminoácidos adjacentes ao local de glicosilação, conferindo assim à proteína maior estabilidade proteolítica (BYRNE, 2014).

## **2.11. Microheterogeneidade e Macroheterogeneidade**

Além da microheterogeneidade comentada anteriormente, a variedade de glicofomas obtida em um processo de produção de um biofármaco é decorrente também da macroheterogeneidade, que é função da ocupação ou não dos sítios potenciais de glicosilação em uma molécula. A microheterogeneidade e macroheterogeneidade são muito dependentes da influência de fatores ambientais na atividade das enzimas de glicosilação (glicosiltransferases) e da disponibilidade de precursores de glicosilação. Como resultado, as glicoproteínas são produzidas como conjuntos de diferentes glicofomas com estruturas de glicano variáveis ligadas ao esqueleto polipeptídico. As glicoproteínas são, portanto, normalmente de natureza heterogênea (BYRNE, 2014).

## **2.12. Condições de cultivo que afetam a glicosilação**

O processo de glicosilação envolve diferentes fatores tais como o precursor de síntese Dolicol-fosfato, os nucleotídeos, os monossacarídeos, a tradução da proteína, o pregamento e o trânsito pelo Golgi. Além disso, este processo requer a presença e a atividade de exoglicosidases e glicosiltransferases. Os organismos têm vários mecanismos para manter a homeostase, porém, há algumas situações em que não é possível manter as condições intracelulares constantes, ou situações em que o custo da homeostase pode dificultar ou influenciar a glicosilação. Nestes casos, as condições de crescimento das células podem afetar o padrão de glicosilação dos anticorpos monoclonais. As condições de cultivo impactam sobre o perfil de glicosilação (HOSSLER; KHATTAK; LI, 2009; JUARISTI et.al, 2007; PACIS et al., 2011; SERRATO et al., 2004, 2007), conforme resumido na Tabela 4.

**Tabela 4.** Efeito de meios de cultivo e das variáveis do processo de cultivo de células sobre a glicosilação. Adaptado de: HOSSLER; KHATTAK; LI (2009).

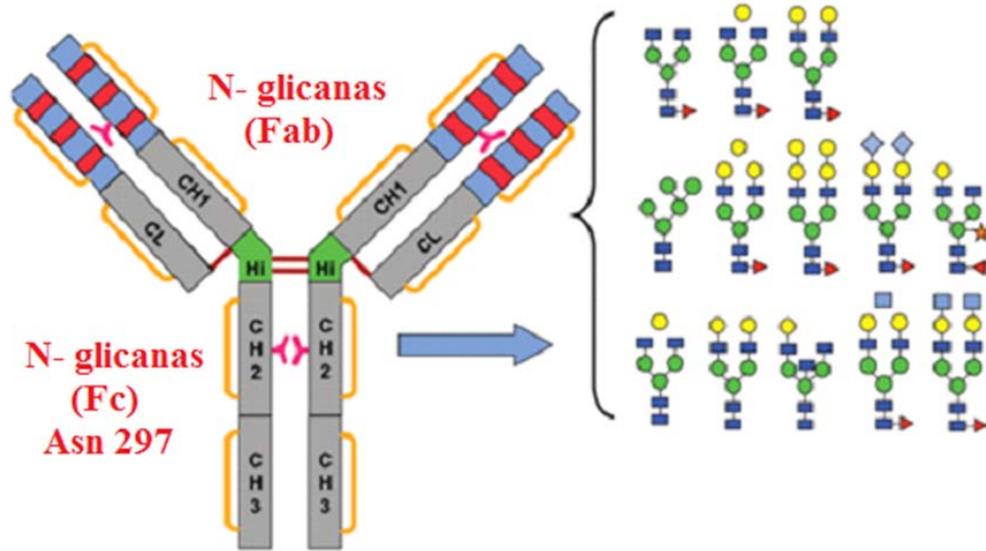
| Variável                                    | Efeito na glicosilação   |
|---|--|
| pH  | Galactosilação, sialilação, microheterogeneidade variam com valores de pH (6,8-7,8).   |
| Manganês (Mn)                               | Mn modula o perfil de glicosilação e a ausência de Mn pode inibir especificamente a glicosilação ligada a O.   |
| Butirato de sódio                           | Alterações específicas da proteína quando se utiliza butirato de sódio   |
| Amônia                                      | A alta concentração evita a glicosilação terminal, idealmente deve ser minimizada para <2Mm em cultura   |
| pCO <sub>2</sub>                            | A polissialilação diminui com o aumento do pCO <sub>2</sub>  |
| DMSO  | Dimetilsulfóxido (DMSO) diminui a sialilação   |
| Glicerol                                    | Glicerol aumenta a sialilação  |
| Temperatura                                 | Baixas temperaturas (30 ° C) causam uma diminuição do ácido siálico<br>Temperaturas mais baixas não reduzem a atividade da sialidase<br>Mudança de 37 ° C para 33 ° C pode manter glicosilação e produtividade |
| Critérios de colheita                       | Sialidase e glicosidases extracelulares diminuem o ácido siálico, portanto a viabilidade celular pode ser um fator crítico nos níveis finais de ácido siálico  |
| Viabilidade celular                         |  |
| Tensão de cisalhamento                      | O cisalhamento reduziu a ocupação do local em uma N-glicoproteína  |
| Teor de nucleotídeo associado a carboidrato | A suplementação com acetilmanosamina melhorou a sialilação de IFN- $\gamma$ mas não mudou para TIMP-1, embora as concentrações de ácido siálico aumentassem em ambos os casos                                  |
| Glicina betaína                             | A glicina betaína inibe a polissialilação em osmolalidades <435 mmHg, mas protege a polissialilação em osmolalidades mais elevadas   |
| Sistema de cultura e operação               | A perfusão aumenta a sialilação em comparação com a batelada alimentada. O sistema de tanque agitado aumenta a morte celular, o que resulta em diminuição da sialilação.                                       |

### 2.13. Glicosilação de anticorpos monoclonais do tipo IgG1 recombinantes

A estrutura básica de uma molécula de IgG é de quatro cadeias polipeptídicas, sendo duas cadeias pesadas (massa molecular 50 kDa) e duas cadeias leves (massa molecular 25 kDa). A cadeia pesada tem uma região variável e três regiões constantes. A cadeia leve tem uma região variável e uma região constante. As regiões variáveis são responsáveis pela ligação do antígeno. Através da formação de ligações covalentes (16 para IgG1 e IgG4, 8 para IgG2) e não covalentes, as duas cadeias pesada e leve formam três porções proteicas independentes ligadas através de um ligante flexível conhecido como região dobrada. Duas destas regiões são conhecidas como as regiões Fab, sendo estas idênticas e possuindo as regiões variáveis, de ligação ao antígeno. A terceira região é referida como a região Fc, que é um homodímero e consiste em três domínios: CH1, CH2 e CH3 (Figura 9). Os domínios CH2 têm um sítio de N-glicosilação altamente conservado na asparagina-297 (Asn-297) (BYRNE, 2014; JEFFERIS, 2005).

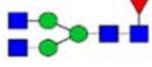
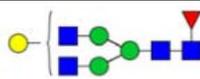
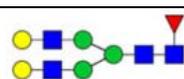
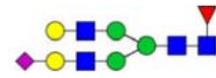
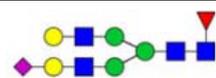
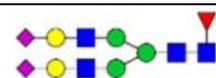
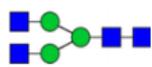
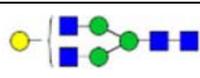
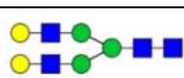
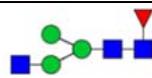
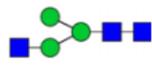
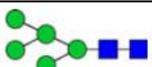
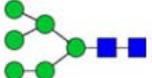
Os N-glicanos presentes na região Fc da IgG são normalmente estruturas de tipo complexo biantenário e contêm normalmente um núcleo de heptassacarídeo conservado composto de 2 resíduos GlcNAc, 3 manose e 2 GlcNAc que são  $\beta$ -1,2 ligados à manose- $\alpha$ -6 e manose- $\alpha$ -3, formando 2 braços. A maioria deles é fucosilada no núcleo e é caracterizada por baixos níveis de galactosilação e sialilação. A maior variação na glicosilação de um mAb foi observada no nível de galactosilação com estruturas fucosiladas de núcleo biantenário contendo dois, um ou nenhum resíduo de galactose. As glicofomas de mAb produzidas pelas células CHO podem variar amplamente de clone para clone e são também muito dependentes das condições de cultivo. Os anticorpos IgG produzidos em células de mamíferos contêm geralmente níveis baixos de glicofomas de alta manose (Man5-9), porque a maioria das glicoproteínas é processada para glicofomas complexas G0F, G1F e G2F (Tabela 5) (REUSCH et al., 2016a).

As linhagens celulares que produzem IgG1 recombinantes devem ser selecionadas com base na produção de IgG com fucosilação, galactosilação e/ou sialilação, dependendo dos mecanismos efetores desejados, contendo níveis mínimos de glicanos de tipo oligomanose e estruturas de glicano antigênicas e/ou imunogênicas (BYRNE, 2014).



**Figura 9.** Estrutura de uma IgG1 N-glicosilação ligada a Asn297. Adaptado de: BECK; REICHERT; SYSTEMS, (2012).

**Tabela 5.** Estruturas glicosiladas comumente encontradas na porção Fc de um anticorpo terapêutico.Adaptado de REUSCH *et al.*, 2016b.

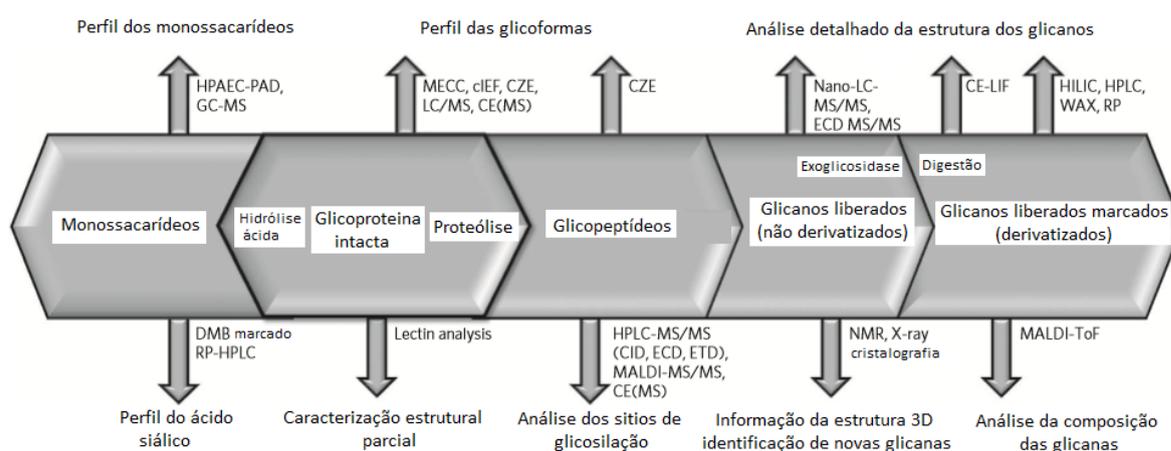
| Nome e composição | Classificação            | Estrutura  | Exemplos de abundância relativa para um anticorpo terapêutico |
|-------------------|--------------------------|--|---|
| G0F               | Complexo, fucosilado     |    | 35.5  |
| G1F               | Complexo, fucosilado     |    | 43.4  |
| G2F               | Complexo, fucosilado     |    | 9.5   |
| G1FS              | Complexo, fucosilado     |    | 0.2   |
| G2S1F             | Complexo, fucosilado     |    | 0.7   |
| G2S2F             | Complexo, fucosilado     |  | 0.1   |
| G0                | Complexo, não fucosilado |  | 4.6   |
| G1                | Complexo, não fucosilado |  | 3.3   |
| G2                | Complexo, não fucosilado |  | 0.3   |
| G0F-N             | Híbrido (monoantenário)  |  | 0.5   |
| G0-N              | Híbrido (monoantenário)  |  | 0.4   |
| M5                | Alta Manose              |  | 1.5   |
| M6                | Alta Manose              |  | 0.1   |

■ N-acetilglucosamina   ● manose   ● galactose   ▲ fucose   ◆ N-acetilneuramínico

## 2.14. Estratégias para a análise de glicosilação

A maquinaria biossintética que constrói glicanos executa passos sequenciais e competitivos que resultam em uma mistura de variantes glicosiladas (glicofomas) para cada glicoproteína. As glicoproteínas de ocorrência natural estão frequentemente presentes em níveis baixos, desafiando a sensibilidade das tecnologias analíticas. Não existe atualmente um método universal para a identificação rápida e confiável da estrutura de glicanos. Portanto, deve-se determinar o melhor método ou combinação de métodos, para atingir esses objetivos. Por isso, o desenvolvimento de metodologias precisas, robustas e sensíveis para a análise de glicanos é muito importante (MARIÑO et al., 2010).

A análise de glicosilação pode ser realizada utilizando três abordagens diferentes: (i) caracterização de glicanos em glicoproteínas intactas, (ii) caracterização de glicopeptídeos e (iii) análise estrutural de glicanos liberados quimicamente ou enzimaticamente. As diversas tecnologias disponíveis para cada abordagem foram resumidas na Figura 10.



**Figura 10.** Principais rotas para a caracterização de glicoproteínas, glicopeptídeos e glicanos. Os monossacarídeos podem ser obtidos por hidrólise a partir de glicoproteína, glicopeptídeos ou glicanos liberados. Abreviações: HPAEC-PAD, cromatografia de troca aniônica de alto desempenho com detecção amperométrica de pulso; MECC, cromatografia capilar eletrocinética micelar; cIEF, focalização isoelétrica capilar; CZE, eletroforese de zona capilar; MALDI-MS, espectrometria de massa por ionização e dessorção a laser assistida por matriz; CE-LIF, eletroforese capilar com fluorescência induzida por laser; HILIC, cromatografia líquida de interação hidrofílica; CERA, troca aniônica fraca; RP, fase reversa; ESI-MS/MS, espectrometria de massas com ionização por electrospray em tandem; MALDI-ToF, ionização e dessorção a laser assistida por matriz-tempo de vôo; CID, dissociação induzida por colisão; ETD, dissociação de transferência de elétrons; ECD, dissociação de captura de elétrons. Adaptado de MARIÑO et al. (2010).

### 2.14.1. Sequência de análise de ligação de glicanos

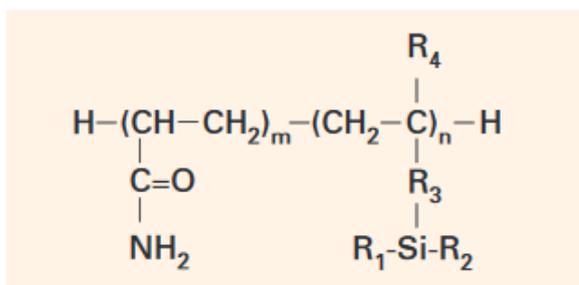
A análise estrutural de glicanos envolve não apenas monossacarídeos e sua sequência na glicoproteína, mas também a estereoquímica de cada ligação e o nível de ramificação. Diversas agências reguladoras requerem essa análise estrutural detalhada de glicoproteínas terapêuticas (tais

como os anticorpos monoclonais), porque, como discutido anteriormente, a estrutura do glicano pode afetar a sua imunogenicidade, estabilidade e farmacocinética. A análise do glicano é importante durante a produção de glicoproteínas, uma vez que os parâmetros do processo e o processamento podem influenciar a estrutura do mesmo. Portanto, a análise do padrão de glicosilação é uma parte importante da caracterização de glicoproteínas terapêuticas, especialmente em mAbs.

#### 2.14.2. Cromatografia de interação hidrofílica (HILIC)

Os métodos de separação de glicanos baseados em cromatografia líquida de alto desempenho são amplamente utilizados. HILIC de glicanos marcados com fluoróforos é hoje a tecnologia mais popular, capaz de separar diferentes oligossacarídeos com base nas suas propriedades hidrofílicas ou hidrofóbicas.

As colunas de fase normal TSKgel Amide-80 da Tosoh Bioscience, por exemplo são utilizadas para este tipo de análise. Estas contêm um material de empacotamento em que a fase estacionária consiste de grupos carbamoil não iônicos que estão quimicamente ligados às partículas de gel de sílica (Figura 11). Tendo uma fase estacionária não iônica, TSKgel Amida-80 proporciona excelente estabilidade química. O átomo H no grupo -NH na fase estacionária pode formar uma ligação de hidrogênio com átomos de oxigênio nos grupos hidroxila ou com um grupo carbonila.

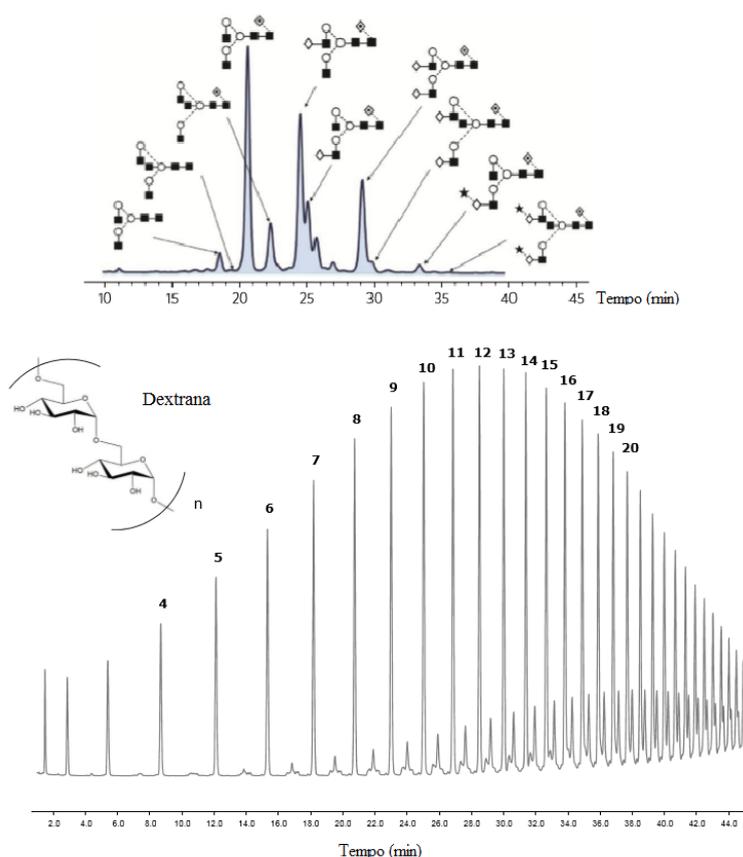


**Figura 11.** Sílica covalentemente ligada aos grupos carbamoil não iônicos.

A análise começa com o acondicionamento com uma fase móvel aquosa, que estabiliza uma camada de solvente polar tal como acetonitrila e água na superfície da fase estacionária (Figura 12). É nesta camada aquosa que os glicanos irão particionar quando são carregados sob condições de baixa polaridade do solvente. Como resultado, é criada uma camada rica em água na fase ligada que permite a partição de solutos com a fase móvel mais orgânica. A seguir, os glicanos são eluídos da fase estacionária com uma solução fortemente polar, neste caso uma concentração elevada de água com um tampão, para minimizar as interações iônicas. O número de grupos polares, bem como a conformação e solubilidade das amostras na fase móvel, determinam a ordem de eluição.



Quando os glicanos marcados com 2-AB são analisados por HILIC, a marcação estequiométrica e não seletiva 1:1 dos glicanos liberados permite a medição quantitativa das quantidades relativas de oligossacarídeos individuais: glicanos carregados e neutros podem ser analisados simultaneamente. Utilizando um padrão de dextrana hidrolisada marcada com 2-AB como padrão externo, o tempo de retenção de cada espécie presente no hidrolisado é relacionado por encaixe numa curva de distribuição polinomial. O tempo de retenção é então transformado em unidades de glicose (UG), que podem ser usadas como valores padrão de referência, pois a calibração minimiza as variações do dia e/ou do sistema, tornando os dados comparáveis e robustos (Figura 14).



**Figura 14.** Perfil HILIC-HPLC de N-glicanos liberados a partir de IgG de soro humano. A escala das unidades de glicose (UG) baseia-se na eluição do hidrolisado de dextrana marcado com 2-AB.

Adaptado de: MARINÑO et al. (2010).

### 2.14.3. Análise de glicanos por MALDI -TOF/TOF MS

A espectrometria de massa (EM) é amplamente utilizada para a análise de glicanos porque proporciona informação entre massa e composição. O método por ionização e dessorção a laser assistida por matriz (MALDI-TOF/TOF MS) é frequentemente usado como um primeiro passo na análise porque é uma experiência simples para estimar a diversidade de glicanos presentes, com baixo gasto de amostra.

Os glicanos neutros são melhor detectados pelo modo de íons positivos, normalmente como um aduto  $[M + Na^+]$ . À medida que os glicanos sialilados tornam-se instáveis durante o passo de ionização, as amostras são corridas em modo negativo e usualmente dessialiladas ou derivatizadas antes da análise. A permetilação gera derivados de metila para cada grupo OH e NH livre e esterifica também o grupo carboxila nos resíduos sialila, aumentando a sensibilidade global e tornando possível a análise de glicanos neutros e sialilados ao custo de derivatização (MARIÑO et al., 2010).

As limitações da EM incluem a sua susceptibilidade à presença de sais, a necessidade de obter espectros de fragmentação diagnóstica para compostos isoméricos e isobáricos, e uma sensibilidade mais baixa do que a obtida por HILIC. Por fim, a resposta para qualquer analito depende da sua eficiência de ionização, o que pode tornar a quantificação problemática.

O desenvolvimento de glicosídeos de alto rendimento e a consequente expansão das estruturas de carboidratos caracterizados só podem ser manipulados adequadamente com uma análise robusta e automatizada, baseado em extenso suporte bioinformático. A glicobioinformática está se expandindo, beneficiando-se de desenvolvimentos feitos originalmente para os campos de genômica e proteômica. Para auxiliar a análise dos resultados obtidos por EM e HILIC, várias ferramentas de bioinformática foram desenvolvidas pelo grupo de glicobiologia Dublin-Oxford do NIBRT (Irlanda). Estas incluem o *GlycoExtractor*, uma ferramenta baseada na web para a extração de grandes volumes de dados de perfis de glicanos processados, e a *GlycoBase*, uma base de dados de HILIC e dados de espectrometria de massa para mais de 400 N-glicanos marcados com 2-AB e 75 estruturas de O-glicanos (MARIÑO et al., 2010).

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivo Geral

O objetivo geral deste trabalho foi

Avaliar o padrão de glicosilação de um anticorpo monoclonal produzido por células CHO.

#### 3.2. Objetivos Específicos

Os objetivos específicos deste trabalho foram:

1. Purificar por meio de cromatografia de afinidade com proteína A o anticorpo monoclonal, produzido por células CHO DP12 recombinantes (ATCC clone #1934), por cultivo em perfusão e batelada.
2. Avaliar o perfil de N-glicosilação do anticorpo monoclonal, usando cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC) com detecção por fluorescência, através de protocolo envolvendo clivagem das glicanas com PNGase F, marcação dos mesmos com 2-aminobenzamida, digestões com exoglicosidases e análise por cromatografia de interação hidrofílica (HILIC) com coluna de fase normal.
3. Avaliar as características obtidas para as glicofomas do anticorpo monoclonal com os dados depositados na “Glycibase 3.2.4”, para propor as estruturas glicosiladas presentes.
4. Confirmar o perfil de N-glicosilação do anticorpo monoclonal por espectrometria de massa por ionização e dessorção a laser assistida por matriz (MALDI-TOF/TOF).

## **4. METODOLOGIA**

### **4.1. Cultivo Celular**

#### **4.1.1.Linhagem celular**

Como modelo de produção de anticorpo monoclonal para este estudo, utilizou-se uma linhagem de célula de ovário de hamster chinês (CHO) DP-12 clone#1934 (ATCC® CRL-12445), produtora de um mAb do tipo imunoglobulina G1 recombinante (IgG1), disponível na ATCC (American Type Culture Collection) com massa molecular de 150 kDa. A linhagem foi originalmente obtida a partir da transfecção de células CHODUXB11 com um vetor de expressão bicistrônico DHFR-intron, denominado p6G4V11N35E.choSD.10, coexpressor das cadeias leve e pesada do anticorpo humanizado IgG1 variante 6G4V11N35E (GONZALES et al., 2000). Esse anticorpo possui afinidade à interleucina 8 (IL-8), uma citocina com massa molecular de aproximadamente 8,3 kDa e composta por 72 aminoácidos, responsável por ativar os neutrófilos, células do sistema imune que, quando recrutadas, são capazes de atravessar a parede dos vasos sanguíneos e se deslocar ao local afetado, desencadeando uma reação inflamatória (BETTINARDI, 2016).

#### **4.1.2. Cultivo em biorreatores e obtenção de sobrenadante**

O cultivo em biorreatores da linhagem produtora de anticorpo foi realizado pela equipe do Laboratório de Engenharia de Cultivos Celulares (PEQ/COPPE/UFRJ). As células foram cultivadas em biorreatores do tipo tanque agitado no modo de perfusão, com as seguintes variáveis controladas: pH, temperatura, concentração de oxigênio dissolvido e agitação. O cultivo das células CHO DP12 foi realizado em meio de cultivo TC-LECC (Xell AG), quimicamente definido e sem componentes de origem animal ou humana. O perfundido foi coletado, centrifugado e, em seguida, o sobrenadante foi filtrado em membranas com 0,22µm de tamanho de poro e congelado a -80 °C em alíquotas de 45 mL (tubos Falcon). Antes da utilização em sistemas cromatográficos, este foi descongelado e filtrado novamente por membranas com 0,45µm de tamanho de poro (Sartorius) para eliminar quaisquer resíduos sólidos. Foram produzidos dois lotes, que foram utilizados ao longo deste trabalho na realização dos ensaios de purificação e perfil de N-glicosilação, como descrito na Tabela 6.

Tabela 6: Características dos lotes de sobrenadante produzidos em biorreatores

| Lote | Responsável pelo cultivo        | Linhagem produtora | Modo de operação                      | Características no momento da colheita   |
|------|---------------------------------|--------------------|---------------------------------------|--|
| 1    | MSc Eng.<br>Ioná<br>Bettinardi. | CHO DP12           | Perfusão<br><br>(estado estacionário) | Dia 13 do processo<br><br>Concentração celular: $24,2 \times 10^6$ céls/mL<br><br>Viabilidade celular: 93% |
| 2    | MSc Eng.<br>Ioná<br>Bettinardi. | CHO DP12           | Perfusão<br><br>(início)              | Dia 5 do processo<br><br>Concentração celular: $3,21 \times 10^6$ céls/mL<br><br>Viabilidade celular: 88%  |

## 4.2. Purificação do mAb

O mAb foi purificado a partir do sobrenadante de cultivo utilizando cromatografia de afinidade.

### 4.2.1. Equipamento, coluna cromatográfica e tampões

As corridas cromatográficas foram realizadas sistema de purificação ÄKTA Purifier (GE Healthcare) que permitiu o monitoramento em linha de absorbância a 280 nm, condutividade e pH. O mAb produzido foi purificado através de cromatografia de afinidade usando uma coluna de 1mL de proteína A Hitrap™ Mab Select™, com tamanho de partícula de 85 µm (GE Healthcare). Foram utilizados os seguintes tampões serie 1: A1 – tampão de equilíbrio (PBS, NaCl 0,3 M, pH 7.6), B1 - tampão de eluição (Tampão glicina - HCl 0,1 M, pH 3.0) e neutralização (Tris-HCl 1M, pH 9.0). Serie 2: A1 – tampão de equilíbrio (Tampão fosfato 0,1 M, pH 7.4), B1 - tampão de eluição (Tampão fosfato/ácido fosfórico 0,1 M, pH 3.0) e neutralização (Tris-HCl 1M, pH 9.0). Todos os tampões preparados foram devidamente filtrados com membranas de tamanho de poro de 0,22 µm (Millipore) e desgaseificados em banho ultrassônico (Quimis).

### 4.2.2. Método de purificação

A coluna de proteína A foi equilibrada com 10 volumes de coluna (VC) de tampão de adsorção (10VC). As amostras de sobrenadante foram descongeladas e incubadas à temperatura ambiente durante 10 minutos, homogeneizadas em vortex e depois diluídas com tampão de adsorção na proporção 28,5mL do sobrenadante e 1,5 mL do tampão de equilíbrio 10X, o que permitiu uma adsorção mais eficiente à coluna de proteína A. Um volume de 20 mL do sobrenadante foi aplicado no sistema. A coluna foi subsequentemente lavada com tampão de equilíbrio (20VC). O mAb foi eluído da coluna com o tampão de eluição (20VC) e monitorado a 280 nm. O pico foi coletado em tubos falcon. As amostras eluídas (1mL) foram neutralizadas com 60 µl de tampão de neutralização. A coluna foi lavada com tampão de eluição (20VC) para retirar quaisquer restos de mAb foi eluído. Após a finalização do processo de purificação, A coluna

cromatográfica foi devidamente regenerada e sanitizada com NaOH 0,1M, lavada com água ultrapura e armazenada a 4°C condicionada em etanol 20%. As amostras de mAb purificado foram armazenados a -80 ° C para posterior quantificação e análise de glicanos.

#### 4.2.3. Avaliação do rendimento das etapas de purificação

Um dos principais indicadores de desempenho em processos de purificação é o rendimento, que pode ser referente a uma única etapa de purificação ou a um conjunto de etapas (rendimento global). O rendimento é calculado em termos da massa da proteína de interesse, conforme a equação (1):

$$\text{Rendimento \%} = \frac{\text{Massa do mAb eluído}}{\text{Massa do mAb na alimentação}} \times 100 \quad (1)$$

#### 4.3. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) e coloração com nitrato de prata

A eletroforese foi realizada utilizando o sistema de Eletroforese Modular Mini-Protean II (Bio-Rad). Foram preparados géis com espessura de 1,5 mm em condições desnaturantes e redutoras, empregando uma concentração de 5% (m/v) de acrilamida/bisacrilamida para o gel de empilhamento e 12% (m/v) de acrilamida-bisacrilamida para o gel de resolução. As amostras foram diluídas em tampão de amostra (50mM de Tris-HCl, 2% (m/v) de SDS, 0,1% (m/v) de azul de bromofenol e 10% (v/v) de glicerol) na proporção de 25% de tampão para 75% de amostra e, posteriormente, aquecidas a 95°C por 5 minutos. Em uma cuba para eletroforese, o gel foi submergido em tampão de corrida (125 mM de Tris-base, 1,25 M de glicina e 0,1% (m/v) de SDS, pH 8,3). Para os experimentos, foram aplicados 15 µL de amostra diluída em tampão em cada poço do gel e a corrida foi realizada por aproximadamente 80 minutos à voltagem constante de 150 V, empregando-se uma fonte modelo 3000 Xi (Bio-Rad).

Após a realização da eletroforese, o método de coloração por nitrato de prata foi utilizado para a revelação do gel. Para tanto, este foi imerso durante 2 horas em solução de fixação (30% (v/v) de etanol e 10% (v/v) de ácido acético em água ultrapura), 10 minutos em solução de lavagem (30% (v/v) de etanol em água ultrapura), duas vezes por 10 minutos em água ultrapura, 5 minutos em solução de sensibilização (0,02% (m/v) de tiosulfato de sódio em água ultrapura), três vezes rapidamente em água ultrapura, 30 minutos em solução de prata (0,15% (m/v) de nitrato de prata em água ultrapura), cerca de 10 minutos (em função da detecção de bandas) em solução de revelação (3% (m/v) de carbonato de sódio e 0,05% (v/v) de formaldeído em água ultrapura), e por fim, 10 minutos em solução de parada (5% (v/v) de ácido acético em água ultrapura). Durante a revelação do gel, este foi mantido sob agitação orbital constante de 150 rpm.

#### 4.4. Quantificação do mAb purificado

A quantificação das amostras do sobrenadante de cultivo e de frações da purificação, tais como eluído, flowthrough e lavagem, foram realizadas em HPLC por meio de cromatografia de afinidade com proteína A (PA ID Cartridge, Applied Biosystems), com coluna de 20 $\mu$ m e dimensões 2,1 mm diâmetro x 30 mm comprimento, acoplada a um filtro pré-coluna (Upchurch A356, VWR), em um sistema Prominence (Shimadzu). As amostras foram detectadas por UV 280nm (BETTINARDI, 2016). Uma IgG de soro humano comercial foi utilizada como padrão (>95% pura, Sigma-Aldrich # 14506).

#### 4.5. Determinação da concentração de proteínas totais

A quantificação de proteínas totais foi realizada mediante ensaio de MicroBCA utilizando um kit comercial (#23235, Thermo Scientific). Para a curva-padrão foi utilizada a proteína albumina sérica bovina (#5000206, Bio-Rad). O protocolo foi realizado segundo as recomendações do fabricante e a leitura de absorbância feita a 562nm em leitor de microplacas (Biotek).

#### 4.6. Avaliação do perfil de N-glicosilação do anticorpo purificado

Os perfis de N-glicosilação das amostras foram avaliados mediante um protocolo introduzido no Laboratório de Engenharia de Cultivos Celulares (LECC) do PEQ/COPPE/UFRJ pelo Dr. José Cremata (in memorian), do Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB, Cuba).

##### 4.6.1. Clivagem dos glicanos com PNGase F

A PNGase F cliva a ligação entre o núcleo GlcNAc e o resíduo asparagina de todas as classes de N-glicanos (complexos, híbridos e alta manose), com exceção de N-glicanos específicos que contêm fucose  $\alpha$  (1,3) ligada ao resíduo GlcNAc ligado à proteína (frequentemente encontrados em glicoproteínas de plantas e insetos). No presente estudo, os glicanos foram separados da cadeia polipeptídica da seguinte forma:

- Preparo das amostras de anticorpo purificado: 60  $\mu$ L (300  $\mu$ g) do anticorpo em tampão fosfato 0.1M pH 7 foram processados com o kit de deglicosilação (Biolabs, # P0705L). As amostras de anticorpo purificado foram colocadas em um microtubo, ao qual adicionados 10  $\mu$ L de solução desnaturante (10X) (Biolabs, # B1704S). Em seguida, as mesmas foram incubadas durante 10 min a 100°C sem agitação e incubadas por 10 minutos à temperatura ambiente. Depois, foi adicionado 10  $\mu$ L da solução NP-40 (10X) (Biolabs, # B2704S), 10  $\mu$ L da solução G7 (10X) (Biolabs, # B3704S), e os N-glicanos foram liberados pela adição de 1  $\mu$ L de PNGase F 500 U/mL (Biolabs, # P0705L). Finalmente, as amostras foram incubadas durante 2h a 37°C sem agitação.
- Preparo da amostra de controle positivo: 20  $\mu$ L (300 $\mu$ g) de uma IgG de soro humano comercial (>95% pura, Sigma-Aldrich # 14506) foi utilizada como controle positivo para a

análise de glicosilação. Esta amostra foi processada da mesma forma que a amostra do anticorpo purificada.

#### **4.6.2. Recuperação dos glicanos e precipitação das proteínas**

Para precipitar as proteínas em volume equivalente a 3 vezes o volume reacional final da etapa de clivagem com PNGase F (270 $\mu$ L no caso das amostras em estudo e 150 $\mu$ L no caso da IgG controle) de etanol a -20°C foi adicionado e os tubos foram incubados por 15 min a -20°C. Centrifugo-se a 10 000rpm por 10 min para separar o sobrenadante e lavou-se o pellet com 200 $\mu$ L de etanol -20°C. Repetiu-se esta etapa duas vezes e reuniram-se todos os sobrenadantes contendo os glicanos. Finalmente, os glicanos liberados foram secos em concentrador centrífugo a vácuo sem aquecimento (Eppendorf) por 4h ou *overnight*. Neste ponto, as amostras que seriam analisadas por espectrometria de massas foram armazenadas a -20°C.

#### **4.6.3. Derivatização com 2-aminobenzamida (2AB) e eliminação do excesso do 2AB**

As amostras para análise por HILIC-HPLC foram derivatizadas com 2-aminobenzamida (2-AB). Ao microtubo que continha os N-glicanos secos, adicionou-se 5  $\mu$ L da solução derivatizante 2AB (Sigma-Aldrich, Catálogo # A89804). Os glicanos foram resuspendidos com a micropipeta, centrifugados para levá-los ao fundo do tubo, e incubados durante 2 h a 65°C sem agitação. Um excesso do marcador de fluorescência é requerido para assegurar a completa derivatização dos glicanos liberados para uma quantificação posterior. Este excesso de 2AB foi então removido utilizando cromatografia de papel (Papel filtro Whatman No.1, Whatman®). O papel de filtro foi pré-tratado previamente: primeiro foram cortadas fitas de papel Whatman de 3 cm de comprimento por 12 cm de altura, em seguida foram lavadas 3 vezes com água ultrapura e foram secas a 50°C na estufa.

As fitas foram identificadas com lápis na parte superior, depois com uma pipeta de 10  $\mu$ L foi aplicada a mistura glicano-2AB a 2 cm da extremidade inferior da fita de papel. As amostras foram secas com ajuda de um secador de cabelos depois de cada aplicação. As fitas foram introduzidas de forma vertical em um becker de vidro contendo acetonitrila (o ponto de aplicação da amostra devia estar acima do nível da acetonitrila) e mantidas entre 1,5h a 2 horas para poder eliminar todo o excesso do 2AB. A finalização da separação, uma mancha do excesso do 2AB na extremidade superior da fita de papel foi verificada com a ajuda de uma lâmpada UV. Após a separação, as fitas foram secas por 30 minutos à temperatura ambiente em uma capela de exaustão. O ponto de aplicação da amostra foi marcado com um lápis e, com a ajuda da lâmpada UV, os fragmentos foram cortados e colocados em microtubos de 1.5 mL. Os glicanos derivatizados com 2AB foram eluídos do fragmento de papel de filtro adicionando-se 500  $\mu$ L de água ultrapura ao mesmo e incubando-se à temperatura ambiente por 10 minutos (sem agitação). O eluído foi colocado em um novo microtubo. Ao microtubo inicial com o fragmento de papel de filtro colocou-se novamente 500  $\mu$ L de água ultrapura e este passo foi repetido mais uma vez. Finalmente, juntaram-se todos os eluatos resultantes. Esta solução foi filtrada usando uma seringa acoplada a um filtro de 0.45  $\mu$ m (Millipore). As glicanas-2AB foram secadas ao vácuo *overnight* (sem aquecimento). Depois, estes foram dissolvidos com 100 $\mu$ L de água ultrapura. Finalmente, a

solução de glicanos marcados com 2AB foi armazenada a  $-20^{\circ}\text{C}$  até o momento da injeção no HPLC.

#### 4.6.4. Análise por HILIC-HPLC

##### 4.6.4.1 Preparo das amostras para injeção

- Preparo da amostra do *ladder* de dextrana marcada com 2AB (doação pelo Dr. Cremata do CIGB, Cuba): adicionou-se  $240\mu\text{L}$  de acetonitrila 100% (filtrada),  $57\mu\text{L}$  de água ultrapura e  $3\mu\text{L}$  do *ladder* de dextrana. A mistura foi colocada em microtubo de  $1.5\text{mL}$  e foi homogeneizada suavemente com as mãos. A mistura foi então transferida para um *vial*  $12\times 32$  mm (Waters), verificando-se que não havia bolhas de ar, e finalmente foi injetada no HPLC ( $200\mu\text{L}$ ).
- Preparo da amostra de glicanos: misturou-se  $40\mu\text{L}$  da solução de glicanos marcados com 2AB e  $160\mu\text{L}$  de acetonitrila 100 % (filtrada). A mistura foi colocada em um microtubo de  $1.5\text{mL}$  e foi homogeneizada suavemente com as mãos. A mistura foi então transferida para um *vial*  $12\times 32$  mm (Waters), verificando-se que não havia bolhas de ar, e finalmente foi injetada no HPLC ( $200\mu\text{L}$ ).

##### 4.6.4.2 Preparo do Sistema HILIC-HPLC

Utilizou-se a coluna TSKgel Amide-80 de  $5\mu\text{m}$  ( $25.0\text{ cm} \times 4.6\text{ mm}$ ) (TOSOH BIOSCIENCE, Catálogo #13071). A coluna foi acondicionada em acetonitrila por 1h a  $30^{\circ}\text{C}$ , e a análise com um tempo de corrida de 167 minutos foi realizada no sistema de HPLC com detecção de fluorescência módulo RF-10AXL (Prominence, Shimadzu) com comprimentos de onda de excitação e emissão de 330 e 420 nm, respectivamente. Formiato de amônio 50 mM a pH 4.4 foi usado como tampão A e acetonitrila como tampão B. Resumindo, o princípio deste método envolve a interação dos grupos silanol carregados na coluna amida com os grupos hidroxila nos glicanos em um gradiente decrescente de acetonitrila. Os glicanos são eluídos com base na área de superfície hidrofílica exposta à resina. As condições usadas se detalham na Tabela 7:

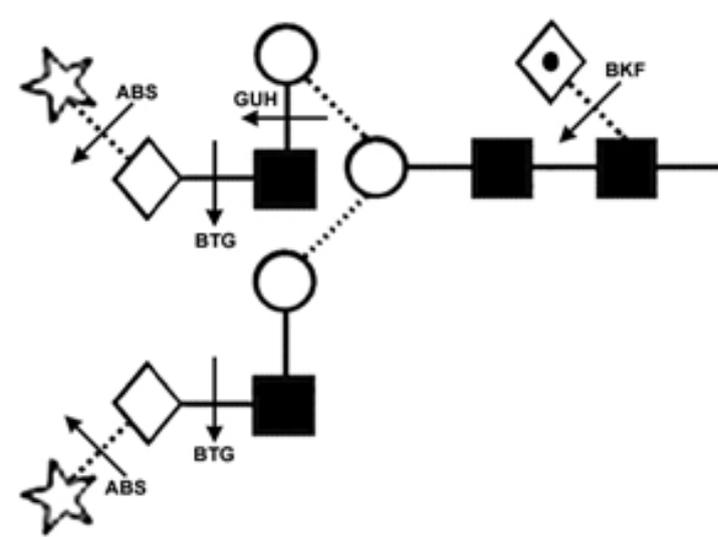
**Tabela 7.** Método de separação dos derivados 2AB.

| Tempo (min)               | Vazão (ml/min) | Formiato de amônia 50 mM pH 4.4 (Tampão A) | Acetonitrila 100% (Tampão B) |
|---------------------------|----------------|--|------------------------------|
| 0                         | 0.4            | 20   | 80                           |
| 132                       | 0.4            | 53   | 47                           |
| 135                       | 0.4            | 100  | 0                            |
| 137                       | 1.0            | 100  | 0                            |
| 142                       | 1.0            | 100  | 0                            |
| 145                       | 0.4            | 100  | 0                            |
| 147                       | 0.4            | 20   | 80                           |
| 167                       | 0.4            | 20   | 80                           |
| Tempo de corrida: 167 min |                |  |                              |

O sistema foi calibrado, entre as corridas das amostras, com o *ladder* dextrana-2AB, (homopolímero de glicose obtido por hidrólise ácida de dextrana, resultando em homopolímeros entre 1 - 22 resíduos de glicose). Após obtenção do perfil do *ladder* de dextrana, se usaram os tempos de retenção dos homopolímeros de diferentes tamanhos do *ladder* para calibrar os valores UG (expressos como unidades de glicose). Em seguida, o tempo de retenção dos picos das glicanas foram convertidos em UG, com ajuda do software Glyco 2 (software criado pelo Dr. Cremata do CIGB, Cuba) específico para esta análise. O valor UG do pico do glicano está diretamente relacionado à estrutura do glicano. Finalmente, os glicanos foram propostos com base nos valores experimentais de UG e nos valores de UG presentes na Glycobase 3.2.4 ([http://glycobase.nibrt.ie/glycobase/show\\_nibrt.action](http://glycobase.nibrt.ie/glycobase/show_nibrt.action)).

#### 4.6.5. Digestões sucessivas com exoglicosidases

Um conjunto de exoglicosidases foi usado para promover digestões sucessivas dos glicanos, que então foram sucessivamente analisados em HPLC para confirmar a seqüência, tipo de monossacarídeos e ligação de resíduos de açúcar. Cada enzima exoglicosidase tem uma especificidade diferente (Figura 15), resultando na perda de um monossacarídeo distinto a partir dos glicanos previamente liberados por PNGase F. As enzimas utilizadas foram as seguintes (com as especificidades entre parênteses): ABS, sialidase de *Arthrobacter ureafaciens* ( $\alpha$ 2-3,6,8 ácido siálico); BKF,  $\alpha$ -fucosidase de rim bovino ( $\alpha$ 1-2,6,3,4); BTG,  $\beta$ -galactosidase de testículos bovinos ( $\beta$ 1-3,4,6); SPG,  $\beta$ -galactosidase de *Streptococcus pneumoniae* ( $\beta$ 1-4); GUH,  $\beta$ -N-acetil-hexosaminidase de *S. pneumoniae* (GlcNAc  $\beta$ 1-2,4,6); JBH,  $\beta$ -N-acetil-hexosaminidase de *Canavalia ensiformis* ( $\alpha$ 1-2,3,4,6); JBM,  $\alpha$ -manosidase de *Canavalia ensiformis* ( $\alpha$ 1-2,6,3). Todas as enzimas foram obtidas da empresa Prozyme (Reino Unido).



**Figura 15.** Especificidade de corte de algumas exoglicosidases. Adaptado de MARIÑO et al. (2010).

#### 4.6.5.1. Preparo da mistura de reação

Seis tubos de 200 $\mu$ L foram preparados para um volume final de 20 $\mu$ L para cada digestão. Foram utilizados 10  $\mu$ L dos glicanos marcados com 2AB para cada digestão a realizar e de uma amostra controle (não digerida). A Tabela 8 lista o conteúdo de cada tubo (volume de enzima, tampão e água ultrapura). O volume total de cada tubo foi de 20 $\mu$ L, exceto na reação com manosidase, que teve um volume total de 24 $\mu$ L. Tampão acetato de só dio 500 mM pH 5.0 foi utilizado para todas as enzimas, exceto para JBM, para qual foi usado o tampão que veio no *kit* com a enzima manosidase.

**Tabela 8.** Preparo da mistura de reação com exoglicosidases.

| Sequência das exoglicosidases | Amostras de glicanos ( $\mu$ L) | ABS Sialidase ( $\mu$ L) | BTG Galactosidase ( $\mu$ L) | JBH Hexosaminidase ( $\mu$ L) | BKF Fucosidase ( $\mu$ L) | JBM Manosidase ( $\mu$ L) | Tampão ( $\mu$ L) | H <sub>2</sub> O ( $\mu$ L) | Total ( $\mu$ L) |
|-------------------------------|---------------------------------|--------------------------|------------------------------|-------------------------------|---------------------------|---------------------------|-------------------|-----------------------------|------------------|
| Não digerido                  | 10                              | 0                        | 0                            | 0                             | 0                         | 0                         | 0                 | 10                          | 20               |
| +ABS                          | 10                              | 1                        | 0                            | 0                             | 0                         | 0                         | 1                 | 8                           | 20               |
| +ABS, BTG                     | 10                              | 1                        | 2                            | 0                             | 0                         | 0                         | 1                 | 6                           | 20               |
| +ABS, BTG, GUH                | 10                              | 1                        | 2                            | 2                             | 0                         | 0                         | 1                 | 4                           | 20               |
| +ABS, BTG, GUH, BKF           | 10                              | 1                        | 2                            | 2                             | 1                         | 0                         | 1                 | 3                           | 20               |
| +JBM                          | 10                              | 0                        | 0                            | 0                             | 0                         | 8                         | 2                 | 4                           | 24               |

Depois de colocar todos os reagentes e amostras nos tubos, as misturas foram homogeneizadas em vórtex e depois centrifugadas rapidamente para que a mistura de reação ficasse no fundo do tubo.

As amostras foram incubadas por 16 horas (*overnight*) a 37°C. Para a amostra JMB, mais 4  $\mu$ L de enzima foi adicionada e incubada à mesma temperatura por mais 18 horas.

#### 4.6.5.2 Remoção das enzimas após digestão

Para a remoção das enzimas foram utilizados dispositivos centrífugos de filtração Amicon Micropure-EZ (Millipore, # 42530). Os filtros foram lavados com 200 $\mu$ L de água ultrapura, depois foram centrifugados a 13000 rpm durante 10 min a 10 °C. 20 $\mu$ L da amostra foram aplicados ao meio do filtro, e os dispositivos foram centrifugados a 13000 rpm por 10 min. Depois, 100 $\mu$ L de água ultrapura foram adicionados ao filtro a modo de recuperar a amostra que podia ter ficado no filtro, e os dispositivos foram centrifugados novamente a 13000 rpm por 10 min a 10 °C. Em seguida, as amostras foram secas em concentrador centrífugo à temperatura ambiente, por aproximadamente 3h. Ao resíduo seco no fundo do tubo, foi adicionado 20 $\mu$ L de

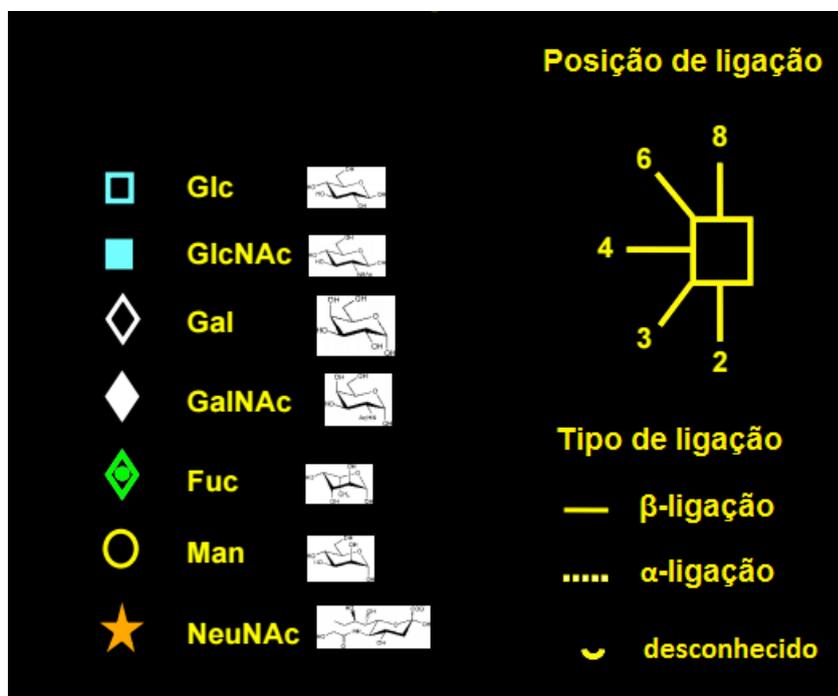
água ultrapura. Uma mistura destes 20µL da amostra mais 80µL de acetonitrila foi preparada, para finalmente injetar 100µL no HPLC. Insetos com capacidade de 150µL (Waters, # WAT094171) foram usados para colocar as amostras.

#### 4.6.6. Nomenclatura dos glicanos

O núcleo comum para o N-glicano complexo, híbrido e alta manose é Man<sub>3</sub>GlcNAc<sub>2</sub>. Para os N-glicanos híbridos, complexos e alta manose, utilizou-se a seguinte nomenclatura:

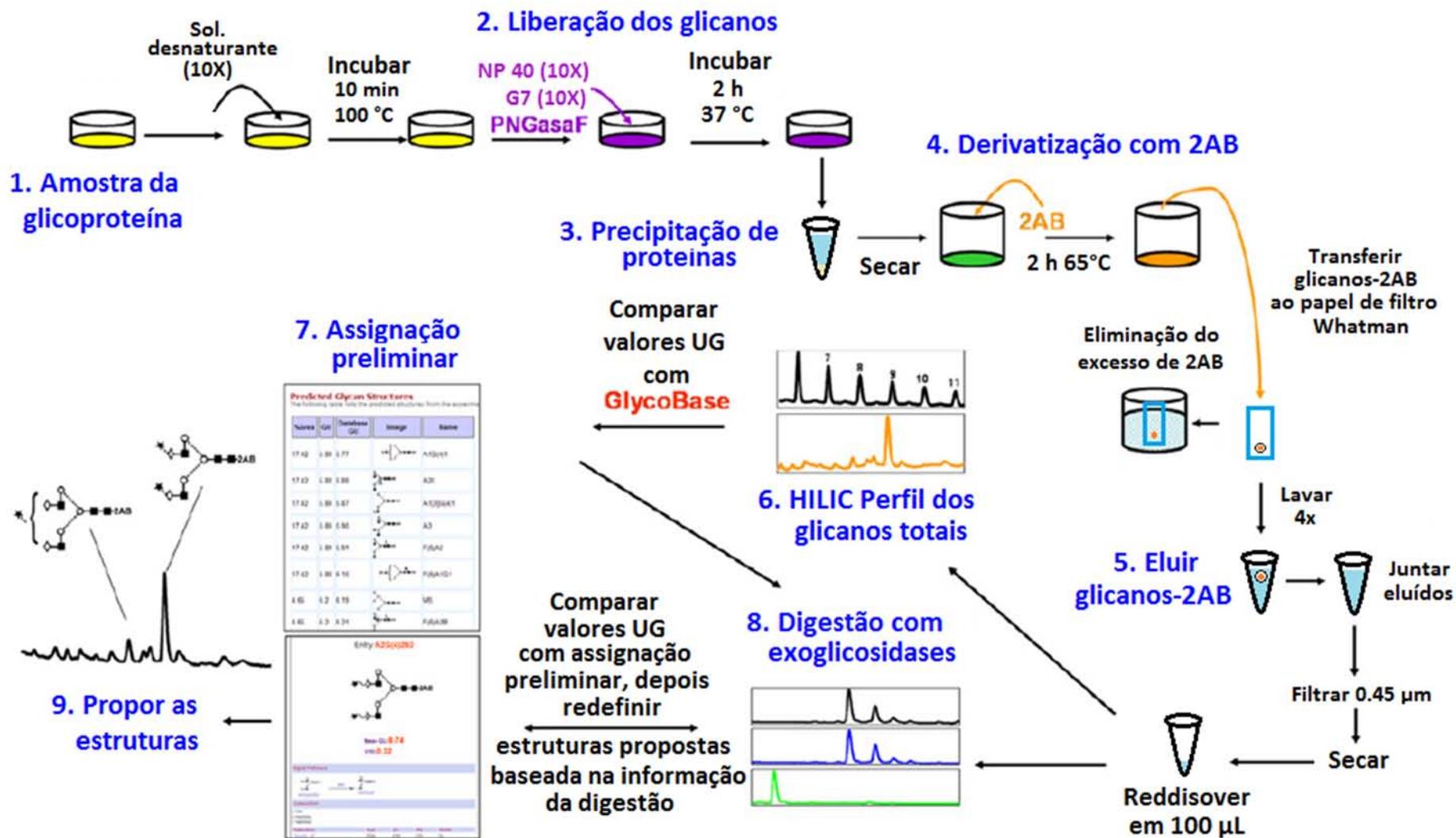
- F, no início da abreviatura indica um núcleo α(1-6) fucose ligada à GlcNAc interna;
- Ax, número de antenas (GlcNAc) no núcleo trimanosilo; A1, monoantênario com uma GlcNAc em uma ligação β(1-2); A2, biantênario com ambas GlcNAcs em uma ligação β(1-2);
- Gx, número (x) de galactoses está numa ligação β(1-4);
- Sx, número (x) de ácidos siálicos ligados à galactose; o número 3 ou 6 entre parênteses após S indica se o ácido siálico está numa ligação α(2-3) ou α(2-6).
- Mx, número (x) de manose no núcleo GlcNAc;

Na Figura 16 pode-se observar a representação simbólica dos diferentes monossacarídeos, informações sobre a posição e o tipo de ligação.



**Figura 16.** Representação simbólica dos monossacarídeos, posição e tipo de ligação. Fonte: BYRNE (2014).

A Figura 17 mostra um resumo das etapas para o preparo das amostras para análise de N-glicosilação, discutidas anteriormente.



**Figura 17.** Preparo das amostras para análise de N-glicosilação: liberação das glicanas com PNGaseF, derivatização com 2AB, análise por HILIC-HPLC para finalmente propor estruturas usando a Glycobase 3.2.4.

#### **4.7. Análise de glicanos por MALDI-TOF/TOF MS**

Os perfis dos glicanos foram adquiridos por MALDI-TOF/TOF MS com ácido 2,5-dihidroxibenzóico como matriz. Para esta análise, as amostras foram descongeladas, já que elas continham restos de reagentes que vieram dos processamentos prévios. Era necessário retirar estes restos para evitar aparição dos contaminantes nos espectros, suprimindo os picos dos glicanos.

##### **4.7.1. Purificação de glicanos não derivatizados usando cartuchos GlycoClean H**

A purificação de glicanos liberados foi realizada utilizando um kit comercial GlycoClean™ H Cartridges (#GKI-4025, Prozyme). O protocolo foi realizado segundo as recomendações do fabricante. O fundamento desta técnica se baseia em que os oligossacarídeos se ligam à matriz, e os sais (contaminantes de natureza não oligossacarídica) passam através da matriz. Depois, nas devidas condições de eluição, os oligossacarídeos são liberados da matriz, enquanto peptídeos, proteínas e detergentes se mantêm unidos à matriz. As amostras de glicanos purificadas desta forma e secas em concentrador a vácuo, foram enviadas para análise no Centro de Espectrometria de Massas de Biomoléculas (CEMBIO), localizado no IBCCF/CCS/UFRJ, para análise por MALDI-TOF/TOF.

##### **4.7.2. Preparo das amostras para análise por MALDI-TOF/TOF MS**

Cada amostra purificada em GlycoClean H, foi solubilizada em 2 uL de água/acetonitrila (1:1). Dessa solução, foi aplicado 0,5 uL em placa, a qual foi seca em dessecador a vácuo. Aplicou-se novamente 0,5 uL no mesmo spot e se aguardou secagem. Depois, adicionou-se 0,3 uL de solução de 2,5-dihidroxibenzóico (DHB) 20 mg/mL em solvente água/acetonitrila (1:1). Como controle negativo, para avaliar sinais oriundos da matriz usada, foi aplicado 0,3 uL da solução DHB em spot vazio e seu espectro foi adquirido. O processamento das amostras foi realizado por Eduardo Matos, responsável por estes experimentos no Centro de Espectrometria de Massas de Biomoléculas (CEMBIO) – IBCCF/CCS.

##### **4.7.3. Aquisição por MALDI-TOF/TOF MS**

As amostras foram analisadas no equipamento Autoflex Speed, da Bruker, configuração MALDI-TOF/TOF. Os espectros foram adquiridos em modo refletor, na polaridade positiva com *range* de 700-3500 e negativa com *range* de 700-4500. Todos os glicanos de interesse foram identificados manualmente, procurando por seus valores m/z. Finalmente, as estruturas foram comparadas com os valores m/z na GlycoBase 3.2.4.

#### **4.7.4. Análise MS/MS**

As amostras foram analisadas por um espectro de varredura (também chamado de análise MS) nas faixas citadas acima, no modo refletor e também foram analisados os espectros de fragmentação (ou análise MS/MS) de alguns picos intensos.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

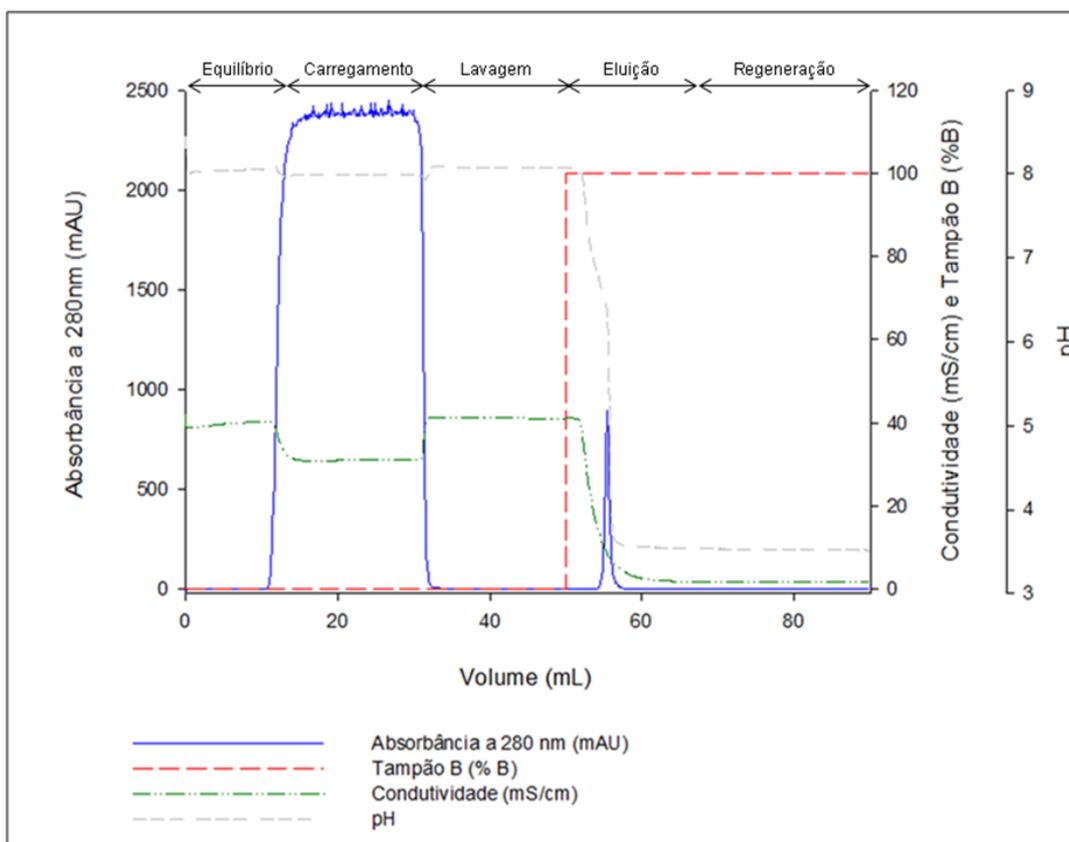
### 5.1. Purificação do mAb

Um dos objetivos do presente trabalho foi purificar o anticorpo produzido por células CHO. A cromatografia de afinidade com proteína A é amplamente utilizada para a purificação de anticorpos monoclonais obtidos pelo cultivo de células animais (BOI; DIMARTINO; SARTI, 2008; CASTILHO; ANSPACH; DECKWER, 2002; MARIA et al., 2015; PEZZINI et al., 2011; SERRATO et al., 2004). É o passo de captura predominante para a purificação de mAbs. Isto é principalmente devido à sua alta seletividade, o que leva a obter alta pureza (SWINNEN et al., 2007). Durante esta fase investigativa, duas metodologias foram escolhidas (CASTILHO; ANSPACH; DECKWER, 2002) e SERRATO et al., 2004), diferido em algumas condições (como tampões) e o rendimento e a homogeneidade das amostras (baseada em SDS-PAGE) foram avaliados para as frações das purificações. Com base nestas duas referências, os tampões para as etapas de adsorção, equilíbrio e eluição foram os indicados na Tabela 9.

Tabela 9. Condições utilizadas para os experimentos realizados com o sobrenadante de cultivo em perfusão.

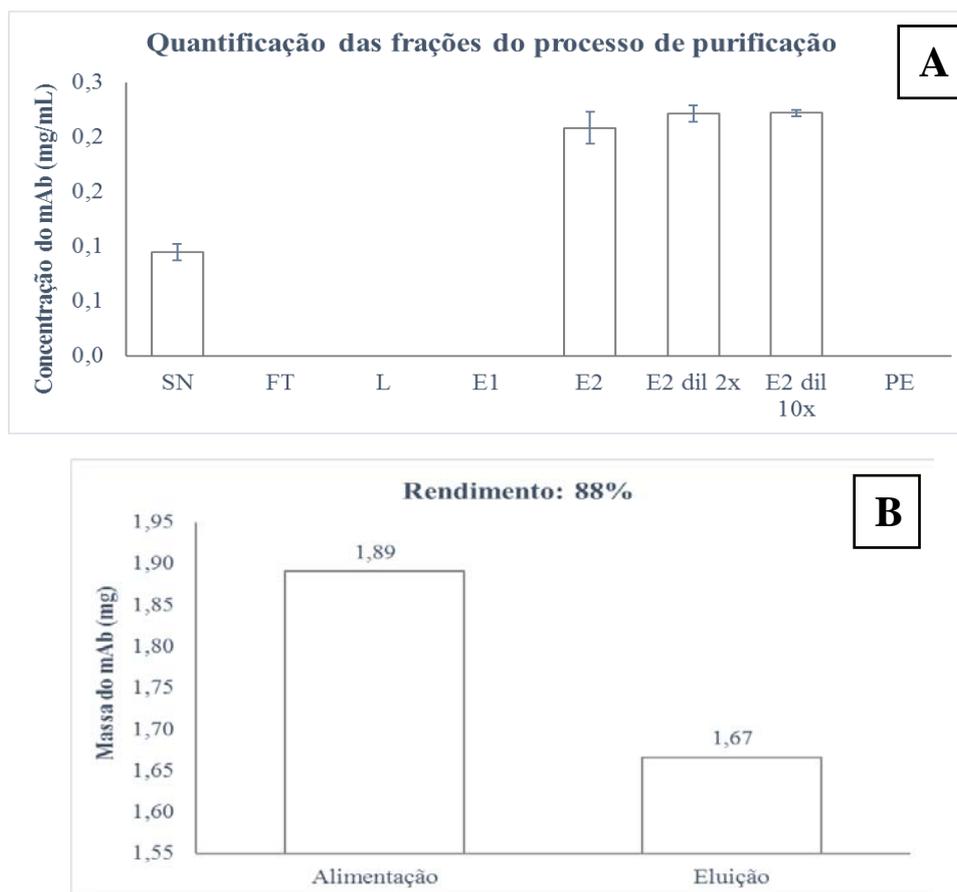
| Métodos                        | Adsorção e Equilíbrio        | Eluição                                      |
|--------------------------------|------------------------------|--|
| Purificação com tampão glicina | PBS, NaCl 0,3 M, pH 7.6      | Tampão glicina - HCl 0,1 M, pH 3.0           |
| Purificação com tampão fosfato | Tampão fosfato 0,1 M, pH 7.4 | Tampão fosfato/ácido fosfórico 0,1 M, pH 3.0 |

A fim de investigar se as duas metodologias eram viáveis, foram testadas ambas estratégias no ÄKTA Purifier. A Figura 18 mostra o cromatograma da purificação segundo tampão glicina. Brevemente, o PBS, NaCl 0.3 M, pH 7.6 foi usado para a equilíbrio, captura e lavagem para remover quaisquer contaminantes fracamente adsorvidos. O tampão glicina - HCl 0,1 M pH 3.0 foi usado para a eluição. Como foi esperado, o decréscimo do pH causou a dessorção do anticorpo, obtendo-se o pico de eluição.



**Figura 18. Resultados da corrida realizada com a coluna de proteína A HiTrap™ MabSelect™ usando tampão glicina.** A injeção da amostra foi realizada no volume = 20 mL. Tampão de adsorção e equilíbrio foi PBS, NaCl 0.3 M, pH 7.6, tampão de eluição foi glicina - HCl 0,1 M pH 3.0.

A agregação de produto é uma preocupação principal durante a eluição de proteínas, particularmente para moléculas que são submetidas a condições de pH baixo. As agregações dos anticorpos a pH ácido são conhecidas porque ocorrem durante a purificação, e devem ser evitadas a fim de que qualquer resposta imunológica indesejável apareça (SHUKLA; GUPTA; HAN, 2007). A adição de excipientes ao tampão de eluição é uma estratégia importante para estabilizar produtos durante a eluição. MARIA *et al.*, (2015) considera que há três caminhos para resolver este problema: (i) neutralizando a fração eluída com 1M de Tris-HCl para aumentar o pH, (ii) adição de arginina ao tampão de eluição e (iii) uso de citrato de sódio como buffer alternativo de eluição. A primeira opção, usando tampão Tris-HCl 1M a pH 9.0, foi adotada no presente trabalho.



**Figura 19. Quantificação por HPLC-Prot A, referente as amostras da purificação com tampão glicina.** (A) Gráfico da concentração do mAb (mg/mL) em cada etapa do processo de purificação, sendo SN: sobrenadante; FT: flowthrough; L: lavagem; E1: primeira fração eluída; E2: mAb eluído; PE: Pós eluição. Os dados estão representados como média e desvio padrão (duplicata experimental). B) Rendimento calculados a partir dos volumes totais tanto da alimentação como na eluição, sendo valores em massa (mg).

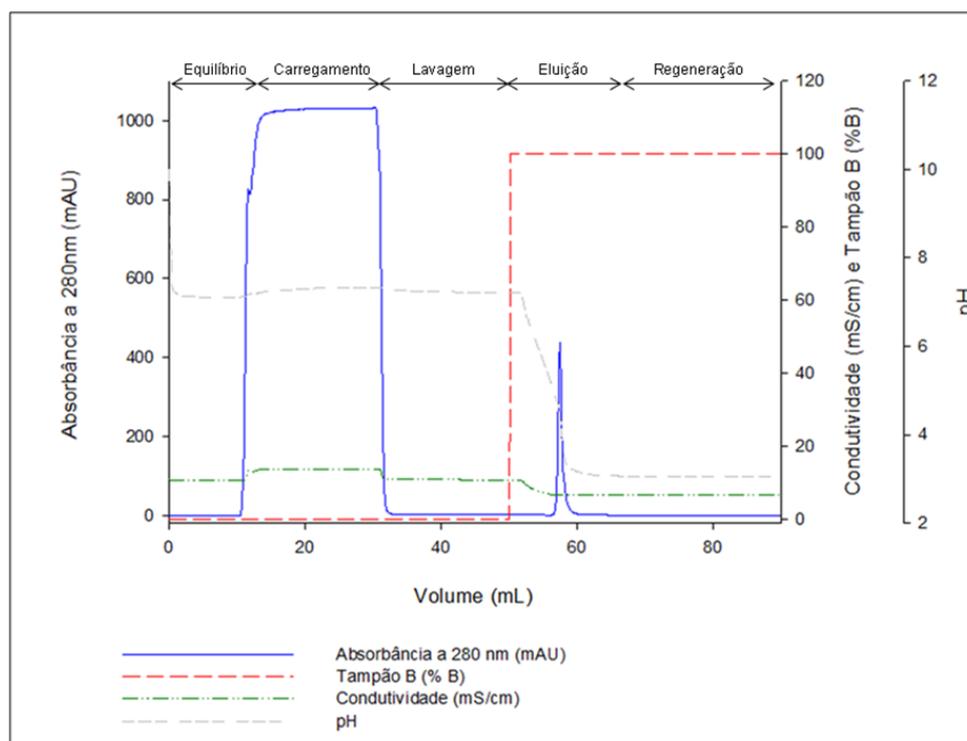
Devido ao efeito da glicosilação, desamidação ou outras heterogeneidades, a pureza absoluta de um produto biotecnológico/biológico é extremamente difícil de determinar. Assim, a pureza de um produto biotecnológico/biológico deve ser tipicamente avaliada por mais de um método e o valor de pureza derivado é dependente do método (ICH, 1995). A Fig 19A mostra a quantificação por HPLC com coluna de proteína A, observou-se que nas frações do *Flowthrough* (FT), lavagem (L), primeira fração eluída (E1) e a fração post eluição (PE) não houve perda do anticorpo de interesse. O anticorpo somente apareceu no sobrenadante (SN) e na eluição (E2).

Na Figura 19B, pode-se observar que o rendimento foi de 88%, utilizando a purificação com tampão glicina. O valor de recuperação alcançado foi inferior a os valores reportados na literatura para a purificação de anticorpos monoclonais, em que são citados valores de 94% (MARIA et al., 2015).

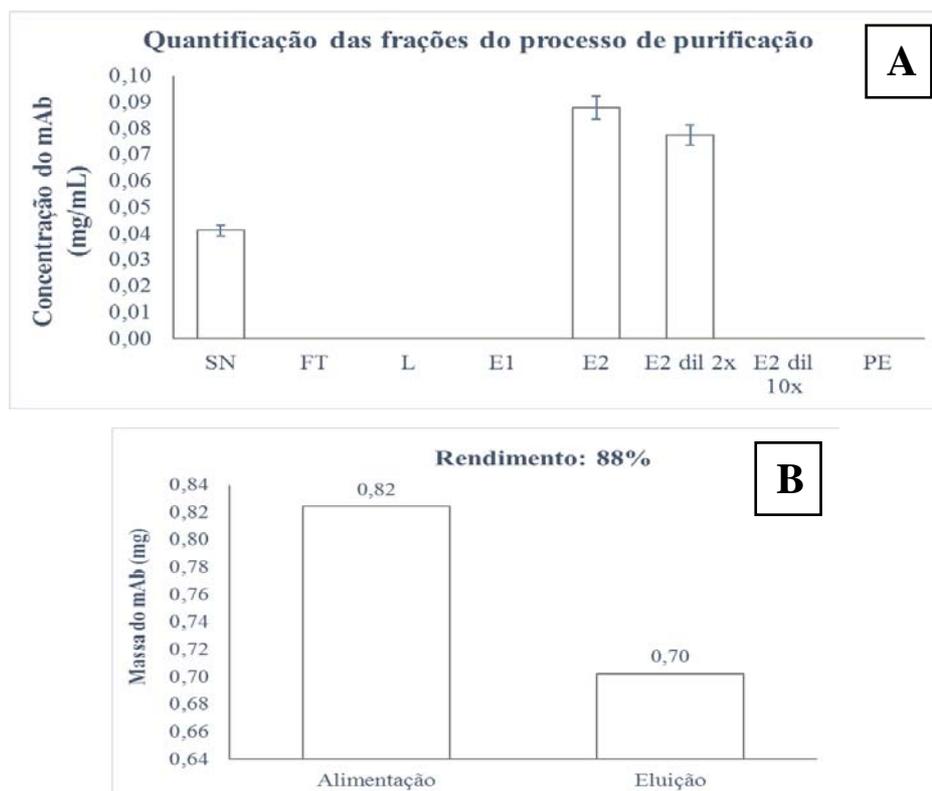
Em relação ao ensaio SDS-PAGE Figura 22, visualizá-se que durante a etapa de carregamento e lavagem, praticamente não há bandas com massas molares acima de

50kDa, indicando que o anticorpo adsorveu devidamente à coluna. Em relação ao perfil eletroforético do pico de eluição do anticorpo (Raia 7) mostra-se livre de várias outras proteínas contaminantes presentes no sobrenadante, as duas cadeias pesada e leve podem ser observadas claramente. Através dos resultados obtidos, pode-se afirmar que a utilização da coluna HiTrap™ MabSelect™ foi bastante eficiente para enriquecimento do anticorpo produzido.

A Figura 20 mostra a purificação usando tampão fosfato, se observa um cromatograma típico de uma corrida realizada sob as condições estabelecidas. Brevemente, 0.1 M de buffer fosfato, pH 7.4 foi usado para o equilíbrio da coluna e adsorção do mAb, depois, 0.1 M de buffer fosfato, pH 7.4 foi usado como buffer de equilíbrio e na etapa de lavagem, para remover quaisquer contaminante fracamente adsorvido. Finalmente, o buffer fosfato 0.1 M / ácido fosfórico, a pH 3.0 foi usado para a eluição. Como esperado apareceu o pico de eluição do anticorpo. Este teve uma área menor, em comparação ao detectado com o método de purificação com tampão glicina na Figura 18.



**Figura 20. Resultados da corrida realizada com a coluna de proteína A HiTrap™ MabSelect™ usando tampão fosfato.** A injeção da amostra do perfundido, foi realizada no volume = 20 mL. Tampão de adsorção e equilíbrio foi de 0.1 M de buffer fosfato, pH 7.4, tampão de eluição foi buffer fosfato 0.1 M / ácido fosfórico, a pH 3.0.



**Figura 21. Quantificação por HPLC-Prot A, referente as amostras da purificação com tampão fosfato.** (A) Gráfico da concentração da anti-IL8 (mg/mL) em cada etapa do processo de purificação, sendo SN: sobrenadante; FT: flowthrough; L: lavagem; E1: primeira fração eluída; E2: mAb eluído; PE: Pós eluição. Os dados estão representados como média e desvio padrão (duplicata experimental). B) Rendimento calculados a partir dos volumes totais tanto da alimentação como na eluição, sendo valores em massa (mg).

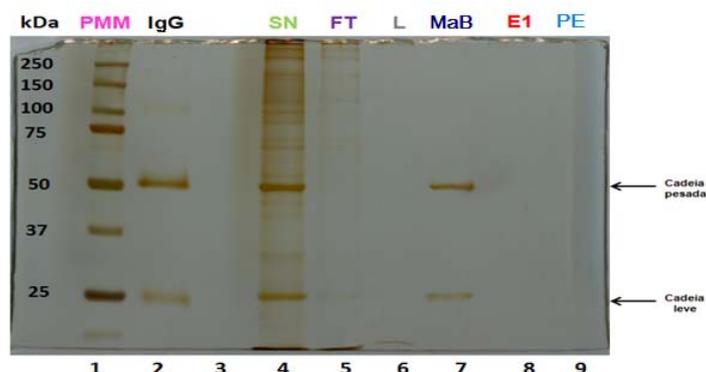
A Fig 21A mostra a quantificação por HPLC com coluna de proteína A, observou-se também que nas frações do *Flowthrough* (FT), lavagem (L), primeira fração eluída (E1) e a fração post eluição (PE) não houve perda do anticorpo de interesse. O anticorpo somente apareceu no sobrenadante (SN) e na eluição (E2).

Na Figura 21B, pode-se observar que o rendimento foi de 88%, utilizando a purificação com tampão fosfato. O mesmo valor determinado para a purificação com tampão glicina.

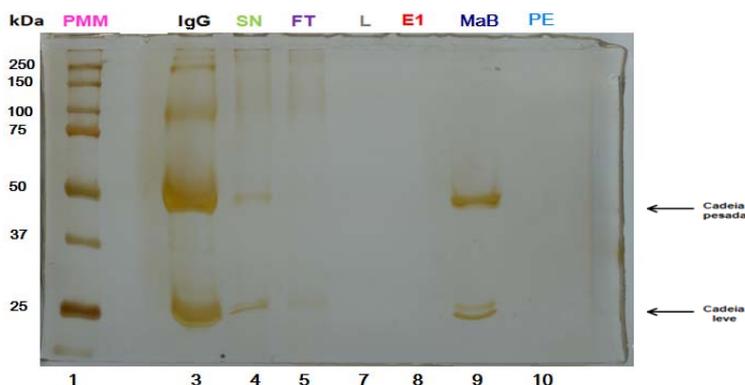
Pode ser proposto, que as variações das concentrações do mAb no sobredanadante do primeiro e segundo lote de perfusão foram devidas à duração do cultivo. No primeiro lote de perfusão uma maior massa de anticorpo (1,89 mg) foi obtida ver Figura 19B, devido a que o período de cultivo foi de 13 dias (incluindo as fases de crescimento exponencial e estacionária), comparado com o segundo lote de perfusão (0,82mg) ver Figura 21B, na qual o cultivo foi interrompido no quinto dia devido a problemas com o biorreator.

## 5.2. Confirmação da massa molecular e da identidade

Os ensaios SDS-PAGE foram utilizados para analisar o perfil eletroforético e a identidade das amostras. O resultado deste ensaio pode ser observado na Figura 19.



**Figura 22. Resultados do ensaio de SDS-PAGE, em condições redutoras, referente às frações da purificação com tampão glicina.** Raia 1: Padrão de massa molecular; raia 2: IgG comercial de referência (controle positivo); raia 4: sobrenadante; raia 5: flowthrough; raia 6: lavagem; raia 7: mAb eluído; raia 8: primeira fração eluída; raia 9: pós eluição.



**Figura 23. Resultados do ensaio de SDS-PAGE, em condições redutoras, referente às frações da purificação com tampão fosfato.** Raia 1: Padrão de massa molecular; raia 3: IgG comercial de referência (controle positivo); raia 4: sobrenadante; raia 5: flowthrough; raia 7: lavagem; raia 8: primeira fração eluída; raia 9: mAb eluído; raia 10: Pós eluição.

Com base nos resultados obtidos, o mAb foi purificado com o método de purificação com tampão glicina e com tampão fosfato ver Figura 22 e 23 respectivamente. O ensaio de SDS-PAGE, em condições redutoras, foi utilizado para analisar o perfil eletroforético e a pureza das amostras. Nossa amostra (mAb eluído) apresentou um perfil com massa molecular similar ao IgG comercial de referência. Em contraste com o sobrenadante (raia 4, pode se observar que o mAb eluído teve uma alta pureza, apresentando somente duas bandas que correspondem a uma cadeia pesada de 50 KDa e uma cadeia leve de 25KDa, típica de uma IgG. Não foram detectadas impurezas associadas ao produto eluído e na fração de post eluição, visto que impurezas não apareceram no gel revelado com nitrato de prata.

**Tabela 10.** Comparação do desempenho e massa do mAb eluido para ambos métodos de purificação.

| Método                         | Massa do mAb eluido (mg) | Rendimento (%) |
|--------------------------------|--------------------------|----------------|
| Purificação com tampão glicina | 1,67                     | 88             |
| Purificação com tampão fosfato | 0,70                     | 88             |

Embora a massa de anticorpo foi maior com a purificação com tampão glicina ver Tabela 10, com este método o eluido deve ser neutralizado com o tampão 1M de Tris-HCL pH 9.0. O que complexa a posterior análise de perfil de glicosilação do anticorpo, já que a condição é que as amostras devem estar em tampão fosfato pH 7.0. Se realizou a troca para tampão de fosfato 50 mM pH 7.0 com ajuda do concentrador Vivaspin® Turbo 2 (*cut off* de 100,000 MWCO, Sartorius). Ao fazer esta troca de tampão se teve perda do anticorpo e isto representou mais uma etapa entre a purificação e a análise de perfil de glicosilação do anticorpo. Ao nosso ponto de vista, a purificação com tampão fosfato permitiu a análise direta, sem perda do anticorpo porque o eluido foi recebido em tampão fosfato 0.1 M, com o qual somente foi necessário neutralizar o pH.

Com base nos resultados obtidos, pode-se afirmar que ambos os métodos são boas opções para a captura do anticorpo monoclonal produzido, possuindo elevado rendimento e elevada pureza.

As subseguintes análises foram feitos com o anticorpo purificado com o método de purificação com tampão fosfato.

### **5.3. Avaliação do perfil de N-glicosilação do mAb**

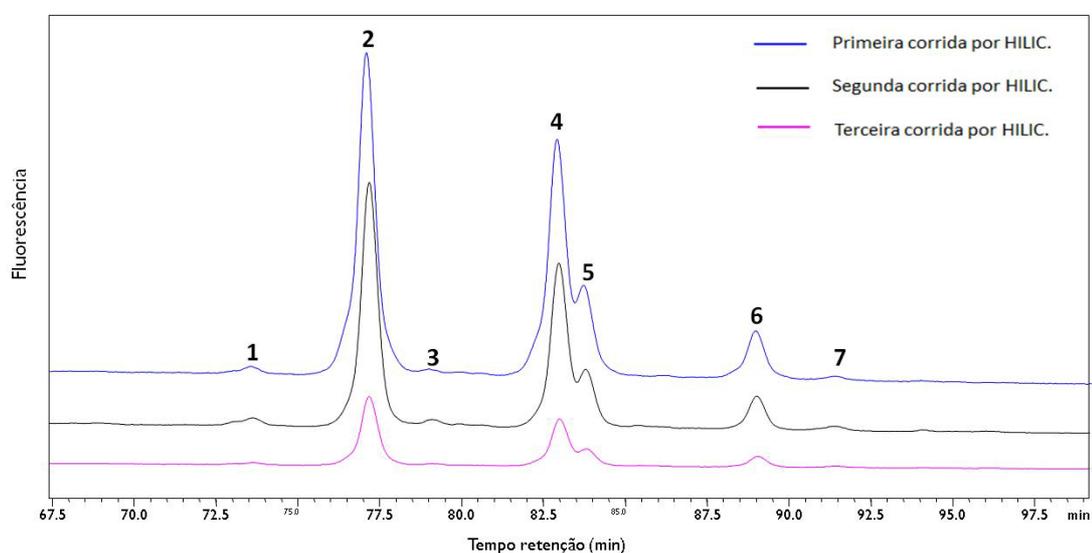
#### **5.3.1. Clivagem das glicanas com PNGase F**

VENKATA e BUTLER (2015) realizaram um estudo de cinética enzimática da ação de PNGase F sobre o anticorpo quimérico EG2-hFc e o anticorpo monoclonal humanizado aIL8-hFc. Usaram uma concentração de 50 U/mL de PNGase F e observaram que, nessa concentração, a velocidade de digestão de N-glicanos do anticorpo EG2-hFc foi pelo menos 4 vezes superior à de aIL8-hFc. Eles propuseram que a presença de cadeias leves na aIL8-hFc tornaria difícil o acesso da enzima para poder clivar os N-glicanos deste anticorpo. Em função disto, aumentaram em 5 vezes a concentração de PNGase F (250 U/mL), com o qual conseguiram aumentar 2 vezes a taxa de digestão de N-glicanos de aIL8-hFc. No protocolo,

utilizaram 1-2 uL de PNGase F e uma incubação de 37°C por 24h. Sabendo que maioria dos mAbs e anticorpos humanos é de tamanho semelhante a aIL8-hFc, espera-se que a atividade da PNGase F mostre uma cinética semelhante. No presente trabalho, foi usado 1 uL de PNGase F 500 U/mL com um tempo de incubação de 2h a 37°C. Estas condições foram adotadas, com uma concentração de enzima elevada, para garantir a liberação dos glicanos. Os N-glicanos foram liberados com êxito e em tempo menor do que reportado na literatura.

### 5.3.2. Análise do perfil global de N-glicosilação do mAb por HILIC-HPLC

Para avaliar o perfil de N-glicosilação do mAb produzido, a análise dos glicanos foi realizada nas amostras de mAb purificados a partir de sobrenadantes de cultivos em perfusão.



**Figura 24. Cromatograma obtido pela análise por HILIC-HPLC de amostra de mAb recombinante anti-IL8.** O tempo de retenção dos picos de glicanos foram comparados com o *ladder* de dextrana marcado com 2-AB para a elucidação estrutural, convertendo o tempo de retenção dos picos em UG. Cada amostra foi analisada em duplicata. Os resultados mostram a reprodutibilidade de três análises independentes sendo linha azul, a primeira corrida; linha preta, a segunda corrida e linha rosa, terceira corrida.

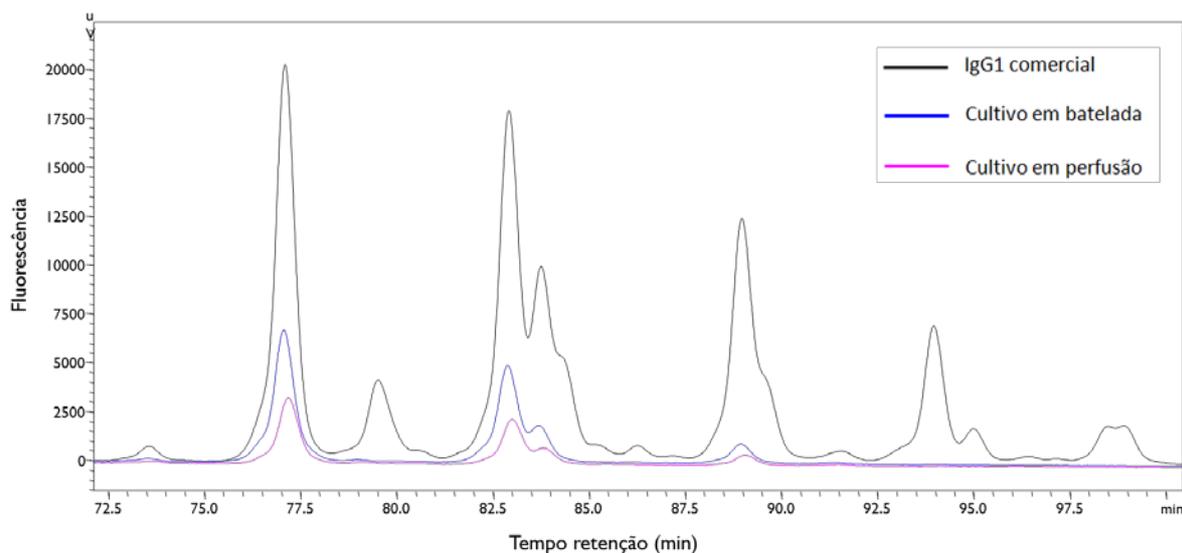
O sistema de HILIC-HPLC permitiu resolver as glicanas com base em sua hidrofília. Este método é rápido, sensível e de alta resolução, e foi desenvolvido para resolver quantidades em femtomoles de misturas de glicanos ácidos e neutros simultaneamente (GUILLE et al., 1996; REUSCH et al., 2016a; ROYLE et al., 2008). Os glicanos derivatizados com 2-AB foram ligados à coluna TSKgel de amida 80 e sucessivamente eluídos com um gradiente de formiato de amônio: acetonitrila. O método demonstrou excelente desempenho respeito à separação das glicanas e foi bem adequado para o propósito da análise de N-glicosilação do mAb. Deve-se ter maior cuidado com o preparo das amostras, já que o processamento foi manual e de várias etapas, teve-se perdas como ocorreu na terceira

amostra (linha rosa) ver Figura 24. Embora, a detecção das glicanas logo da derivatização com 2-AB é conhecida por ser muito sensível (REUSCH et al., 2016a) conseguiu-se observar a reprodutibilidade das três corridas e os 7 picos foram detectados.

Em termos de análise de glicanos, o processo metodológico aqui descrito proporcionou um excelente desempenho na separação de glicanos da fracção de anticorpo de proteína, proporcionando perfis de glicano bastante limpos e sem contaminação cruzada.

O método também foi testado para N-glicanos isolados a partir de IgG policlonais de soro humano comercial como controle positivo ver Figura 25, as amostras foram sujeitas a liberação das N-glicanas e derivatizadas como foi descrita na Secção de Materiais e Métodos 4.6. Obteve-se o perfil total de N-glicanos pelo método de HILIC-HPLC. Como se observa o perfil da IgG comercial (linha preta) mostra N-glicanas que tem correspondência com os picos das N-glicanas da amostra purificada vinda do cultivo em perfusão (linha rosa).

Avaliou-se também o efeito do modo de operação. Usou-se uma amostra cultivada no modo batelada e após de ser purificada, as glicanas foram liberadas e derivatizadas com 2-AB. Esta amostra mostrou ter 7 picos (linha azul), os mesmos que aparecem no modo de perfusão (Figura. 25). Com o qual pode-se observar que o perfil de N-glicosilação do mAb produzido por ambos modos de operação não teve diferenças. Isto pode ser explicado pelo fato de que, uma mesma linhagem celular foi usada para ambos cultivos e possivelmente as condições de cultivo celular foram otimizadas de modo a atingir o mesmo perfil de glicosilação do mAb. Com isso a heterogeneidade do mAb foi minimizada assegurando assim a qualidade do mesmo. Normalmente, as alterações na glicosilação devido às condições de cultura estão limitadas à expressão relativa de glicofomas fora de um conjunto de estruturas característico de um certo local de glicosilação de uma proteína dada. A fim de manter a qualidade do produto é essencial compreender os parâmetros que causam variação na glicosilação macro e micro-heterogeneidade. As condições do processo que afetam a glicosilação de proteínas são semelhantes às que afetam outras atividades celulares tais como crescimento e taxa de produção específica (BYRNE, 2014).

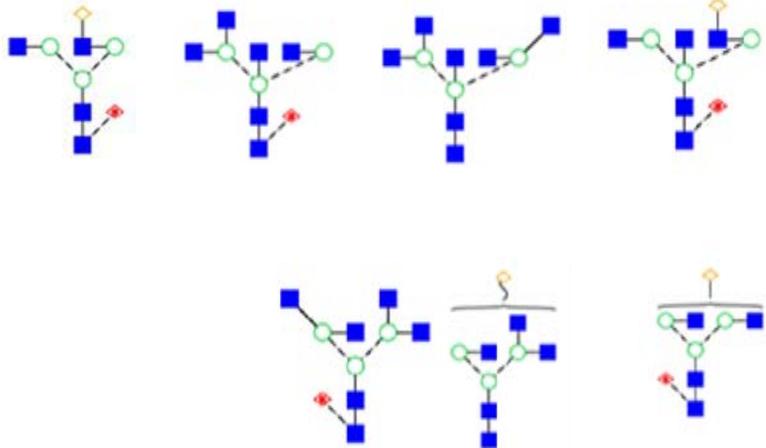
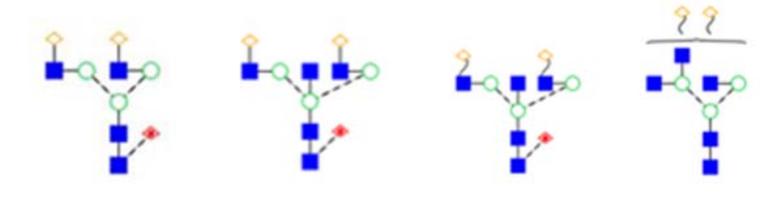
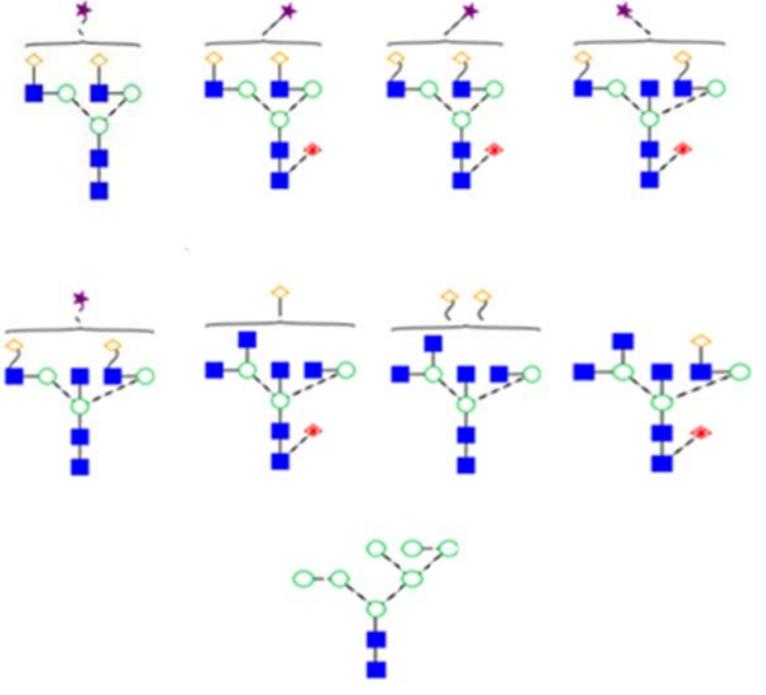


**Figura. 25.** Avaliação do padrão de N-glicosilação de uma IgG comercial e amostra cultivada no modo batelada.

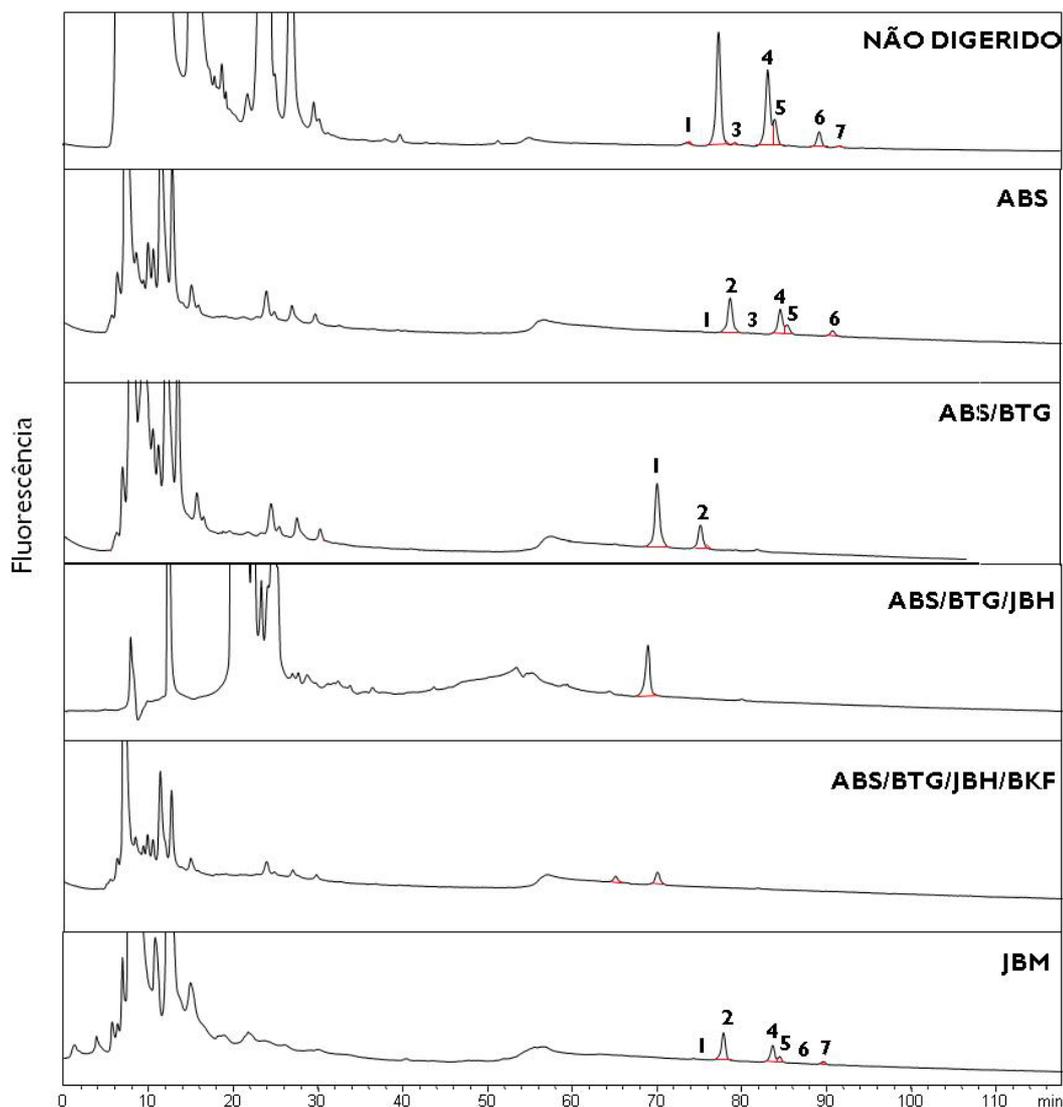
Uma vez que se teve certeza que estes 7 picos se apresentaram na amostra, se fez a conversão de tempo de retenção para UG e se procurou na Glycobase 3.2.4, com o qual se obteve 35 estruturas prováveis, ver Tabela 11.

**Tabela 11:** Possíveis N-glicanas representadas por nomenclatura, estruturas preliminares. Estruturas com a mesma composição, mas tempos de migração diferentes são isômeros. As estruturas são agrupadas de acordo com a sua composição e baseiam-se usando as UG segundo os dados depositados na Glycobase 3.2.4.

| Pico | Estrutura proposta | UG        |
|------|--------------------|-----------|
| 1    |                    | 5.57±0.0  |
| 2    |                    | 5.98±0.04 |
| 3    |                    | 6.24±0.04 |
| 4    |                    | 6.77±0.08 |

|   |  |           |
|---|--|-----------|
| 5 |    | 6.88±0.0  |
| 6 |   | 7.68±0.04 |
| 7 |  | 8.06±0.0  |

A análise HILIC das glicanas tratadas com exoglicosidase, descrito na secção Materiais e Métodos 4.6.5, resultou na perda de uma estrutura de glicano a qual perdeu o monossacárido para a qual a enzima utilizada foi específica. O primer cromatograma representa a amostra não digerida. Depois as amostras foram sucessivamente submetidas a uma série de enzimas de exoglicosidasas: ABS removeu o ácido siálico ligado  $\alpha 2$  -3, BTG removeu a galactose ligada a  $\beta 1$ -3 e  $\beta 1$ -4, JBH removeu GalNAc, BKF removeu a fucose ligada a 1-3 ou 4 e a JBM removeu  $\alpha 1$ -2-,  $\alpha 1$ -3- e  $\alpha 1$ -6- manose. No caso do pico 7 que sugere-se ser um glicano sialilado ao usar a sialidase, claramente houve uma perda deste pico no cromatograma correspondente a ABS. Quando usamos as enzimas ABS e BTG no (cromatograma ABS/BTG) comparando com o controle (não digerido) se observou a perda dos picos 4, 5 e 6 o qual nos levou a pensar que se trataria de glicanos mono e digalactosilados. No caso da enzima mannosidase esta confirmou a presença de glicanos alta manose, já que somente ela foi adicionada à amostra. Foram comparados o cromatograma JBM com o cromatograma não digerido, e se observou uma perda do pico 3, com o qual sugeriu-se que se tratava de um glicano alta manose. Nota-se que com JBH e BKF apareceram picos que seriam o núcleo do glicano. Os produtos de cada digestão foram resolvidos pelo método HILIC-HPLC ver Figura 26. Os picos são identificados pelos números definidos na Tabela 11.

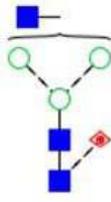
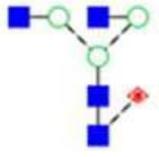
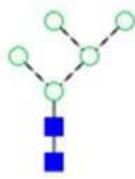
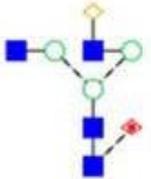
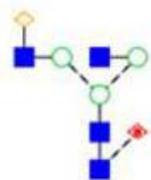
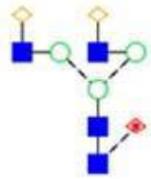
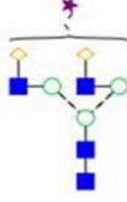


**Figura. 26. Análise com exoglicosidases.** Os N-Glicanos foram liberados, marcados com o fluoróforo 2-aminobenzamida (2-AB) e analisados por HILIC-HPLC.

Para os métodos baseados em HILIC-HPLC, o uso de tempos de retenção ou valores de UG sozinhos não são os suficientes para identificar a estrutura das glicanas. Por esta razão (GUILLE et al., 1996) sugeriram o uso de digestão enzimática com as exoglicosidases para confirmar as estruturas das glicanas com os valores de UG obtidos na análise previa de perfil de N-glicosilação.

Como resultado do tratamento com exoglicosidases das glicanas liberados e da utilização de GlycoBase 3.2.4., foram descartadas varias estruturas da Tabela 11, para finalmente propor as estruturas e a ligações das unidades de monossacáridos dos seguintes glicanos:

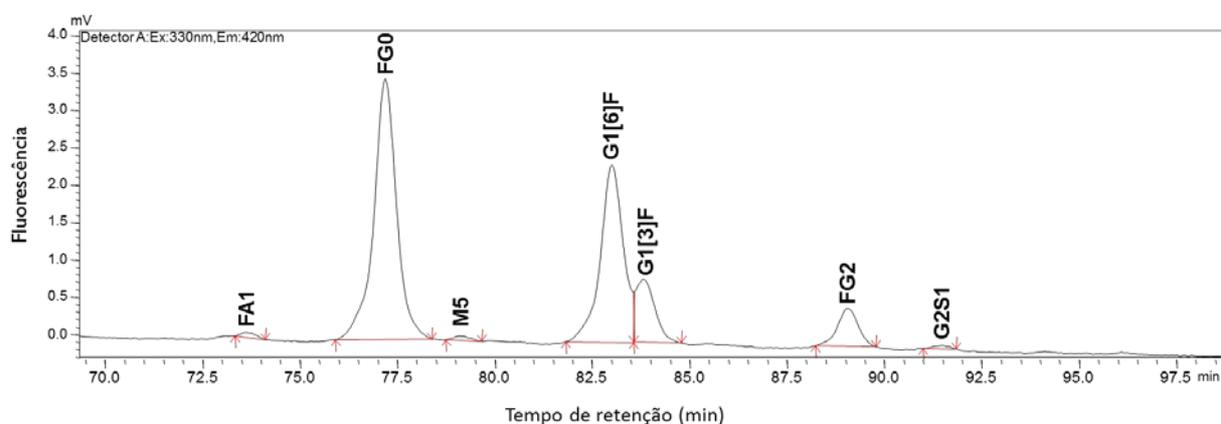
**Tabela 12.** N-glicanas propostas representadas por nomenclatura, estruturas propostas dependendo dos valores de UG segundo a Glycobase 3.2.4

| Pico | Nomenclatura               | Estrutura Proposta  | UG        | Abundância relativa (%) |
|------|----------------------------|---|-----------|-------------------------|
| 1    | F(6)A1                     |    | 5.57±0.0  | 0.7±0.04                |
| 2    | F(6)A2<br>(G0F)            |    | 5.98±0.04 | 48.6±0.32               |
| 3    | M5                         |   | 6.24±0.04 | 0.6±0.11                |
| 4    | F(6)A2[6]G(4)1<br>(G1[6]F) |  | 6.77±0.08 | 33.3±0.10               |
| 5    | F(6)A2[3]G(4)1<br>(G1[3]F) |  | 6.88±0.0  | 10.0±0.11               |
| 6    | F(6)A2G(4)2<br>(G2F)       |  | 7.68±0.04 | 6.4±0.04                |
| 7    | A2G2S1<br>(G2S1)           |  | 8.06±0.0  | 0.4±0.00                |

Os dados apresentados na Tabela 12, correspondem às abundâncias relativas de cada glicano apresentados como média  $\pm$  ds de três corridas independentes por amostra, confirmando que as glicanas mais abundantes foram as espécies fucosiladas G0F, G1[6]F, G1[3]F e G2F.

Alguns parâmetros podem afetar a posição da eluição incluindo o tipo de resíduo do monossacarídeo além do ambiente individual do monossacarídeo dentro do glicano, que leva em conta a especificidade e ligação da antena. A conformação dos açúcares também desempenha um papel, uma vez que a adição de monossacáridos a uma estrutura existente pode alterar a contribuição dos resíduos protegendo as suas superfícies hidrofílicas ou hidrofóbicas acessíveis.

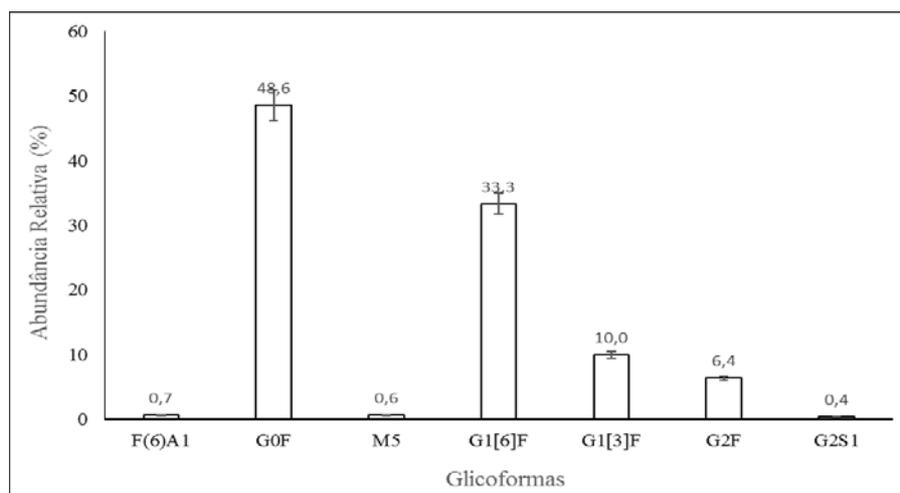
Como se mostra na Figura 27, este método permitiu a diferenciação de isômeros com o braço superior ( $\alpha$ 1,6) vs. braço inferior ( $\alpha$ 1,3) galactosilados, ambos com núcleo -fucosilado G1[6]F e G1[3]F. A asiguação dos picos das espécies monogalactosiladas foi deduzida a partir da Glycobase: o pico com o braço ( $\alpha$ 1,6) eluiu antes do pico com o braço ( $\alpha$  1,3) nas três análises realizadas. Os métodos baseados em HILIC-HPLC separaram quase todas as espécies; somente as espécies G1[6]F e G1[3]F coeluíram. Em geral, os picos de glicanos foram muito bem separados, resultando em excelente desempenho quantitativo (Tabela 12). Estes resultados estão acorde com GUILLE et al., (1996) que mencionaram que o sistema HILIC-HPLC consegue diferenciar entre a adição de  $\beta$ -galactose à antena  $\alpha$ 1,3 ou  $\alpha$ 1,6 do complexo biantenário do glicano.



**Figura 27. Perfil de N-glicosilação obtido por HILIC-HPLC.** Glicanas propostas que foram finalmente confirmadas pela análise de exoglicosidases. Cada amostra foi analisada em duplicata. Os resultados mostram a reprodutibilidade de três análises independentes.

As glicanas propostas no presente trabalho, mostradas na Figura 27, são coerentes com os resultados de obtidos por VENKATA e BUTTLER (2015), eles usaram a mesma linhagem (CHO-DP12, ATCC # CRL-12445) produtora de anticorpo, e obtiveram seis

estruturas (G0, FG0, M5, FG[6]1, FG[3]1 e FG2). No presente trabalho, também detectamos FG0, M5, FG[6]1, FG[3]1 e FG2 e a diferença do perfil obtido por VENKATA e BUTTLER (2015) obtivemos também as glicanas FA1 e G2S1. A explicação para estas diferenças entre ambos perfis de glicosilação, sendo a mesma linhagem CHO-DP12 pode ser devido às diferenças nas condições de cultivo (tempo de cultivo, meio de cultivo, glicosiltransferases, modo de operação). O que fez uma produção temprana da glicana híbrida FA1 e no caso da glicana G2S1 do tipo complexa para chegar a ser sialilada teve que passar um período de maturação maior no aparelho de Golgi das células CHO.



**Figura 28.** Abundância relativa das diferentes glicofomas presentes nas amostras do mAb purificadas vindas do cultivo em perfusão, detectadas utilizando HILIC após liberação de PNGaseF e marcação 2-AB. Cada amostra foi analisada em duplicado. Os dados estão representados como média e desvio padrão (triplicata técnica).

Na Figura 28., a forma mais temprana de N-glicosilação do mAb é designada por M5. A abundância relativa mais elevada de glicanos presentes nas amostras do mAb foram as glicofomas de tipo complexo sem galactose G0F. As glicofomas galactosiladas são denotadas por G1[6] F e G1[3] F, que contêm 1 unidade de galactose em qualquer dos braços GlcNAc externos e G2F que contêm um resíduo de galactose em cada um dos braços GlcNAc exteriores. Das glicofomas galactosiladas presentes, a G1[6] F foi a forma predominante em todas as análises. O glicano de menor abundância relativa foi o glicano sialiado A2G2S1.

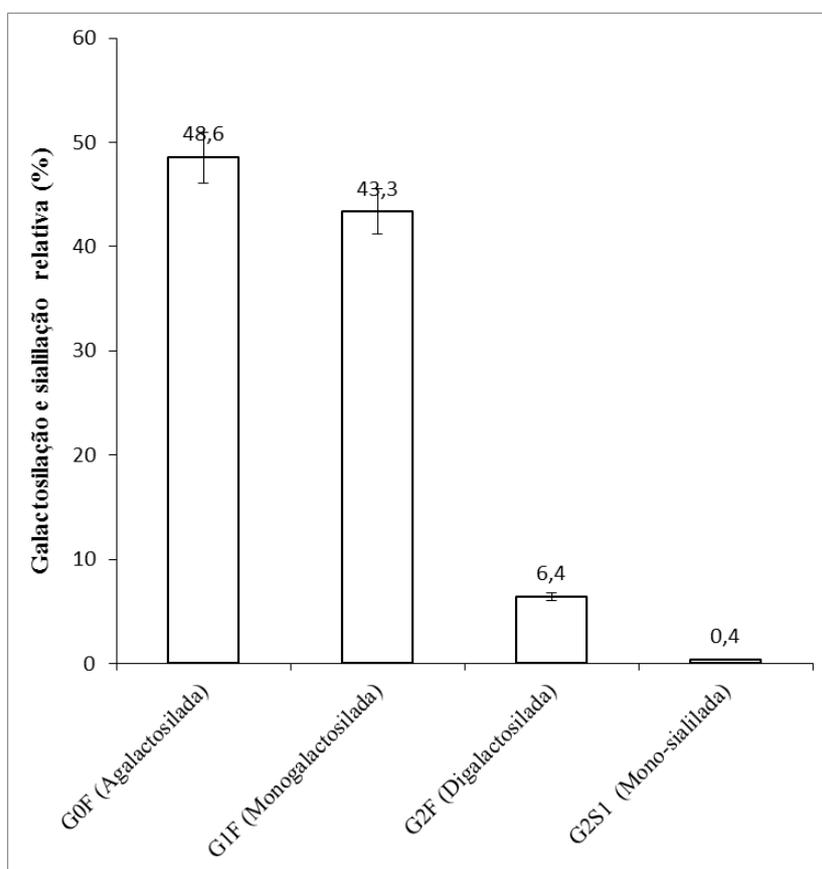
É evidente que não houve diferença significativa nas tendências das glicofomas identificadas no mAb a partir de cada uma das três amostras processadas ver Tabela 11. No entanto, a abundância relativa de cada tipo de glicofoma presente indica diferenças nos níveis de glicosilação neste lote de perfusão.

A Figura 28 mostra a abundância relativa 0,7 % de F (6) A1, glicofoma precoce, presente na amostra. De forma semelhante, obteve-se uma porcentagem relativo baixo da

glicofoma M5, 0.5%. Resultados coerentes com a literatura, onde se menciona que os anticorpos IgG produzidos em células de mamíferos contêm geralmente níveis baixos de glicofomas de alta manose (Man 5-9), tipicamente abaixo de 5% (REUSCH et al., 2016a) M5 é a primeira glicofoma resultante da N-glicosilação do mAb. Ele surge como resultado do recorte precoce de glicano na membrana do retículo endoplasmático (RE). Os níveis mais baixos de M5 presentes em amostras do mAb produzido por perfusão, indica que ocorreu nestas culturas um nível mais elevado de processamento de glicano de tipo complexo (BYRNE, 2014) obteve alta % relativa de M5 devido a concentrações elevadas de amoníaco inicial no cultivo de um anticorpo o qual teve um impacto no processamento de glicanos complexos. Por outro lado, se sabe que o conteúdo Manose 5/8/9 no mAb, pode ter um impacto significativo sobre a PK da molécula, reduzindo potencialmente a exposição, levando a um menor eficácia (REUSCH; TEJADA, 2015).

O processamento incompleto de N-glicanos pode resultar em glicoproteínas contendo estruturas de alta manose e híbridas, que podem desencadear uma resposta imunitária. Por conseguinte, deve-se ter cuidado para controlar o conteúdo de glicanos imunogénicos em proteínas terapêuticas para evitar potencial imunogenicidade.

Neste trabalho a abundância relativa das espécies mono-galactosiladas fucosiladas foi de 33,3% para (G1[6] F), 10% para (G1[3] F), determinou-se que a quantidade relativa de G2F fucosilada duplamente galactosilada foi de 6,4% para (G2F) e 0,4% para (G2S1). O que foi coerente com os resultados de DIETMAR et.al, (2015) que obteve 32,7% (G1[6] F), 10,8% (G1[3] F) e 9,5% para (G2F) com o mesmo método HILIC-2AB. Sabe-se que a presença de galactose como açúcar terminal em N-glicanos de IgG aumenta a sua actividade CDC pelo que estes resultados poderíamos sugerir que nosso anticorpo vai apresentar a actividade CDC.



**Figura 29.** Nível de galactosilação relativa das glicofórmulas G0F, G1F, G2F e G2S1. Estas glicofórmulas foram detectadas utilizando HILIC após liberação de PNGaseF e marcação 2-AB. Cada amostra foi analisada em duplicado. Os dados estão representados como média e desvio padrão (triplicata técnica).

A importância e o efeito da glicosilação de anticorpos monoclonais em relação à actividade biológica é amplamente discutido e tem sido investigado em numerosos estudos (HOUDE et al., 2010; LIU, 2015; REUSCH; TEJADA, 2015; SATOH; IIDA; SHITARA, 2006; SHIELDS et al., 2002; THOMANN et al., 2015). A glicosilação de anticorpos monoclonais a partir dos sistemas de produção actuais, está sujeito a variabilidade na produção de lote a lote. Se houver alterações de glicosilação entre lotes diferentes, estas alterações são observadas não apenas para uma, se não para várias espécies de glicanos (WACKER et al., 2011). Portanto, o estudo de diferentes espécies de glicanos, tais como estruturas galactosiladas e sialiladas, é desafiador devido à falta de diferenças bem definidas nos padrões de glicosilação. No presente trabalho, foram detectadas quatro variantes de glicano a partir do material de partida: uma variante agalactosilada, que compreende (predominantemente G0F), uma variante monogalactosilada (G1F), uma variante digalactosilada (G2F) e uma variante mono-sialilada (G2S1), ver Figura 29.

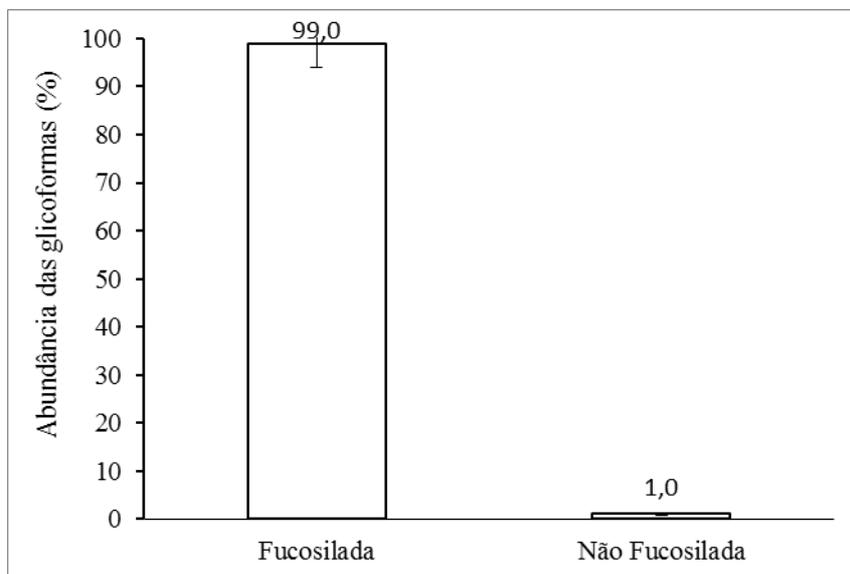
No anticorpo produzido, o processamento de glicano complexo resultou na adição de um resíduo de ácido siálico a um dos resíduos de galactose presentes em G2F resultando

numa glicofoma G2S1. BYRNE (2014) obteve a abundância relativa mais elevada de glicofomas sialiladas a concentrações da L-GLN 4 mM e 12 mM, em comparação com um cultivo com 0 mM da L-GLN. Sugerindo assim, que a GLN parece ser essencial para o processamento de glicanos complexos, em particular em relação à sialilação. No nosso estudo o nível de sialilação no mAb foi de 0,4%, a abundância mais baixa das glicofomas. Sugerimos assim que para estudos posteriores se deveria ter um controle das concentrações da L-GLN, já que este aminoácido seria necessário para a sialilação das glicanas.

Para galactose, os efeitos são controversos com base em diferentes estudos disponíveis (REUSCH; TEJADA, 2015). Vários relatórios concluem que diferentes níveis de galactosilação não influenciam a actividade do ADCC (THOMANN et al., 2015). No entanto, a correlação positiva entre galactosilação e ligação de RFIa também foi observada em múltiplos estudos. Vários relatórios indicam que um grau elevado de galactosilação promove uma ligação aumentada a C1q conduzindo a uma activação aumentada do sistema do complemento e da actividade de CDC (HODONICZKY; YUAN; JAMES, 2005). Foram observados efeitos semelhantes FORAM OBSERVADOS NO anticorpo terapêutico glicoengenhado *in vitro*, embora a CDC não seja considerada uma actividade relevante *in vivo* (BECK et al., 2008). Vários relatórios indicam que a extensão da galactosilação terminal não afecta o ADCC em anticorpos IgG1 padrão (BOYD; LINES; PATEL, 1996; HODONICZKY; YUAN; JAMES, 2005; SHINKAWA et al., 2003). Outro relatório descobriu que a galactosilação terminal tem um efeito positivo na ligação de RFIa (HOUDE et al., 2010). THOMANN et al. (2015) demonstraram o aumento da actividade ADCC pela hipergalactosilação enzimática de quatro anticorpos monoclonais diferentes, que foram produzidos utilizando processos de produção padrão para células CHO. Demonstraram também que níveis elevados de galactose terminal não têm efeito sobre o ADCC de dois anticorpos terapêuticos glicoengenhadados (THOMANN et al., 2015), indicando que a extensão à qual a galactose terminal modula o ADCC depende mais do nível da afucosilação.

A actividade anti-inflamatória da imunoglobulina tem sido repetidamente ligada à sialilação da Fc, o que pode levar a uma diminuição da actividade de ADCC e, em alguns casos, afectar a ligação do alvo. O ácido siálico terminal influencia a ligação ao receptor Fcγ e a actividade anti-inflamatória ou a citotoxicidade celular dependente de anticorpos em diferentes estudos por ligação reduzida do anticorpo sialilado para FcγRIIIa (LIU, 2015). No entanto, também existem estudos que não mostram influência do ácido siálico sobre as interações FcγR. No presente trabalho a quantidade de glicano sialilado foi a mais baixa 0,4% detectada por HILIC-HPLC, que é coerente com a literatura (REUSCH et al., 2016a). De existir uma quantidade significativa de glicanos sialilados, a ADCC seria um mecanismo

fundamental do anticorpo terapêutico. Por tanto, este seria um atributo crítico de qualidade a tomar em consideração.



**Figura 30.** Abundância relativa das glicofórmulas fucosiladas e não fucosiladas. Detectadas utilizando HILIC após liberação de PNGaseF e marcação 2-AB. Cada amostra foi analisada em duplicado. Os dados estão representados como média e desvio padrão (tríplica técnica).

Como se mostra na Figura 30, a soma das espécies fucosiladas teve uma média de 99%. Por outro lado, a soma das espécies não fucosiladas, que é um importante parâmetro para a função efetora do anticorpo, teve uma média de 1% na análise por HILIC-HPLC. Como foi discutido na seção Anticorpos afucosilados como Próxima Terapêutica para a tratamento de Câncer, trabalhos futuros poderiam utilizar alguns métodos como a eliminação da fucosiltransferase 8 (FUT8) em células CHO ou a superexpressão de -N-acetilglicosaminiltransferase III (GnTIII) para conseguir aumentar a porcentagem das glicofórmulas não fucosiladas, aumentando notoriamente a atividade *ADCC* do nosso anticorpo.

#### 5.4. Análise de glicanas por MALDI -TOF/TOF MS

Todos os mAbs são N-glicosilados pelo menos na região conservada Fc. A análise de glicosilação pode ser conseguida em dois níveis: glicopéptidos e níveis de glicanas livres.

### 5.4.1 Análise dos glicopéptidos

A análise de glicopeptídeos por EM permite a análise de glicosilação sitio-específico. Se houver mais de um sitio de glicosilação, a análise de glicopeptídeos poderia fornecer informações específicas de glicopéptido em sitios diferentes (FUKUTA et al., 2013; JEFFERIS, 2005; MARINÑO et al., 2010; WANG, 2012), não obstante esta análise não esteve dentro do escopo do trabalho.

### 5.4.2. Análise de glicanas livres

A análise de glicanas proporcionou o perfil de glicanos do mAb. Os N-glicanos foram liberados enzimaticamente, usando a PNGase F, enzima comum para a clivagem dos N-glicanos. MALDI-TOF/TOF MS é uma abordagem amplamente utilizada para a determinação de perfil das glicanas liberadas directamente ou numa forma derivatizada. No entanto, a identificação de glicanos por MALDI-TOF/TOF MS é baseada na massa detectada e não é utilizada a separação. Portanto, isómeros de glicanos com massa idêntica, tais como isómeros G1, não podem ser diferenciados por esta técnica. Adicionalmente, as glicanas neutras (G1) teriam que ser analisados por HILIC-HPLC e as glicanas ácidas (G2S1) precisariam de um preparo adicional da amostra por exemplo permetilação, para que o ácido siálico possa ser detectado.

### 5.4.3. Propondo as estruturas

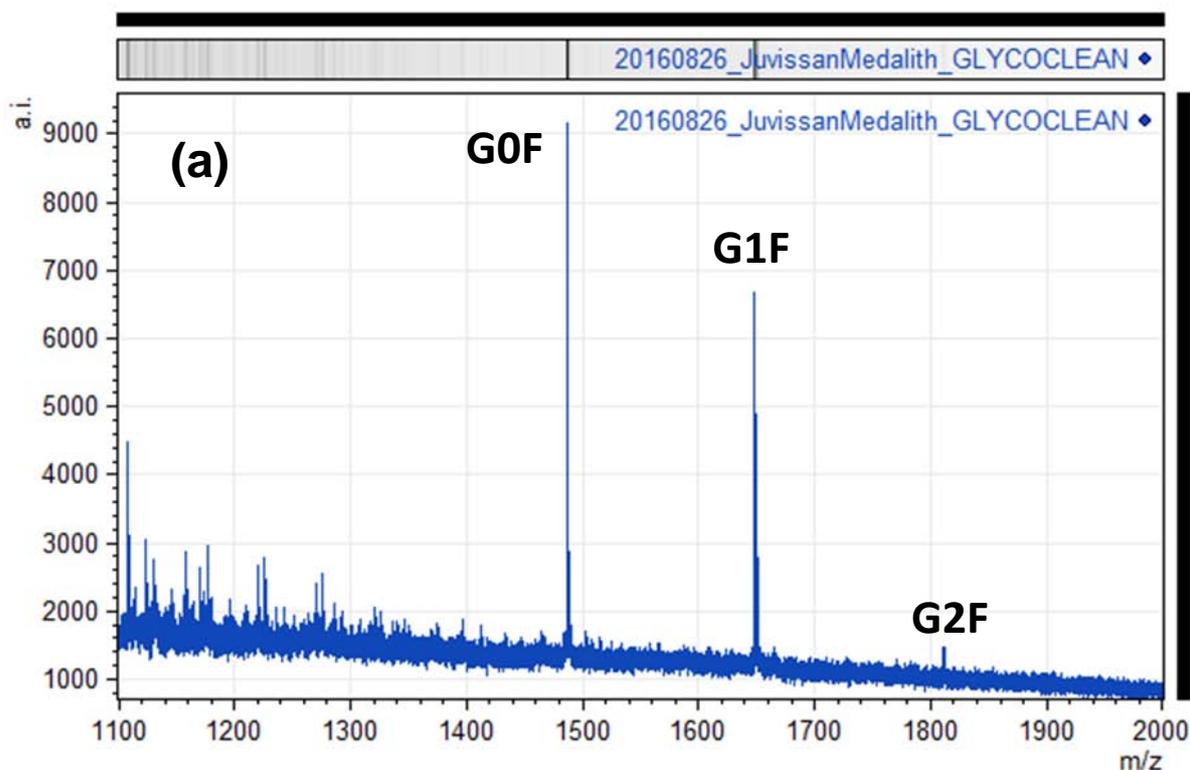
A atribuição de picos para os métodos baseados em MS foi feita com base na composição molecular de cada monossacárido e na caracterização estrutural anterior, incluindo o método cromatográfico. As massas moleculares esperadas das glicanas foram confirmadas com a Glycobase.

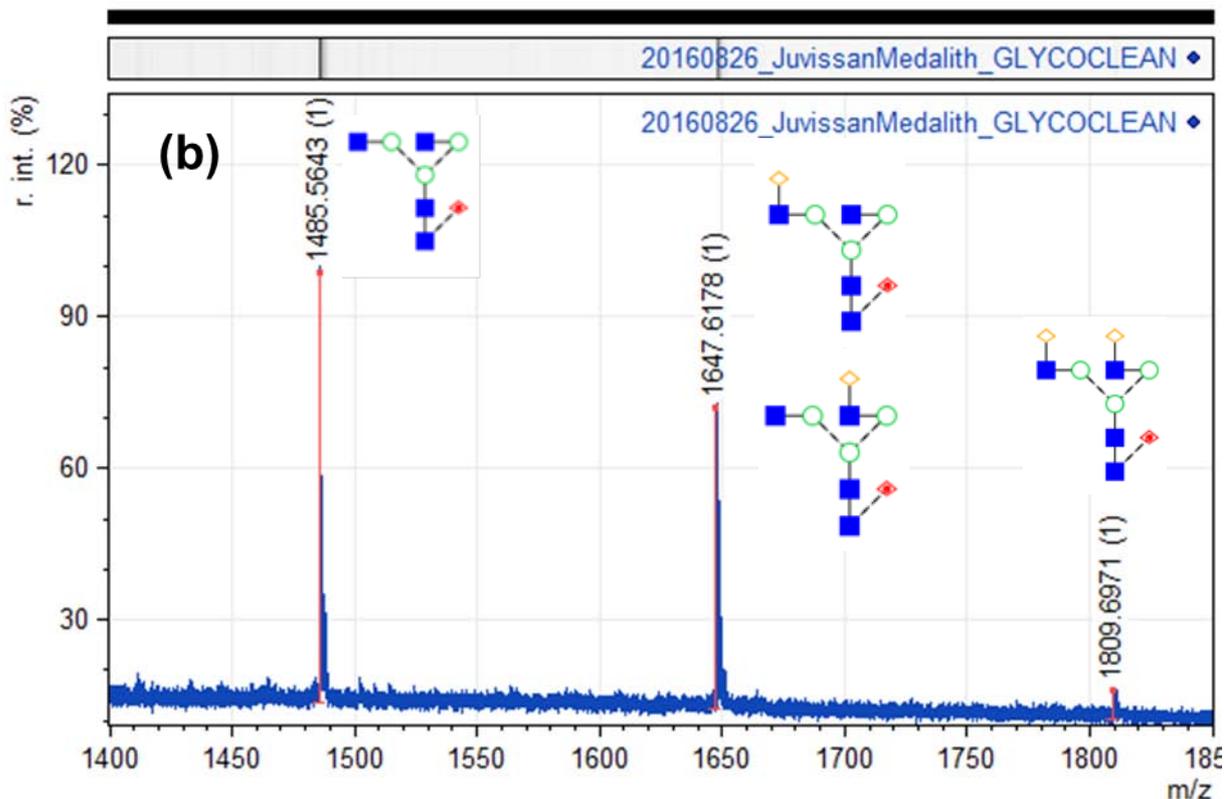
O método MALDI-TOF/TOF MS facilitou a detecção das principais espécies de Fc de N-glicanos que são tipicamente encontrados em mAbs IgG terapêuticos produzidos em células de ovário de hamster chinês (CHO) (G0F, G1F, G2F, G0, G1 e M5; ver Tabela 5). O método de referência HILIC-HPLC permitiu a identificação de 7 picos com diferenciação entre espécies monogalactosiladas com galactosilação ligada ao braço superior ( $\alpha$ 1,6) versus ao braço menor ( $\alpha$ 1,3), como foi mostrado anteriormente. Em contraste com HILIC-HPLC assim como outros métodos de separação cromatográfica, os métodos de detecção baseados em EM intrinsecamente não permitem a distinção entre os isómeros monogalactosilados (REUSCH et al., 2016b). Por esta razão, não foi possível quantificar separadamente as 2 espécies monogalactosiladas. Devido a isto a soma dos 2 picos monogalactosilados isoméricos foi levada em consideração para fins de quantificação relativa.

O método mostrou alguns picos menores adicionais na faixa  $m/z$  de 1100 a 1300, que não puderam ser identificados como glicanos. A ocorrência destes picos não pôde ser explicada, e esta poderia ser uma desvantagem potencial do método para utilização em glicoanálise de uma amostra desconhecida. Além disso, o fato de que este tipo de análise não é rotineiramente executado no laboratório não se teve certeza que estes picos se tratariam de glicanos. Aachamos que com o desenvolvimento do método, isso pode ser evitado.

A detecção de glicanos de baixa abundância não foi o foco deste estudo. No entanto, sabe-se que com os métodos LC-MS, análise de glicopéptidos por MALDI-MS e glicanos estabilizados por MALDI-MS, algumas espécies de glicanos abaixo do limite de quantificação podem ser detectados (REUSCH et al., 2016b).

No presente trabalho, usando o método MALDI-TOF/TOF MS foram detectados 3 picos principais com massas correlacionando a G0F, G1F e G2F como as glicanas mais abundantes, ver Figura 31.





**Figura 31.** MALDI TOF/TOF Espectro dos N-glicanos do anticorpo realizado em ion modo positivo. (a) Intensidade absoluta m/z faixa de 1100-2000. (b) Intensidade relativa m/z faixa de 1400-1850, atribuição dos íons são mostrados.

Para a obtenção da massa isotópica foram restados -23 Da a cada glicana devido ao aduto de  $[M + Na +]$  presente em cada pico. A Tabela 13 mostra os valores de m/z obtidas experimentalmente na primeira coluna, a segunda coluna mostra os valores de massas isotópicas descontando os -23 Da do aduto de  $[M + Na +]$ , na terceira coluna se detalham os valores de massa isotópica segundo a Glycobase. Como podemos observar os valores da segunda e terceira coluna foram similares. Após a correlação destes dados com a Glycobase se propuseram as glicanas que aparecem na quarta coluna.

No caso da glicana sialilada G2S1 não foi possível detectá-la por este método. Uma explicação para isto seria que não foi detectada devido a que esta foi fragmentada durante o processo de ionização, por isso na tabela foi representada como n.d., não detectada.

**Tabela 13.** Valores em m/z das principais glicofomas detectadas, valores sem massa íon sódio, valores na Glycobase e glicanas propostas.

| Valores Experimentais m/z | Valores m/z -23 Da ([M+Na] <sup>+</sup> ) | Valores da massa Isotópica (Glycobase) | Glicanas Propostas |
|---------------------------|---|--|--------------------|
| 1485,6                    | 1462,6                                    | 1462,5                                 | FG0                |
| 1647,6                    | 1624,6                                    | 1624,6                                 | FG1                |
| 1809,7                    | 1786,7                                    | 1786,7                                 | FG2                |
| n.d.                      | n.d.                                      | 1931,7                                 | G2S1               |

n.d.: não detectada

A análise do ácido siálico por EM é desafiadora porque a ionização pode ser diferente em comparação com glicanos neutros. Além disso, as glicanas contendo ácido siálico são ainda mais propensas à fragmentação do que as glicanas neutras, o que resulta em decaimento na fonte ou metaestável. Por isso, os ácidos siálicos são frequentemente removidos antes da análise por EM e medidos separadamente, por exemplo, por HPLC de fase inversa com detecção de fluorescência (RP-HPLC-FLD) ou por cromatografia de troca aniônica de elevado desempenho com detecção amperométrica pulsada (HPAEC-PAD) (REUSCH et al., 2016b).

SANCHEZ-DE MELO et al., (2015) recomendou que as glicanas sialiladas podem ser analisados no modo íon negativo linear, isto significaria que as glicanas neutras não poderiam ser detectados ao mesmo tempo. As análises no modo íon negativo linear também foram realizadas no presente estudo, mas a glicana sialilada não foi detectada (resultados não mostrados). No mesmo estudo, SANCHEZ-DE MELO et al., (2015) recomendou fazer uma permetilação como estratégia de derivatização, para estabilizar a carga negativa de resíduos sialicos, convertendo-os em ésteres metílicos. Evitando assim a perda de ácido siálico enquanto melhora significativamente a eficiência da formação de íons positivos, isto permitiria analisar simultaneamente oligossacarídeos neutros e sialilados no íon modo positivo. Este método também tem a vantagem de ser possível quantificar glicanos contendo ácido siálico e distinguir entre ácidos siálicos ligados  $\alpha$ 1,3 e  $\alpha$ 2,6 (REUSCH et al., 2016b). Esta poderia ser uma alternativa para poder detectar a espécie sialilada G2S1. No entanto, requer um processo de preparação de amostras mais sofisticado e demorado.

Por outro lado, no presente estudo as espécies de N-glicanos mais e menos abundantes presentes no mAb puderam ser detectadas e quantificadas utilizando o método MALDI-TOF/TOF MS. Para o qual, se estimou a abundância das glicanas de seguinte forma:

as abundâncias relativas das glicanas foram determinadas pelas suas intensidades de pico, foi feita uma normalização da proporção de cada um dos três picos detectados. Considerou-se o primeiro pico FG0 (100) por ser o pico com maior intensidade, depois se obteve a proporção para o segundo pico FG1 (70,33) e o terceiro pico FG2 (6,57), como se mostra na primeira e segunda coluna da Tabela 14.

**Tabela 14.** Valores em m/z das principais glicofomas liberadas do mAb.

| Glicanas Propostas | Proporção normalizada (%) | Valores Experimentais m/z | REUSCH <i>et al.</i> , (2016) m/z |
|--------------------|---------------------------|---------------------------|-----------------------------------|
| FG0                | 100,00                    | 1485,6                    | 1485,5                            |
| FG1                | 70,33                     | 1647,6                    | 1647,6                            |
| FG2                | 6,57                      | 1809,7                    | 1809,7                            |
| G2S1               | n.d.                      | n.d.                      | n.d.                              |

n.d.: não detectada.

No estudo de REUSCH *et al.*, (2016) utilizaram MALDI-TOF MS para detectar e quantificar as glicanas de uma IgG terapêutica, utilizaram PGNase F para liberar as glicanas, os espectros foram obtidos no modo positivo e foram adquiridos numa faixa m/z de 1000 a 2000. Os dados apresentados na quarta coluna da Tabela 14 foram fornecidos gentilmente pelo autor. Como podemos observar na Tabela 14, os dados experimentais de m/z obtidos no presente estudo foram similares a os dados fornecidos pelo autor. É assim que conseguimos confirmar mais uma vez que as estruturas propostas tratam-se de FG0, FG1 e FG2.

Realizou-se também a análise das glicanas provenientes da IgG comercial, no entanto, a reprodutibilidade dos espectros de massa gerados foi baixa, se teve muito *background* da matriz. Não foi possível obter os espectros para a baixa faixa de massa que ia se estudar.

Embora a análise MALDI-TOF/TOF MS tenha sido utilizada principalmente para confirmar as estruturas moleculares detectadas pelo método HILIC-HPLC, as intensidades de pico das glicanas indicaram uma abundância relativa semelhante às observadas por cromatografia líquida, de acordo com os estudos prévios (FUKUTA *et al.*, 2013; JEFFERIS, 2005, 2009, REUSCH *et al.*, 2016a, 2016b; SANCHEZ-DE MELO *et al.*, 2015; VISSER *et al.*, 2013).

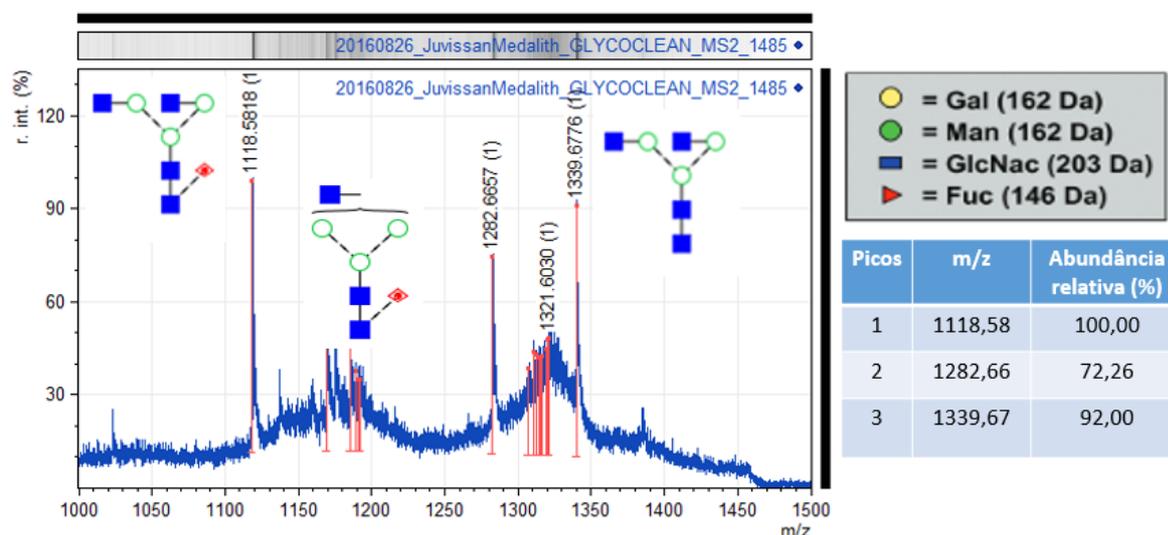
Ao fazer uma comparação entre ambas metodologias estudadas MALDI-TOF/TOF MS e HILIC-HPLC, poderíamos discutir que para as principais estruturas de glicanos, as quantidades relativas determinadas pelo método baseados em espectrometria de massas teve coerência com os valores obtidos com o método HILIC-HPLC. Com HILIC-HPLC, as

espécies G0F apresentaram uma abundância relativa média de 48,6%. Verificou-se que este valor era mais elevado para MALDI-TOF/TOF MS, 100%. A soma das espécies G1F foi encontrada com uma abundância relativa de 43,3% com HILIC-HPLC. Este valor foi encontrado o segundo maior para MALDI-TOF/TOF MS, 70,33%. Determinou-se que a intensidade relativa da espécie G2F fucosilada com duas galactoses era de 6,4% por HILIC-HPLC. A abundância determinada com MALDI-TOF/TOF MS foi quase próxima com uma quantidade de 6,57%. A estrutura sialilada G2S1 foi encontrada com uma abundância relativa de 0,4% com HILIC-HPLC. Conforme discutido na secção anterior, a detecção e, por conseguinte, a quantificação das estruturas de glicano sialiladas não foi possível com o método MALDI-TOF/TOF MS.

Em relação ao glicano M5, a abundância relativa média foi de 0,6% detectada com HILIC-HPLC. Com MALDI-TOF/TOF MS, não podia ser quantificada e, por conseguinte, não podia ser quantificada. A abundância relativa media do glicano F (6) A1 foi de 0,7% com HILIC-HPLC, e ele não foi detectado por MALDI-TOF/TOF MS devido a baixa abundância que foi suprimida pelo ruído da matriz. Porém, para a detecção e quantificação de todas as outras glicanas, o método MALDI-TOF/TOF MS é muito adequado, sendo os resultados muito comparáveis aos do método de HILIC-HPLC.

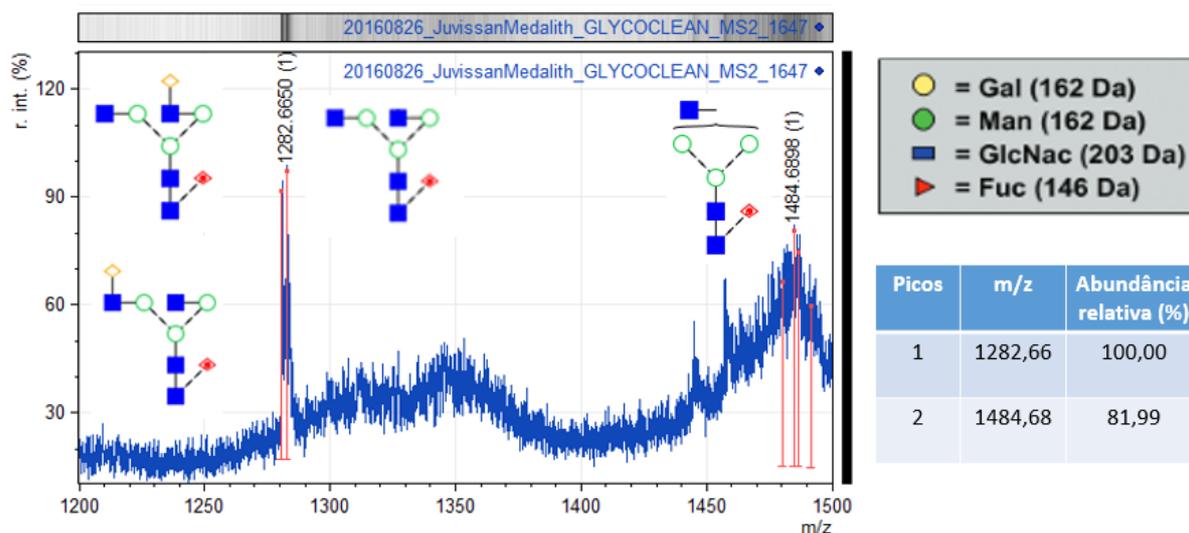
#### 5.4.4. Análise MS/MS

O processo de fragmentação de um íon por MALDI-TOF/TOF é chamado de MALDI-PSD. O íon fragmenta após incidência do laser e aceleração para o tubo de vôo, de forma que os fragmentos voam juntos, com mesma velocidade. Estes são filtrados de outros por um "ion gate" e são novamente acelerados por diferença de potencial. Esta nova aceleração faz com que os fragmentos possam se separar em um segundo vôo, passando pelo refletor e sendo direcionado para o detector.



**Figura 32.** Análise MS/MS do pico G0F m/z 1486.

Foi realizada a fragmentação à estrutura G0F, de m/z 1485. Obteve-se um pico de 1339,67 o qual perdeu 146 Da o que indicaria a perda de uma molécula de fucose de sua estrutura, o segundo pico de m/z de 1282,66 teve uma perda de 203 Da o que se correlacionaria com a perda de uma GlcNac. A aquisição foi feita numa faixa de m/z 1000-1500. Do lado direito da Figura 32 foram calculadas as abundâncias relativas, tomando em consideração que o pico com maior intensidade seria 100%, sendo assim o segundo pico teria uma abundância de 72,26% e o terceiro pico 92%.

**Figura 33.** Análise MS/MS ao pico G1F m/z 1648.

Foi realizada a fragmentação da estrutura G1F, de m/z 1647. Obteve-se um pico de 1484,68 o qual perdeu 162 Da isto teria uma correlação com a perda de uma galactose; o segundo pico de m/z de 1282,66 teve uma perda de 203Da o que se correlacionaria com a perda de uma GlcNac. A aquisição foi feita numa faixa de m/z 1000-1500. Do lado direito da Figura 33 foram calculadas as abundâncias relativas, tomando em consideração que o pico com maior intensidade seria 100%, sendo assim o segundo pico teria uma abundância de 81,99%.

Com a análise MS/MS realizada aos picos 1485 e 1647, corrobora-se que os picos de interesse se tratariam das estruturas G0F e G1F.

Em princípio, o método baseado em MALDI-TOF/TOF MS é bem sensível (attomoles). Porém, o que pode prejudicar a sensibilidade é a condição da amostra ou a labilidade do analito, isto pode potencialmente mostrar uma limitação porque a sensibilidade

é dependente da transferência de iões. Não obstante, isto pode ser resolvido utilizando padrões internos adequados.

O método baseado em MALDI-TOF/TOF MS é adequado para a caracterização parcial do perfil de glicosilação em um mAb. No entanto, o método tem que ser validado e isto é um grande desafio atual na indústria biofarmacêutica (REUSCH et al., 2016b).

## **6. CONCLUSÕES E SUGESTÕES**

### **6.1. Conclusões**

- A purificação por cromatografia de afinidade com proteína A, pode ser usada para fornecer o mAb, com uma alta pureza diretamente do cultivo células CHO DP12 recombinantes de produzido por perfusão.
- Através das técnicas utilizadas no presente trabalho: clivagem das glicanas com PNGase F, marcação dos mesmos com 2-aminobenzamida, digestões com exoglicosidases e análise por cromatografia de interação hidrofílica (HILIC) com coluna de fase normal, permitiram avaliar o perfil de N-glicosilação do anticorpo monoclonal.
- Sete estruturas foram propostas de acordo com os dados depositados na Glycobase 3.2.4.
- As glicofomas mais abundantes G0F (48,6%), seguida por G1F (43,3%), seguida por G2F (6,4%) e G2S1 (0,4%) detectados e quantificados por HILIC-HPLC foram confirmados pela técnica de MALDI TOF/TOF MS. Esta técnica confirmou esta distribuição de glicofomas e mostrou que as massas das glicanas principais eram como esperadas (1485,6 Da para G0F, 1647,6 Da para G1F e 1809,7 Da para G2F).
- Ambas as estratégias HILIC-HPLC e MALDI TOF/TOF MS proporcionaram dados complementares e de suporte da composição do perfil de N-glicosilação.
- Também proporcionaram uma estimativa da abundância das glicanas do mAb estudado, portanto, podiam ser considerados como métodos de rotina para a detecção e quantificação de qualquer micro-heterogeneidade de N-glicosilação em amostras de anticorpos monoclonais.

- Nossos dados indicaram que o perfil de glicosilação foi consistente com as principais glicofomas presentes nos anticorpos monoclonais terapêuticos.

## 6.2. Sugestões

- ✓ Outros ensaios analíticos como quantificação de HCPs e DNA residual devem complementar os dados de pureza do anticorpo monoclonal.
- ✓ Quantificação dos agregados após eluição do anticorpo monoclonal devem ser feitos em estudos posteriores.
- ✓ Variando as condições do gradiente, tampões e testando colunas com tamanho de poro 3 $\mu$ m no sistema HILIC-HPLC, pode-se reduzir o tempo de análise e melhorar a separação das glicanas de particular interesse. Pode-se otimizar o método para que possa ser separado o pico 4 e 5, estruturas F (6)A2[6]G(4)1 e F(6)A2[3]G(4)1 respectivamente.
- ✓ O método HILIC-HPLC é altamente reprodutível com as devidas configurações do HPLC, porém, pequenas variações podem acontecer e, portanto, deve ser calibrado com padrões de açúcares para determinar valores precisos de UG dos monossacarídeos.
- ✓ É geralmente aceite que a espectrometria de massas não permite a quantificação real de oligossacarídeos, estudos futuros poderiam incorporar análogos marcados com isótopos estáveis como padrões internos.
- ✓ Deve-se investigar o impacto da amônia sobre as atividades das células de mamíferos no cultivo. Isto pode influenciar na heterogeneidade das glicanas do mAb, a maioria das publicações relatam o impacto negativo particularmente na qualidade do produto.
- ✓ No paradigma atual, a glicosilação de proteínas é tipicamente monitorada pós-colheita e purificação. Futuros trabalhos deveriam desenvolver um sistema para observar e compreender as mudanças na glicosilação em tempo real ao longo da duração de um cultivo. Assim poderiam ajudar a desenvolver processos mais robustos que proporcionem produtos de qualidade consistente.

- ✓ Estudos posteriores poderiam incluir a dosagem de glicosiltransferases.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BECK, A. et al. Trends in glycosylation, glycoanalysis and glycoengineering of therapeutic antibodies and Fc-fusion proteins. *Current pharmaceutical biotechnology*, v. 9, n. 6, p. 482–501, 2008.
- BECK, A.; REICHERT, J. M. Marketing approval of mogamulizumab: A triumph for glyco-engineering mAbs, 2012.
- BECK, A.; SANGLIER-CIANFE, S. Biosimilar, Biobetter, and Next Generation Antibody Characterization by Mass Spectrometry. *Analytical chemistry*, v. 84, p. 4637–4646, 2012.
- BETTINARDI, I. W. Desenvolvimento De Estratégias De Alimentação Com Meios Concentrados Para Cultivo De Células Animais Em Perfusão. *Coppe/Ufrj*, v. 1, 2016.
- BOI, C.; DIMARTINO, S.; SARTI, G. C. Performance of a new protein A affinity membrane for the primary recovery of antibodies. *Biotechnology Progress*, v. 24, n. 3, p. 640–647, 2008.
- BOYD, P. N.; LINES, A. C.; PATEL, A. K. the Effect of the Removal of Sialic Acid , Galactose and Total Carbohydrate on the Functional Activity of Campath-I H. *Molecular Immunology*, v. 32, n. 17118, p. 1311–1318, 1996.
- BUNNAK, P. et al. Life-cycle and cost of goods assessment of fed-batch and perfusion-based manufacturing processes for mAbs. *Biotechnology Progress*, v. 32, n. 5, p. 1324–1335, 2016.
- BYRNE, K. High Density CHO cell cultures : Improved productivity and product quality. n. January, p. 1–358, 2014.
- CASTILHO, L. R.; ANSPACH, F. B.; DECKWER, W. D. An integrated process for mammalian cell perfusion cultivation and product purification using a dynamic filter. *Biotechnology Progress*, v. 18, n. 4, p. 776–781, 2002.
- CHON, J. H.; ZARBIS-PAPASTOITSIS, G. Advances in the production and downstream processing of antibodies. *New Biotechnology*, v. 28, n. 5, p. 458–463, 2011.
- CROUGHAN, M. S.; KONSTANTINOV, K. B.; COONEY, C. The future of industrial bioprocessing: Batch or continuous? *Biotechnology and Bioengineering*, v. 112, n. 4, p. 648–651, 2015.
- E, J.; PALOMARES, L. A. *Diseño y producción de fármacos*. 1. ed. México: El Colegio Nacional, 2007.
- FUKUTA, K. et al. High-Throughput IgG Fc N - Glycosylation Profiling by Mass Spectrometry of Glycopeptides. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, v. 55, n. 1, p. 4736–9, 2013.
- GHADERI, D. et al. Production platforms for biotherapeutic glycoproteins. Occurrence,

impact, and challenges of non-human sialylation. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, v. 28, n. 1, p. 147–175, 2012.

GUILE, G. R. et al. A rapid high-resolution high-performance liquid chromatographic method for separating glycan mixtures and analyzing oligosaccharide profiles. *Analytical biochemistry*, v. 240, n. 2, p. 210–26, 1996.

HAMMOND, S. et al. Chinese hamster genome database: An online resource for the CHO community at. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 109, n. 6, p. 1353–1356, 2012.

HODONICZKY, J.; YUAN, Z. Z.; JAMES, D. C. Control of recombinant monoclonal antibody effector functions by Fc N-glycan remodeling in vitro. *Biotechnology Progress*, v. 21, n. 6, p. 1644–1652, 2005.

HOSSLER, P.; KHATTAK, S. F.; LI, Z. J. Optimal and consistent protein glycosylation in mammalian cell culture. *Glycobiology*, v. 19, n. 9, p. 936–949, 2009.

HOUDE, D. et al. Post-translational modifications differentially affect IgG1 conformation and receptor binding. *Mol Cell Proteomics*, v. 9, n. 8, p. 1716–1728, 2010.

ICH. Q5C Stability Testing of Biotechnological/Biological Products. ICH Harmonised Tripartite Guideline, n. November, p. 1–8, 1995.

IIDA, S. et al. Nonfucosylated therapeutic IgG1 antibody can evade the inhibitory effect of serum immunoglobulin G on antibody-dependent cellular cytotoxicity through its high binding to FcγRIIIa. *Clinical Cancer Research*, v. 12, n. 9, p. 2879–2887, 2006.

ITO, A. et al. Defucosylated anti-CCR4 monoclonal antibody exercises potent ADCC-mediated antitumor effect in the novel tumor-bearing humanized NOD/Shi-scid, IL-2R<sup>??</sup>null mouse model. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, v. 58, n. 8, p. 1195–1206, 2009.

JEFFERIS, R. CCE IX : Review Glycosylation of Recombinant Antibody Therapeutics. *Society*, v. 21, n. 1, p. 11–16, 2005.

JEFFERIS, R. Glycosylation as a strategy to improve antibody-based therapeutics. *Nature reviews. Drug discovery*, v. 8, n. 3, p. 226–34, 2009.

LIU, L. Antibody Glycosylation and Its Impact on the Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Monoclonal Antibodies and Fc-Fusion Proteins. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 104, n. 6, p. 1866–1884, jun. 2015.

MARIA, S. et al. Purification process of recombinant monoclonal antibodies with mixed mode chromatography. *Journal of Chromatography A*, v. 1393, p. 57–64, 2015.

MARIÑO, K. et al. A systematic approach to protein glycosylation analysis: a path through the maze. *Nature chemical biology*, v. 6, n. 10, p. 713–723, 2010.

MEHTA, K. K. The role of more than 40 years of improvement in protein A chromatography in the growth of the therapeutic antibody industry. *Bioseparations and Downstream Processing*, v. 32, p. 1193–1202, 2016.

MORI, K. et al. Engineering Chinese hamster ovary cells to maximize effector function of produced antibodies using FUT8 siRNA. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 88, n. 7, p.

901–908, 2004.

NATSUME, A. et al. Fucose removal from complex-type oligosaccharide enhances the antibody-dependent cellular cytotoxicity of single-gene-encoded bispecific antibody comprising of two single-chain antibodies linked to the antibody constant region. *Journal of Biochemistry*, v. 140, n. 3, p. 359–368, 2006.

PACIS, E. et al. Effects of cell culture conditions on antibody N-linked glycosylation-what affects high mannose 5 glycoform. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 108, n. 10, p. 2348–2358, 2011.

PEZZINI, J. et al. Antibody capture by mixed-mode chromatography: A comprehensive study from determination of optimal purification conditions to identification of contaminating host cell proteins. *Journal of Chromatography A*, v. 1218, n. 45, p. 8197–8208, 2011.

REUSCH, D. et al. Comparison of methods for the analysis of therapeutic immunoglobulin G Fc-glycosylation profiles — Part 1 : Separation-based methods Comparison of methods for the analysis of therapeutic immunoglobulin G Fc-glycosylation profiles — Part 1 : Separation-b. *mAbs*, v. 862, n. April, 2016a.

REUSCH, D. et al. Comparison of methods for the analysis of therapeutic immunoglobulin G Fc-glycosylation profiles — Part 2 : Mass spectrometric methods Comparison of methods for the analysis of therapeutic immunoglobulin G Fc-glycosylation profiles — Part 2 : Mass spect. *mAbs*, v. 862, n. April, p. 732–742, 2016b.

REUSCH, D.; TEJADA, M. L. Fc glycans of therapeutic antibodies as critical quality attributes. *Glycobiology*, v. 25, n. 12, p. 1325–1334, 2015.

ROYLE, L. et al. HPLC-based analysis of serum N-glycans on a 96-well plate platform with dedicated database software. *Analytical Biochemistry*, v. 376, n. 1, p. 1–12, 2008.

SANCHEZ-DE MELO, I. et al. N-glycosylation profile analysis of Trastuzumab biosimilar candidates by Normal Phase Liquid Chromatography and MALDI-TOF MS approaches. *Journal of Proteomics*, v. 127, p. 225–233, 2015.

SATOH, M.; IIDA, S.; SHITARA, K. Non-fucosylated therapeutic antibodies as next-generation therapeutic antibodies. *Expert opinion on biological therapy*, v. 6, n. 11, p. 1161–1173, 2006.

SERRATO, J. A. et al. Heterogeneous conditions in dissolved oxygen affect N-glycosylation but not productivity of a monoclonal antibody in hybridoma cultures. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 88, n. 2, p. 176–188, 2004.

SERRATO, J. A. et al. Differences in the glycosylation profile of a monoclonal antibody produced by hybridomas cultured in serum-supplemented, serum-free or chemically defined media. *Biotechnology and applied biochemistry*, v. 47, n. Pt 2, p. 113–24, 2007.

SHIELDS, R. L. et al. Lack of fucose on human IgG1 N-linked oligosaccharide improves binding to human Fc $\gamma$ R3 and antibody-dependent cellular toxicity. *Journal of Biological Chemistry*, v. 277, n. 30, p. 26733–26740, 2002.

SHINKAWA, T. et al. The absence of fucose but not the presence of galactose or bisecting

- N-acetylglucosamine of human IgG1 complex-type oligosaccharides shows the critical role of enhancing antibody-dependent cellular cytotoxicity. *Journal of Biological Chemistry*, v. 278, n. 5, p. 3466–3473, 2003.
- SHUKLA, A. A.; GUPTA, P.; HAN, X. Protein aggregation kinetics during Protein A chromatography. Case study for an Fc fusion protein. *Journal of Chromatography A*, v. 1171, n. 1–2, p. 22–28, 2007.
- SWINNEN, K. et al. Performance comparison of protein A affinity resins for the purification of monoclonal antibodies. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, v. 848, n. 1, p. 97–107, 2007.
- TAO, M. H.; MORRISON, S. L. Studies of aglycosylated chimeric mouse-human IgG. Role of carbohydrate in the structure and effector functions mediated by the human IgG constant region. *J Immunol*, v. 143, n. 8, p. 2595–2601, 1989.
- THOMANN, M. et al. In vitro glycoengineering of IgG1 and its effect on Fc receptor binding and ADCC activity. *PLoS ONE*, v. 10, n. 8, p. 1–16, 2015.
- WACKER, C. et al. Glycosylation profiles of therapeutic antibody pharmaceuticals. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 79, n. 3, p. 503–507, 2011.
- WALSH, G. Biopharmaceutical benchmarks 2014. *Nature biotechnology*, v. 32, n. 7, p. 992–1000, 2014.
- WANG, Y. Structural characterization of immunoglobulin G antibodies with LC-MS based approaches, Boston, Northeastern University, , 2012.

## Apêndice: Método de purificação no ÄKTA Purifier (GE Healthcare)

Main method:

```

✕ (Main)
  0.00 Base CV 1 {ml} Any
  0.00 PumpAInlet A1
  0.00 PumpBInlet B1
  0.00 Flow 2.00 {ml/min}
✕ 0.00 Block Equilibrio
  (Equilibrio)
  0.00 Base SameAsMain
  0.00 AutozeroUV
  0.00 Flow 2.00 {ml/min}
  0.00 PumpAInlet A1
  9.98 AutozeroUV
  10.00 End_Block
✕ 0.00 Block Alimentação
  (Alimentação)
  0.00 Base SameAsMain
  0.00 Flow 0.00 {ml/min}
  0.00 SampleFlow_960 2.0 {ml/min}
  0.00 MethodBase_960 SamplePump
  0.00 InjectionValve Inject
  0.00 PumpAInlet A1
  0.00 Fractionation_900 5.000 {ml}
  20.00 End_Block
✕ 0.00 Block Lavagem
  (Lavagem)
  0.00 Base SameAsMain
  0.00 Flow 2.00 {ml/min}
  0.00 SampleFlow_960 0 {ml/min}
  0.00 MethodBase_960 SystemPump
  0.00 InjectionValve Load
  0.00 PumpAInlet A1
  0.00 Fractionation_900 10.000 {ml}
  20.00 End_Block
✕ 0.00 Block Eluicao
  (Eluição)
  0.00 Base SameAsMain
  0.00 Flow 2.00 {ml/min}
  0.00 SampleFlow_960 0 {ml/min}
  0.00 MethodBase_960 SystemPump
  0.00 InjectionValve Load
  0.00 PumpBInlet B1
  0.00 Gradient 100 {%B} 0.00 {base}
  0.00 Fractionation_900 1.000 {ml}
  4.00 Fractionation_900 8.000 {ml}
  20.00 Fractionation_Stop_900
  40.00 End_Block
0.00 End_Method

```