



DESENVOLVIMENTO DE UM ANTICORPO MONOCLONAL BIOSSIMILAR PARA TRATAMENTO DE ALTOS NÍVEIS DE COLESTEROL

Thayana Araujo da Cruz

RIO DE JANEIRO

2020





DESENVOLVIMENTO DE UM ANTICORPO MONOCLONAL BIOSSIMILAR PARA TRATAMENTO DE ALTOS NÍVEIS DE COLESTEROL

Thayana Araujo da Cruz

Tese de Doutorado 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 Doutor em Ciências – Bioquímica.

Volume único

Orientadores: Leda dos Reis Castilho Charles Russell Middaugh

RIO DE JANEIRO

2020

DESENVOLVIMENTO DE UM ANTICORPO MONOCLONAL BIOSSIMILAR PARA TRATAMENTO DE ALTOS NÍVEIS DE COLESTEROL

Thayana Araujo da Cruz

Orientadores: Leda dos Reis Castilho Charles Russell Middaugh

Tese de Doutorado 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 Doutor em Ciências – Bioquímica.

Aprovada em 03 de março de 2020 por:

Profa. Leda dos Reis Castilho, Dr.-Ing. (Orientadora) Programa de Engenharia Química – UFRJ

Prof. Rodrigo Volcan Almeida, D. Sc. Instituto de Química – UFRJ

Sorbart

Profa. Andréa Queiroz Maranhão, D. Sc. Instituto de Biologia – UnB

Profal Yraima Moura de Lopes Cordeiro, D. Sc. Faculdade de Farmácia – UFRJ

BOTO march

Prof. Ronaldo da Silva Mohana Borges, D. Sc. Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho – UFRJ

RIO DE JANEIRO

CIP - Catalogação na Publicação

Cruz, Thayana Araujo da CC957d Desenvolvimento de um anticorpo monoclonal biossimilar para tratamento de altos níveis de colesterol / Thayana Araujo da Cruz. -- Rio de Janeiro, 2020. 164 f. Orientadora: Leda dos Reis Castilho. Coorientador: Charles Russell Middaugh. Tese (doutorado) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Química, Programa de Pós Graduação em Bioquímica, 2020. 1. mAb anti-PCSK9. 2. Plasmídeos tricistrônicos. 3. Células CHO. 4. Atributos críticos de qualidade. 5. Biossimilar. I. Castilho, Leda dos Reis, orient. II. Middaugh, Charles Russell, coorient. III. Título.

Elaborado pelo Sistema de Geração Automática da UFRJ com os dados fornecidos pelo(a) autor(a), sob a responsabilidade de Miguel Romeu Amorim Neto - CRB-7/6283.

Dedico...

Ao meu avô (in memoriam)

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente a Deus, por ter permitido que eu finalizasse mais esta etapa em minha vida profissional.

À minha família (minha mãe Vera, meu irmão Neilton e meu avô Jarbas) por todo o apoio e motivação, principalmente nos vários momentos difíceis desta jornada. Esta conquista é de vocês!

À professora Leda Castilho pela orientação e confiança em meu trabalho desde a época de minha iniciação científica.

Ao professor Russ Middaugh, pela orientação, amizade e total disponibilidade durante meu doutoramento sanduíche na Universidade do Kansas (EUA).

Aos integrantes (atuais e antigos) do laboratório de Engenharia de Cultivos Celulares (LECC) – PEQ/COPPE/UFRJ. Em especial, Ioná, Alexandre e Juvissan por todo o apoio e companheirismo. E ao Dr. Marcos Pinho pelo desenho *in silico* dos plasmídeos para a expressão do anticorpo monoclonal usado neste estudo.

Ao grupo do professor Russ Middaugh (Yangjie, Nick, Gang Hu e Akshay) na Universidade do Kansas (KU/EUA), em especial aos doutores Yangjie Wei e Nicholas Larson, por toda a ajuda com os mais variados experimentos de caracterização e formulação, total disponibilidade, confiança e amizade.

Ao grupo do professor David Volkin na Universidade do Kansas (KU/EUA), em especial ao Dr. Neal Whitalker (pelo treinamento nos ensaios de cIEF e BLI) e ao Dr. Martin Hu (pela ajuda na análise dos dados de massa intacta por MS), e aos meus amigos Nishant, Kaushal e Sanjeev, por toda a gentileza durante meu doutoramento sanduíche. Ao professor Brandon DeKosky por toda disponibilidade durante minha estadia na KU e ao seu aluno e meu grande amigo Ahmed por toda a ajuda. Ao grupo do professor Christian Schöneich, em especial à Natalia, pela assistência com o experimento de mapeamento peptídico. E ao professor Thomas Tolbert, pela doação de sua coluna Amida 80 e enzima PNGase F para os ensaios de caracterização de perfil de N-glicosilação.

Às professoras Andrea Maranhão (UnB) e Roxane Piazza (Instituto Butantan), pela total disponibilidade em discutir minhas dúvidas via *Skype* e telefone. À professora Taís Kasai (CENABIO/UFRJ) pelas inúmeras tentativas em me ajudar com os experimentos de FACS. E por

fim, à professora Daniela Uziel (UFRJ) pela orientação pessoal/profissional durante os momentos mais críticos do meu doutorado.

Aos meus amigos e colaboradores da Escola de Química, Marselle e Felipe por toda a disponibilidade e suporte emocional.

Aos meus amigos do Programa de Engenharia Química (PEQ/COPPE), Mary, Mônica, Kalil, Lili e Bruno, pelo companheirismo e por todas as caronas ao longo destes anos de pósgraduação.

Aos meus amigos do Centro de Ciências da Saúde da UFRJ, Rômulo e Gabi pela disponibilidade em me ajudar e me ouvir sempre que necessário. Ao Augusto Vieira (UEMP/UFRJ) pela assistência com os experimentos de mapeamento peptídico. E ao meu aluno, Eduardo, por toda a dedicação durante o desenvolvimento de seu TCC e disponibilidade como técnico responsável pelo CEMBIO. Com minha primeira "orientação oficial", aprendi que tipo de orientadora/cientista quero ser no futuro e como é essencial a manutenção de uma relação de respeito, amizade e comprometimento entre orientador e aluno.

À minha família nos EUA (professores Kim e Mark Ritcher, Mara, Carol, Linda, Patrícia, Beto, Thomas, Janice, Rianon, Aubrey, Josh, Myla, Max e Allie), por absolutamente tudo que tornou um dos momentos mais importantes e desafiadores da minha vida em uma experiência incrível.

Aos meus eternos amigos da primeira turma do curso de Biotecnologia da UFRJ (Lueni, Natalia, Luciana, Fernanda e Ana Carolina) pela amizade sincera e por todo o suporte emocional.

Ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica (PPGBq/IQ/UFRJ) e a todos os docentes que contribuíram para o meu crescimento profissional e pessoal.

Ao apoio financeiro do CNPq, FAPERJ, e principalmente da CAPES, pelas bolsas de doutorado no Brasil e de doutorado sanduíche nos EUA.

RESUMO

Altos níveis de lipoproteína de baixa densidade (LDL) no sangue estão relacionados com um aumento de cerca de 50% no risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares, que são a principal causa de morte em todo o mundo. Desde a década de 1980, as estatinas vêm sendo usadas amplamente como tratamento de primeira escolha para a redução dos níveis de colesterol. Entretanto, cerca de 20% dos pacientes sofrem com efeitos colaterais ou são intolerantes às estatinas, além da dificuldade associada ao tratamento de portadores da doença genética hipercolesterolemia familiar. Neste contexto, a aprovação de biofármacos da classe de anticorpos monoclonais (mAbs) inibidores da enzima PCSK9 surge como uma alternativa de tratamento eficiente. A PCSK9 é responsável pela degradação lisossomal dos receptores de LDL, diminuindo significativamente a sua concentração na superfície das células hepáticas e comprometendo a remoção eficiente de LDL circulante. Os mAbs anti-PCSK9 permitem, portanto, que mais receptores de LDL estejam disponíveis, possibilitando uma redução dos níveis de colesterol. Desta forma, o objetivo geral deste trabalho consiste em desenvolver uma plataforma para a expressão de um mAb inibidor de PCSK9 biossimiliar ao produto de referência Repatha® (evolocumabe, Amgen), incluindo desde a geração de uma população estável de células CHO até a caracterização e formulação do biofármaco produzido. Para isso, as seguintes etapas foram realizadas: (1) construção de vetores de expressão tricistrônicos mediados por elementos IRES contendo os genes do mAb anti-PCSK9 (cadeias leve e pesada com seus respectivos peptídeos sinal - sp) e diferentes marcadores de seleção (Neo e Hygro); (2) transfecção e seleção de células da linhagem CHO-K1 com os vetores construídos; (3) caracterização comparativa do crescimento, metabolismo e produtividade das linhagens estáveis geradas; (5) produção de mAb através de cultivo da linhagem mais promissora em batelada em frascos agitados; (6) purificação do mAb através de cromatografia de afinidade à proteína A; (7) caracterização estrutural, físico-química e biológica do mAb produzido e (8) estudos de estabilidade em diferentes formulações líquidas. Inicialmente, a linhagem estável mais promissora dentre as obtidas foi selecionada (com produção de mAb de ~ 0,9 mg/L), tendo sido a transfectada com um plasmídeo de expressão circular contendo a seguinte construção gênica: promotor CMV-(spL1)cadeia leve-IRES-(spH7)cadeia pesada-IRES-Neo. Em seguida, o mAb oriundo de sobrenadante de diversos cultivos em batelada desta população foi purificado. O mAb foi então extensivamente caracterizado e mostrou elevada pureza com concentrações mínimas de agregados e fragmentos (<2%); perfil de N-glicosilação e de cargas compatível com imunoglobulinas G humanas; estruturas primária, secundária e terciária, conformação global, solubilidade relativa e propensão à agregação similares ao produto de referência e alta afinidade de reconhecimento pela proteína-alvo (PCSK9). Estudos comparativos de estabilidade em diferentes condições de pH e temperatura, além de diversas formulações, também mostraram uma elevada similaridade entre o biossimilar produzido e o produto de referência. A inclusão de açúcares (sacarose), aminoácidos (glicina, prolina) e surfactantes (polisorbato 80) na formulação do mAb mostrou-se benéfica para o aumento de sua integridade conformacional e coloidal. Os resultados obtidos confirmam a eficiência da plataforma proposta, apontando gargalos no processo que podem ser investigados e superados para aplicação do processo em maior escala futuramente.

Palavras-chave: 1. mAb anti-PCSK9. 2. Plasmídeos tricistrônicos. 3. Células CHO. 4. Atributos críticos de qualidade. 6. Biossimilar.

ABSTRACT

High levels of low-density lipoprotein (LDL) in the blood are associate to about a 50% increase in the risk of developing cardiovascular disease, which is the leading cause of death worldwide. Since the 1980s, statins have been widely used as the first-choice treatment for lowering cholesterol levels. However, about 20% of patients present adverse effects or do not tolerate statins, in addition the treatment of patients with familial hypercholesterolaemia is challenging. In this context, the approval of PCSK9 inhibitor monoclonal antibodies (mAbs) arises as an efficient alternative treatment. PCSK9 is responsible for lysosomal degradation of LDL receptors, significantly decreasing its concentration on the surface of liver cells and compromising the efficient removal of circulating LDL. Anti-PCSK9 mAbs therefore allow more LDL receptors to be available lowering cholesterol levels. Thus, the main goal of this work is to develop a platform for the expression of an anti-PCSK9 biosimilar mAb to the reference product Repatha® (evolocumab, Amgen), including steps from the generation of a stable CHO cell pool to characterization and formulation of the biopharmaceutical produced. The following steps were performed: (1) construction of IRES-mediated tricistronic expression vectors containing the anti-PCSK9 mAb genes (light and heavy chains with their respective signal peptides - sp) and different selection markers (Neo and Hygro); (2) transfection and selection of CHO-K1 cell lines with the constructed vectors; (3) comparative characterization of growth, metabolism and productivity of the generated stable lines; (5) mAb production through cultivation of the most promising cell line by batch cultures in shake flasks; (6) mAb purification by protein A affinity chromatography; (7) structural, physicochemical and biological characterization of the produced mAb and (8) stability studies in different liquid formulations. Initially, the most promising stable line among those obtained was selected (mAb production ~ 0,9 mg/L), having been transfected with a circular expression plasmid presenting the following gene construct: CMV promoter-(spL1)light chain-IRES-(spH7)heavy chain-IRES-Neo. Then, the mAb supernatant from several batches of this cell line was purified. The mAb was then extensively characterized and showed high purity with minimal aggregate and fragment concentrations (<2%); N-glycosylation and charge profile compatible with human immunoglobulins G; primary, secondary and tertiary structures, global conformation, relative solubility and aggregation propensity similar to the reference product and high binding affinity for the target protein (PCSK9). Comparative stability studies under different pH and temperature conditions, as well as several formulations also showed a high similarity between the produced biosimilar and the reference product. The inclusion of sugars (sucrose), amino acids (glycine, proline) and surfactants (polysorbate 80) in the mAb formulation was beneficial for increasing conformational and colloidal integrity. The results confirm the efficiency of the proposed platform, highlighting process bottlenecks that can potentially be investigated and overcome to apply the process in large scales in the future.

Keywords: 1. Anti-PCSK9 mAb. 2. Tricistronic plasmids. 3. CHO cells. 4. Critical quality attributes. 6. Biosimilar.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representações típicas de uma IgG humana.	23
Figura 2. Mecanismos de regulação do LDLR pela PCSK9	35
Figura 3. Sequência de aminoácidos do produto comercial Repatha [®]	36
Figura 4. Etapas do processo típico de geração de linhagens clonais para produção de biofármacos	38
Figura 5. Esquema dos diferentes modos de operação de biorreatores	42
Figura 6. Etapas do processo de purificação típico de anticorpos monoclonais terapêuticos	45
Figura 7. Principais modificações e vias de degradação dos anticorpos monoclonais terapêuticos	52
Figura 8. Etapas para o desenvolvimento de formulações de proteínas	55
Figura 9. Diagrama do inserto desenhado para expressão de mAbs	60
Figura 10. Mapas dos plasmídeos sintéticos e comerciais utilizados neste estudo para a construção	o dos
vetores de expressão de mAbs	61
Figura 11. Construção do vetor pCI L1-LC-IRES-H7-HC-IRES-Neo	62
Figura 12. Construção do vetor pCI L2-LC-IRES-H7-HC-IRES-Neo	63
Figura 13. Construção do vetor pCI L1-LC-IRES-H7-HC-IRES-Hygro	64
Figura 14. Construção do vetor pCI L2-LC-IRES-H7-HC-IRES-Hygro	65
Figura 15. Esquema simplificado das etapas de processamento de dados para a construção de um EPD	83
Figura 16. Validação da construção do vetor pCI L1-LC-IRES-H7-HC-IRES-Neo	89
Figura 17. Validação da construção do vetor pCI L2-LC-IRES-H7-HC-IRES-Neo	89
Figura 18. Validação da construção do vetor pCI L1-LC-IRES-H7-HC-IRES-Hygro	90
Figura 19. Validação da construção do vetor pCI L2-LC-IRES- H7-HC-IRES-Hygro	90
Figura 20. Imunoensaio de spot-blot para detecção da expressão transiente do mAb anti-pCSK9 co	m os
diferentes vetores construídos	
Figura 21. Processo de seleção de populações estáveis de células CHO com antibióticos	94
Figura 22. Imunoensaio de slot-blot para detecção da expressão do mAb anti-pCSK9 pelos transfector	omas
após 60 dias de seleção com antibióticos	95
Figura 23. Avaliação comparativa dos perfis de crescimento e metabolismo das populações estáve	is de
células CHO cultivadas em frascos agitados de pequena escala	97
Figura 24. Avalição comparativa dos perfis de purificação dos sobrenadantes das populações esta	áveis
geradas	99
Figura 25. Resultados analíticos da purificação dos sobrenadantes das populações estáveis	. 101

Figura 26. Análise de pureza de diferentes lotes de mAb produzido para os ensaios de caracterização e
formulação101
Figura 27. Avaliação da pureza e heterogeneidade
Figura 28. Cromatogramas representativos de RP-HPLC referentes a separação dos peptídeos das amostras
de mAb digeridas com tripsina/quimotripsina104
Figura 29. Cobertura da sequência de aminoácidos do mAb biossimilar obtida pela análise de mapeamento
peptídico por UPLC-MS/MS
Figura 30. Análise do perfil de cargas
Figura 31. Análise de solubilidade relativa
Figura 32. Análise do perfil de N-glicosilação 108
Figura 33. Abundância relativa dos glicanos mais prevalentes em IgGs humanas 114
Figura 34. Análise de ligação a PCSK9 in vitro
Figura 35. Espectros de dicroísmo circular na região do UV distante
Figura 36. Comparação do conteúdo de estrutura secundária dos mAbs120
Figura 37. Análise por espectroscopia de Raman
Figura 38. Análise por espectroscopia de fluorescência
Figura 39. Análises de propensão à agregação e de estabilidade conformacional global 126
Figura 40. Visualização dos dados de estabilidade em diferentes temperaturas e pHs 129
Figura 41. Estudo comparativo de degradação acelerada em diferentes formulações por espectroscopia de
fluorêscencia
Figura 42. Estudo comparativo de degradação acelerada em diferentes formulações por SEC-HPLC 139
Figura 43. Análise de degradação acelerada do mAb de referência (Repatha®, Amgen) em diferentes
formulações a 140 mg/mL por SDS-PAGE
Figura 44. Análise de degradação acelerada do mAb de referência (Repatha®, Amgen) a 140 mg/mL em
diferentes formulações por espectroscopia de fluorescência
Figura 45. Análise de de degradação acelerada do mAb de referência (Repatha®, Amgen) a 140 mg/mL
em diferentes formulações por DSC
Figura 46. Análise de degradação acelerada do mAb de referência (Repatha®, Amgen) a 140 mg/mL em diferentes formulações por SEC-HPLC

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Produtos baseados em mAbs aprovados para uso terapêutico humano ou em processo de
aprovação26
Tabela 2. Principais ensaios analíticos utilizados na caracterização de biofármacos
Tabela 3. Principais excipientes utilizados em formulação de proteínas terapêuticas
Tabela 4. Principais excipientes utilizados na formulação de mAbs terapêuticos57
Tabela 5. Oligonucleotídeos utilizados nas reações de PCR
Tabela 6. Excipientes testados para a estabilização de mAbs
Tabela 7. Formulações testadas para o ensaio comparativo de degradação acelerada
Tabela 8. Possíveis N-glicanos presentes no mAb de referência e no biossimilar110
Tabela 9. Informações disponíveis em documentos regulatórios para mAbs do tipo IgG2 aprovados116
Tabela 10. Resumo das temperaturas de transição (Tm) dos mAbs calculadas por ensaios biofísicos127
Tabela 11 Resumo dos principais atributos críticos de qualidade avaliados no estudo de biocomparabilidade
do mAb biossimilar anti-PCSK9 produzido e o produto de referência Repatha®131
Tabela 12. Classificação de excipientes para o mAb de referência em tampão acetato pH 5,0 utilizando
espectroscopia de fluorescência
Tabela 13. Classificação de excipientes para o mAb de referência em tampão citrato pH 6,0 utilizando
espectroscopia de fluorescência
Tabela 14. Classificação de excipientes para o mAb biossimilar em tampão citrato pH 6,0 utilizando
espectroscopia de fluorescência

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AC – cromatografia de afinidade ADC – anticorpo conjugado com droga ADCC - citotoxicidade celular dependente de anticorpos ADCP - fagocitose celular dependente de anticorpos AEX - cromatografia de troca aniônica AIDS – síndrome da imunodeficiência adquirida ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária AUC – ultracentrifugação analítica BCIP - 5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato BHK – Baby Hamster Kidney Cells (células de rim de hamster neonato) Bla – gene de resistência a blasticidina bsd BLI - interferometria de bio-camada BLyS - estimulador de linfócito B BSA – albumina de soro bovino C5 – Proteína do complemento 5 CAPS – síndrome periódica associada à criopirina CCR5 – receptor CC de quimiocina tipo 5 CD - espectroscopia de dicroísmo circular CD20 - cluster de diferenciação 20 expresso por linfócito B CDC – citotoxicidade dependente de complemento CDR - regiões determinantes de complementaridade CE – eletroforese capilar cel – célula CEX – cromatografia de troca catiônica CFDA – Administração de Medicamentos e Alimentos da China CGRP - Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina CHO - Chinese Hamster Ovary Cells (células de ovário de hamster chinês) cIEF - focalização isoelétrica capilar CMV-IE – human cytomegalovirus immediate early promoter Cp – capacidade térmica molar CP-citrato-fosfato CQA – atributo crítico de qualidade CRISPR – repetições palindrômicas curtas agrupadas e regularmente interespaçadas. CTLA-4 – proteína associada a linfócito T-citotóxico DHFR - diidrofolato redutase

DLS – espalhamento dinâmico da luz

DNA – ácido desoxirribonucleico

dNTPs - desoxinucleotídeos

DSC – calorimetria diferencial de varredura

DSF - fluorescência de varredura diferencial

DTT - ditiotreitol

EGF – fator de crescimento epitelial

EGFR - receptor do fator de crescimento epitelial

EL – etapa de eluição ELISA - ensaio imunoenzimático em fase sólida EMA – Agência Europeia de Medicamentos EMCV - encephalomyocarditis virus EPD - diagrama empírico de fase EQ – etapa de equilíbrio ESD – diferença espectral de erro ESI – ionização por eletrospray EU – Europa EUA - Estados Unidos Fab - fragmento de ligação ao antígeno Fc – fragmento cristalizável FDA - Administração de Alimentos e Medicamentos FTIR - espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier GC – guanina-citosina GS – glutamina sintetase HAMA - human anti-murine antibody HC – cadeia pesada HCP - proteínas da célula hospedeira HDX - troca hidrogênio/deutério HEK-293 - Human Embryonic Kidney Cells (células embrionárias de rim humano) HER2 – receptor de fator de crescimento epidérmico humano 2 HF - hipercolesterolemia familiar HFHe - hipercolesterolemia familiar heterozigótica HFHo – hipercolesterolemia familiar homozigótica HIC – cromatografia de interação hidrofóbica HILIC - cromatografia líquida de interação hidrofílica HIV - virus da imunodeficiência humana HMG-CoA redutase – 3-hidroxi-3-metil-glutaril-coenzima A redutase HMMS – espécies de alta massa molecular LMMS – espécies de baixa massa molecular HPLC - cromatografia líquida de alta eficiência HT – hipoxantina e timidina Hygro - higromicina B fosfotransferase IAA - iodoacetamida IEX – cromatografia de troca iônica IFNg-interferon-gama IgA – imunoglobulina do tipo A IgD – imunoglobulina do tipo D IgE – imunoglobulina do tipo E IGF – fator de crescimento semelhante à insulina IGF-1R - receptor de fator de crescimento semellhante à insulina IgG – imunoglobulina do tipo G IgM – imunoglobulina do tipo M IL-R – receptor de interleucina IMGT - sistema internacional de informações imunogenéticas

IRES – sítio interno de entrada ribossomal

ITC – calorimetria de titulação isotérmica

ka - constante de associação

KD - constante de dissociação de equilíbrio

kDa – quilo Dalton

kdis – constante de dissociação

LC - cadeia leve

LC-MS/MS – cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas sequencial

LDL – lipoproteína de baixa densidade

LDLR – receptor de lipoproteína de baixa densidade

LV – etapa de lavagem

mAb – anticorpo monoclonal

MASP-2 - serina protease associada à lectina de ligação à manana

MFI-imageamento de micro-fluxo

MM – massa molecular

MRME – elipticidade molar residual média

mRNA – RNA mensageiro

MS – espectrometria de massas

MS/MS – espectrometria de massas sequencial

MSX – metionina sulfoximina

MTX - metotrexato

NBT – sal de tetrazólio nitro blue

NCA – antígeno de reação cruzada não-específico

Neo – neomicina fosfotransferase

NGNA – ácido N-glicolilneuramínico

pb – pares de bases

PBS – tampão salina fosfato

PCA/SVD – análise de componentes principais/decomposição de valores singulares

PCR – reação em cadeia da polimerase

PCSK9 – pró-proteína convertase subtilisina/kexina tipo 9

PD-1 – receptor de morte programada 1

PDB – Protein Data Bank

PDGFR α – receptor- α de fator de crescimento derivado de plaquetas

PEG – polietilenoglicol

pH – potencial de hidrogênio iônico

pI – ponto isoelétrico

PK/PD – farmacocinética e farmacodinâmica

PMDA – Agência de Dispositivos Médicos e Farmacêuticos

PR – produto de referência

PSMA – antígeno de membrana específico de próstata

PTM – modificação pós-tradução

Puro – puromicina N-acetil-transferase

Q-TOF – quadrupolo e tempo-de-voo

RANK-L – ativador de receptor do fator nuclear kappa-B ligante

RE – retículo endoplasmático

RMN – ressonância magnética nuclear

RNA – ácido ribonucleico

RP – cromatografia de fase reversa

RSV – vírus sincicial respiratório

SDS-PAGE – eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio

SEC - cromatografia de exclusão molecular

SFB – soro fetal bovino

SLAMF7 –receptor membro da família de moléculas ativadoras de sinalização de linfócitos 7

SLS – espalhamento estático da luz;

sp - peptídeo sinal

SPR – ressonância plasmônica de superfície

TBS – tampão tris-base

T_m – midpoint da temperatura de desenovelamento (ou fusão/desnaturação/transição)

 $TNF-\alpha$ – fator de necrose tumoral alfa

Toffset – temperatura de compensação

Tonset - temperatura inicial de transição

TROF-2 – antígeno da superfície celular de trofoblastos 2

UG – unidades de glicose

UPLC – cromatografia líquida de ultra alta eficiência

UV/Vis – espectroscopia de absorção ultravioleta/visível

V – voltagem

VEGF – fator de crescimento endotelial vascular

Zeo – gene de resistência a zeocina Sh ble

ZFN – nucleases dedo de zinco

%PEGmidpt – ponto médio da concentração de PEG

2-AB – 2-aminobenzamida

a.u. – unidades arbitrárias

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	20
	1.1. Biofármacos e biossimilares	20
	1.2. Anticorpos e anticorpos monoclonais	21
	1.2.1. Hipercolesterolemia familiar e anticorpos monoclonais inibidores de PCSK9	
	1.3. Processo de produção de biofármacos	
	1.3.1. Desenvolvimento de linhagens celulares	
	1.3.2. Produção	41
	1.3.3. Purificação	
	1.3.4. Caracterização	
	1.3.5. Formulação	53
2.	OBJETIVOS	58
	2.1. Objetivo geral	58
	2.2. Objetivos específicos	58
3.	METODOLOGIA	59
	3.1. Construção dos plasmídeos	59
	3.1.1. Transformação e manutenção de bactérias	65
	3.1.2. Eletroforese em gel de agarose	66
	3.1.3. Reação em cadeia da polimerase (PCR)	67
	3.1.4. Digestão de DNA com enzimas de restrição	67
	3.1.5. Ligação de fragmentos de DNA	69
	3.2. Cultivo e transfecção de células CHO	69
	3.2.1. Linhagem celular e condições de cultivo	69
	3.2.2. Transfecção e geração de populações estáveis	69
	3.2.2. Estudos de cinética em frascos agitados	70
	3.2.3. Produção do anticorpo monoclonal para os ensaios de caracterização e formulação	ão71
	3.3. Purificação por cromatografia de afinidade por proteína A	71
	3.4. Preparo de amostras para os ensaios biofísicos e bioquímicos comparativos	71
	3.5. Ensaios analíticos para caracterização	72
	3.5.1. Quantificação de anticorpos monoclonais	72
	3.5.2. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)	72
	3.5.3. Ensaios de imunodetecção	73

3.5.4. Cromatografia de exclusão molecular de alta eficiência	75
3.5.5. Ensaios de afinidade de ligação à PCSK9 in vitro	75
3.5.6. Mapeamento peptídico	
3.5.7. Perfil de N-glicosilação por cromatografia líquida de interação hidrofíli	ica78
3.5.8. Focalização isoelétrica capilar	79
3.5.9. Ensaio de precipitação com polietilenoglicol	79
3.5.10. Espectroscopia de dicroísmo circular	
3.5.11. Espectroscopia de Raman	
3.5.12. Espectroscopia de fluorescência intrínsica e extrínsica	
3.5.13. Espalhamento de luz dinâmico (DLS)	
3.5.14. Calorimetria de varredura diferencial (DSC)	
3.5.15. Diagrama empírico de fases (EPD)	
3.6. Ensaios de formulação e estabilidade	
3.6.1. Avaliação de excipientes para a estabilização de anticorpos monoclona	is83
3.6.2. Ensaio comparativo de degradação acelerada em diferentes formulaçõe	s85
3.6.3. Análise da estabilidade do produto Repatha® em diferentes formulaçõe	s86
3.7. Análise estatística	
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	88
4.1. Construção dos vetores para expressão do mAb anti-PCSK9	
4.2. Transfecção e seleção de células CHO-K1	
4.3. Avaliação comparativa das populações estáveis geradas	
4.4. Caracterização comparativa do mAb produzido	
4.4.1. Pureza e heterogeneidade de tamanho	
4.4.2. Mapeamento peptídico	
4.4.3. Perfil de cargas	
4.4.4. Solubilidade relativa	
4.4.5. Perfil de N-glicosilação	
4.4.6. Ligação à PCSK9	
4.4.7. Estruturas secundária e terciária	
4.4.8. Propensão à agregação e conformação global	
4.4.9. Perfil de estabilidade (pH versus temperatura)	
4.4.9. Perfil de estabilidade (pH versus temperatura)4.4.10. Resumo dos resultados de caracterização	
 4.4.9. Perfil de estabilidade (pH versus temperatura) 4.4.10. Resumo dos resultados de caracterização 4.5. Estudos de formulação e estabilidade 	

	4.5.1. Seleção de excipientes	
	4.5.2. Estudo de estabilidade por degradação acelerada	136
	4.5.2. Estudo de degradação acelerada do produto Repatha® a altas concentrações	141
5.	CONCLUSÕES E SUGESTÕES	147
5	1. Conclusões	147
5	.2. Sugestões	
RE	FERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	150

1. INTRODUÇÃO

1.1. Biofármacos e biossimilares

O termo "biofármacos" surgiu na década de 1980 e, de acordo com o conceito proposto por WALSH (2002), designa proteínas e substâncias derivadas de ácidos nucleicos usadas com finalidade terapêutica ou para diagnóstico *in vivo* que são produzidas por meios que não a extração direta de fontes biológicas. Os principais biofármacos comercializados podem ser classificados em oito grandes grupos: (1) citocinas, (2) fatores de crescimento hematopoiético, (3) outros fatores de crescimento, (4) hormônios, (5) fatores sanguíneos, (6) enzimas, (7) anticorpos e (8) proteínas de fusão. Essas proteínas terapêuticas têm beneficiado milhões de pessoas mundialmente, através do tratamento de doenças cardíacas, esclerose múltipla, diversos tipos de câncer, síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), hemofilias, artrite, diabetes e outras desordens. Em sua maioria, estas proteínas possuem estruturas complexas com diversas modificações pós-tradução e, para que possam ser sintetizadas com a estrutura correta, são geralmente produzidas por processos biotecnológicos através do cultivo de células de mamíferos geneticamente modificadas (MELLADO E CASTILHO, 2008; CASTILHO, 2017).

O primeiro biofármaco aprovado para uso terapêutico humano foi a insulina recombinante Humulin[®], produzida por uma linhagem recombinante de *Escherichia coli*, em 1982, nos Estados Unidos (BUTLER, 2005). Desde então, 316 biofármacos já foram aprovados mundialmente (WALSH, 2018). O mercado biofarmacêutico mundial movimentou cerca de US\$ 240 bilhões em 2018, com previsão de atingir a cifra de US\$ 389 bilhões em 2024, representando 30% do setor farmacêutico. Devido ao investimento significativo em pesquisa e desenvolvimento pelas grandes empresas do setor, estima-se que a taxa anual de crescimento do mercado biofarmacêutico continue em cerca de 8,59% até 2024 (MORDOR INTELLIGENCE, 2018).

Devido à demanda crescente por biofármacos, atualmente são grandes os esforços para aprimorar as tecnologias de produção. Com as expirações de patentes de inúmeros biofármacos, surgiram novos produtos conhecidos como biossimilares ou *follow-on proteins*. De acordo com a Organização Mundial da Saúde (2016), biossimilares são produtos terapêuticos semelhantes em termos de qualidade, segurança e eficácia a um produto de referência já licenciado. Os produtos biológicos são complexos e muito sensíveis a variações em seu processo de fabricação (sistema de expressão, condições de cultivo, processo de purificação, formulação, armazenamento), levando a uma alta heterogeneidade do produto. Portanto, o desenvolvimento de biossimilares é um processo desafiador, reforçado pela falta de informações divulgadas sobre o processo de fabricação dos produtos inovadores. Considerando essa elevada complexidade e variabilidade, associadas às dificuldades de caracterização é impossível garantir cópias idênticas aos produtos de referência, como, por exemplo, acontece com os produtos genéricos de drogas sintéticas, mesmo utilizando linhagens celulares idênticas e processos de produção e purificação parecidos, daí a terminologia "biossimilar" (ASSIS E PINTO, 2018; ISHII-WATABE E KUWABARA, 2019).

Atualmente, não existe uma harmonização para a aprovação regulatória de biossimilares, que é regulamentada regionalmente por diferentes agências reguladoras, como a Agência Europeia de Medicamentos (EMA) da União Européia, a Administração de Alimentos e Medicamentos (FDA) dos Estados Unidos, a Agência de Dispositivos Médicos e Farmacêuticos (PMDA) do Japão, a Administração de Medicamentos e Alimentos da China (CFDA), a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) no Brasil e outras em todo o mundo. Geralmente, o processo padrão para a aprovação de um biofármaco original leva cerca de 10 anos, desde a descoberta e passando pelas fases clínicas 1, 2 e 3. Já os biossimilares têm um caminho de aprovação mais curto devido à ausência da etapa de descoberta e da redução dos requisitos de ensaios clínicos, em geral sem a necessidade de condução de fase 2 e com menor número de voluntários nas fases clínicas 1 e 3. Além disso, uma demonstração extremamente detalhada de comparabilidade analítica, pré-clínica e clínica a um produto de referência é essencial para a aprovação de biossimilares (KIRCHHOFF et al., 2017; AGBOGBO et al., 2019). A introdução dos biossimilares no mercado pode, portanto, levar à diminuição do tempo de aprovação de biofármacos; redução dos custos de aquisição para pacientes e sistemas de saúde governamentais; aumento da competitividade entre empresas e consequente ampliação da oferta de produtos e estímulo de pesquisas científicas para otimização dos processos produtivos utilizados industrialmente (FARHAT et al., 2017; KIRCHHOFF et al., 2017).

1.2. Anticorpos e anticorpos monoclonais

Os anticorpos são glicoproteínas pertencentes ao grupo das imunoglobulinas ou gamaglobulinas presentes na circulação sanguínea, tecidos e mucosas como integrantes fundamentais da imunidade adquirida humoral. Estas proteínas são secretadas por plasmócitos

(linfócitos B diferenciados) como resposta imunológica à exposição a moléculas estranhas ao organismo, denominadas antígenos.

As imunoglobulinas são divididas em cinco classes ou isotipos, IgA, IgD, IgE, IgG e IgM. Dentre elas, as imunoglobulinas do tipo G (IgG) compõem a maior proporção no organismo humano, com cerca de 70 a 75%. Esta classe possui uma estrutura tridimensional clássica no formato de "Y", como observado nas Figuras 2A e 2B. As IgGs são proteínas heterodiméricas, compostas por dois tipos distintos de cadeias polipeptídicas: duas cadeias pesadas ou HC (do inglês *heavy chain*), e duas cadeias leves ou LC (do inglês *light chain*), com aproximadamente 50 e 25 kDa, respectivamente, totalizando uma massa molecular aproximada de 150 kDa. As duas cadeias são estabilizadas por pontes dissulfeto intercadeia e intracadeia, que conferem a sua conformação tridimensional específica. A cadeia leve possui um domínio variável (VL), correspondente à porção N-terminal da cadeia, e um domínio constante (CL). Por outro lado, a cadeia pesada contém quatro domínios: um domínio variável (VH), correspondendo a sua porção N-terminal, e três domínios constantes, denominados CH1, CH2 e CH3. A especificidade na ligação antígenoanticorpo é conferida por regiões hipervariáveis presentes nos domínios variáveis do anticorpo, conhecidas como regiões determinantes de complementaridade (CDRs), um conjunto de três sequências de resíduos de aminoácidos intercaladas nas cadeias leve e pesada, que se ligam especificamente ao epítopo (subestrutura química do antígeno). A clivagem enzimática de anticorpos pela protease papaína gera três fragmentos que possuem diferentes funções biológicas. Dois deles são iguais, chamados Fab (fragmento de ligação ao antígeno), constituídos pela cadeia leve completa pareada com os domínios VH e CH1 da cadeia pesada, sendo responsável pelo reconhecimento e ligação específica ao antígeno. A outra porção, Fc (fragmento cristalizável), compreende os domínios constantes CH2 e CH3 de ambas as cadeias pesadas unidas pelas ligações dissulfeto da região da dobradiça. Tal porção possui uma função efetora fundamental para a ativação do sistema complemento via ligação com a proteína C1q e ativação do mecanismo de citotoxicidade celular dependente de anticorpos (ADCC), ou via ligação com receptores da porção Fc presentes na membrana de células de defesa (WANG et al, 2007; ABBAS et al., 2012; SCHROEDER et al, 2010; TAMASHIRO e AUGUSTO, 2008).





Figura 1. Representações típicas de uma IgG humana. (A) Esquema representativo de uma IgG com anotação das principais regiões e domínios da proteína. Adaptado de THERMOFISHER (2019). (B) Estrutura tridimensional de uma IgG1 vista por dois ângulos. Modelo depositado no PDB (código 1HZH). Adaptado de VIDARSSON et al., 2014. (C) Principais estruturas de N-glicanos encontradas em mAbs terapêuticos. As linhas tracejadas em vermelho destacam o núcleo principal dos oligossacarídeos ligados ao resíduo de asparagina. Adaptado de LIU, 2015.

Tipicamente, as IgGs possuem um sítio de N-glicosilação em cada cadeia pesada, localizado em um resíduo de asparagina (Asn) no domínio CH2. A glicosilação na porção Fc dos anticorpos é muito importante para sua estabilidade conformacional, resistência a proteases, solubilidade, meia-vida, biodisponibilidade, farmacocinética e farmacodinâmica (PK/PD) e, no caso de IgGs com função efetora, também pode desempenhar um papel crítico na atividade biológica e imunogenicidade, modulando a ligação dos anticorpos a receptores gama ($Fc\gamma R$) e C1q, além de diversas funções efetoras imunológicas, como: citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC), fagocitose celular dependente de anticorpos (ADCP) e citotoxicidade dependente de complemento (CDC) (ZHANG et al., 2016; WADA et al., 2019). Os N-glicanos ligados à cadeia polipeptídica contêm um pentassacarídeo central (núcleo), composto por dois resíduos de Nacetilglicosamina e três resíduos de manose, ligado por meio de uma ligação N-glicosídica a um resíduo de Asn da proteína. Os sítios de N-glicosilação de uma glicoproteína ocorrem em uma sequência de aminoácidos consenso Asn-X-Ser/Thr, sendo que a letra "X" pode representar qualquer aminoácido, exceto a prolina. Os N-glicanos encontradas em IgGs são em sua maioria do tipo complexo biantenário, caracterizados por serem fucosilados e por apresentarem baixos níveis de sialilação e de alta manose. A maioria dos glicanos é do tipo complexa e fucosilada, de estrutura denominada G0F (sem galactose terminal), G1F (com 1 galactose terminal) e G2F (com 2 galactoses terminais) (BUTLER, 2008; LIU, 2015; REUSCH E TEJADA, 2015), como mostrado na Figura 2C.

As IgGs podem ainda ser subdividas em quatro isoformas: IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. Essas subclasses, apesar de serem muito conservadas entre si, com cerca de 90% de similaridade de sequência primária, diferem estruturalmente em sua porção Fc e na região da dobradiça, apresentando diferentes números e organizações de pontes dissulfeto. Essas diferenças afetam a ligação ao antígeno, além das suas funções efetoras imunológicas, meia-vida e transporte via placenta. A afinidade das diferentes isoformas pelos receptores Fc pode ser ordenada da seguinte forma: IgG1>IgG3> IgG4> IgG2 (VIDARSSON et al., 2014; WUHRER et al., 2007).

A produção *in vitro* dos chamados anticorpos monoclonais (mAbs), ou seja, produzidos por uma população clonal de linfócitos B, tornou-se possível com o advento da tecnologia de hibridomas, em 1975 (KÖHLER E MILSTEIN, 1975). Com esta técnica, considerada um marco na biotecnologia farmacêutica, células híbridas foram obtidas a partir da fusão de plasmócitos de camundongos com células tumorais murinas, permitindo a proliferação indefinida de células

secretoras de mAbs específicos contra um antígeno anteriormente usado para imunizar o doador dos plasmócitos. Sendo assim, a primeira geração de mAbs foi de origem murina, com o produto OKT3 (anti-CD3) sendo o primeiro mAb murino aprovado para uso em humanos, indicado para a redução da rejeição de transplantes de rim, em 1986. No entanto, estes anticorpos murinos, quando usados repetidas vezes, apresentaram problemas de imunogenicidade em humanos, limitando a sua eficácia terapêutica com a indução de uma resposta imune conhecida como *human anti-murine antibody* (HAMA). Somente com os avanços da engenharia genética tornou-se possível o desenvolvimento de anticorpos quiméricos (com regiões variáveis totalmente humanas, sendo de forma global 60 - 70% humanos) e, mais tarde, de anticorpos humanizados (90 - 95% humanos), os quais permitiram reduzir a imunogenicidade em humanos. Atualmente, os anticorpos totalmente humanos apresentam-se como os candidatos mais promissores para a aprovação pelas agências reguladoras para uso terapêutico (JEFFERIS, 2009; TAMASHIRO e AUGUSTO, 2008).

Os mAbs são a classe de biofármacos mais estudada e com maior número de produtos aprovados pelas agências reguladoras internacionais para uso terapêutico em humanos. Somente em 2017, a venda global de mAbs atingiu US\$ 103,4 bilhões, representando cerca de metade das vendas anuais do setor biofarmacêutico. Devido à sua alta especificidade, estes produtos são principalmente utilizados no tratamento de doenças crônicas, autoimunes e diversos tipos de câncer. Entretanto, várias outras aplicações terapêuticas menos convencionais vêm sendo exploradas, com mAbs já aprovados ou em desenvolvimento para o tratamento de hipercolesterolemias, enxaqueca, psoríase, hemofilias, dentre outros. Além disso, o desenvolvimento de produtos derivados de anticorpos, como proteínas de fusão com Fc, anticorpos conjugados com drogas (ADC), fragmentos de mAbs, nanomAbs, imunocitocinas (fusão anticorpo-citocina) e anticorpos biespecíficos, demonstra outros exemplos de aplicações inovadoras dos mAbs (WALSH, 2018; AGBOGBO et al., 2019). A Tabela 1 resume os produtos terapêuticos baseados em mAbs aprovados ou em processo de revisão por agências reguladoras na Europa e nos Estados Unidos, não incluindo produtos já retirados do mercado nem biossimilares.

Tabela 1. Produtos baseados em mAbs aprovados ou em processo de aprovação na Europa e nos Estados Unidos para uso terapêutico em humanos. Adaptado de: WALSH(2018); The Antibody Society (2019). NA: não aprovado, EUA: Estados Unidos (aprovação via FDA), UE: União Europeia (aprovação via EMA).

Nome comercial	Nome	Empresa	Formato	Alvo terapêutico	Principal indicação	Ano de Aprovação
Reopro	Abciximabe	Janssen Biotech	Fab de IgG1 quimérico	Receptores GPIIb/IIIa	Prevenção de coágulos em angioplastias	1994 (EUA)
ProstaScint	Capromabe pendetide	EUSA Pharma	IgG murino	Antígeno de membrana específico de próstata (PSMA)	Diagnóstico <i>in vitro</i> de câncer de próstata	1996 (EUA)
LeukoScan	Sulesomabe	Immunomedics	Fab murino	Antígeno de reação cruzada não- específico 90 (NCA90)	Diagnóstico por imagem de osteomielite	1997 (UE)
MabThera, Rituxan	Rituximabe	Roche	IgG1 quimérico	Cluster de diferenciação 20 (CD20)	Linfoma não-Hodgkin	1997 (EUA), 1998 (UE)
Simulect	Basiliximabe	Novartis	IgG1 quimérico	Receptor de interleucina-2 (IL-2R)	Prevenção de rejeição de transplante de rim	1998 (EUA), 1998 (UE)
Synagis	Palivizumabe	MedImmune/ AbbVie	IgG1 humanizado	Vírus sincicial respiratório (RSV)	Prevenção de infecção respiratória viral	1998 (EUA), 1999 (UE)
Remicade	Infliximabe	Janssen	IgG1 quimérico	Fator de necrose tumoral alfa (TNF-α)	Doença de Crohn	1998 (EUA), 1999 (UE)
Herceptin	Trastuzumabe	Roche/Genentech	IgG1 humanizado	Receptor de fator de crescimento epidérmico humano 2 (HER2)	Câncer de mama	1998 (EUA), 2000 (UE)
Humira	Adalimumabe	AbbVie	IgG1 humano	Fator de necrose tumoral (TNF)	Artrite reumatóide	2002 (EUA), 2003 (UE)
Xolair	Omalizumabe	Roche/Genentech	IgG1 humanizado	Imunoglobulina E (IgE)	Asma	2003 (EUA), 2005 (UE)
Erbitux	Cetuximabe	Merck KGaA/ Eli Lilly	IgG1 quimérico	Receptor do fator de crescimento epitelial (EGFR)	Câncer colorretal	2004 (EUA), 2004 (UE)
Avastin	Bevacizumabe	Roche/Genentech	IgG1 humanizado	Fator de crescimento endotelial vascular (VEGF)	Câncer colorretal	2004 (EUA), 2005 (UE)
Tysabri	Natalizumabe	Biogen	IgG4 humanizado	Integrina α4	Esclerose múltipla	2004 (EUA), 2006 (UE)

Nome comercial	Nome	Empresa	Formato	Alvo terapêutico	Principal indicação	Ano de Aprovação
Vectibix	Panitumumabe	Amgen/Abgenix	IgG2 humano	Receptor do fator de crescimento epitelial (EGFR)	Câncer colorretal	2006 (EUA), 2007 (UE)
Lucentis	Ranibizumabe	Roche/Genentech	Fab de IgG1 humanizado	Fator de crescimento endotelial vascular (VEGF)	Degeneração macular	2006 (EUA), 2007 (UE)
Soliris	Eculizumabe	Alexion Pharmaceuticals	IgG2/4 humanizado	Proteína do complemento 5 (C5)	Hemoglobinúria paroxística noturna	2007 (EUA), 2007 (UE)
Cimzia	Certolizumabe pegol	UCB Pharma	Fab humanizado peguilado	Fator de necrose tumoral (TNF)	Doença de Crohn, artrite reumatoide	2008 (EUA), 2009 (UE)
Stelara	Ustekinumabe	Janssen-Cilag	IgG1 humano	Interleucina-12/23 (IL-12/23)	Psoríase	2009 (EUA), 2009 (UE)
Ilaris	Canakinumabe	Novartis	IgG1 humano	Interleucina-1β (IL-1β)	Síndrome periódica associada à criopirina (CAPS)	2009 (EUA), 2009 (UE)
Simponi	Golimumabe	Janssen Biotech	IgG1 humano	Fator de necrose tumoral (TNF)	Artrite reumatoide e psoriática, espondilite anquilosante	2009 (EUA), 2009 (UE)
Arzerra	Ofatumumabe	Novartis/Genmab	IgG1 humano	<i>Cluster</i> de diferenciação 20 (CD20) expresso por linfócito B	Leucemia	2010 (EUA), 2009 (UE)
RoActemra, Actemra	Tocilizumabe	Roche/Genentech	IgG1 humanizado	Interleucina-6 (IL-6)	Artrite reumatoide	2010 (EUA), 2009 (UE)
Prolia	Denosumabe	Amgen	IgG2 humano	Ativador de receptor do fator nuclear kappa-B ligante (RANK-L)	Osteoporose	2010 (EUA e UE)
Scintimun	Besilesomabe	CIS Bio International	IgG1 murino	Antígeno de reação cruzada não- específico 95 (NCA95)	Diagnóstico <i>in vivo</i> de locais de inflamação/infecção	2010 (UE)
Yervoy	Ipilimumabe	Bristol-Myers Squibb	IgG1 humano	Proteína associada a linfócito T- citotóxico (CTLA-4)	Melanoma	2011 (EUA e UE)
Benlysta	Belimumabe	Glaxo Group	IgG1 humano	Estimulador de linfócito B (BLyS)	Lúpus	2011 (EUA e UE)
Adcetris	Brentuximabe vedotin	Takeda Pharma	IgG1 quimérico	Cluster de diferenciação 30 (CD30)	Linfoma	2011 (EUA), 2012 (UE)
Perjeta	Pertuzumabe	Roche/Genentech	IgG1 humanizado	Receptor de fator de crescimento epidérmico humano 2 (HER2)	Câncer de mama	2012 (EUA), 2013 (UE)
Kadcyla	Ado-trastuzumabe emtansine	Roche/Genentech	IgG1 humanizado conjugado à citotoxina DM1	Receptor de fator de crescimento epidérmico humano 2 (HER2)	Câncer de mama	2012 (EUA), 2013 (UE)
Abtharax	Raxibacumabe	GSK	IgG1 humano	Bactéria B. anthracis	Infecção por Antrax	2012 (EUA)
Gazyva, Gazyvaro	Obinutuzumabe	Roche/Genentech	IgG1 humanizado, glicoengenheirado	<i>Cluster</i> de diferenciação 20 (CD20) expresso por linfócito B	Leucemia	2013 (EUA), 2014 (UE)

Nome comercial	Nome	Empresa	Formato	Alvo terapêutico	Principal indicação	Ano de Aprovação
Sylvant	Siltuximabe	Janssen Biotech	IgG1 quimérico	Interleucina-6 (IL-6)	Doença de Castleman	2014 (EUA), 2014 (UE)
Cyramza	Ramucirumabe	Eli Lilly	IgG1 humano	Receptor de fator de crescimento endotelial vascular 2 (VEGFR2)	Câncer gástrico	2014 (EUA), 2014 (UE)
Entyvio	Vedolizumabe	Takeda Pharma	IgG1 humanizado	Integrina α4β7	Colite ulcerativa, doença de Crohn	2014 (EUA), 2014 (UE)
Opdivo	Nivolumabe	Bristol-Myers Squibb	IgG4 humano	Recepetor de morte programada 1 (PD-1)	Melanoma	2014 (EUA), 2015 (UE)
Keytruda	Pembrolizumabe	Merck	IgG4 humanizado	Recepttor de morte programada 1 (PD-1)	Melanoma	2014 (EUA), 2015 (UE)
Blincyto	Blinatumomabe	Amgen	Fab biespecífico murino	Cluster de diferenciação 19/3 (CD19, CD3)	Leucemia	2014 (EUA), 2015 (UE)
Repatha	Evolocumabe	Amgen	IgG2 humano	Pró-proteína convertase subtilisina/kexina tipo 9 (PCSK9)	Hipercolesterolemia familiar	2015 (EUA e UE)
Praxbind	Idarucizumabe	Boehringer Ingelheim	Fab de IgG1 humanizado	Anti-coagulante Dabigatran	Efeito reverso ao dabigatran (anti- coagulante)	2015 (EUA e UE)
Portrazza	Necitumumabe	Eli Lilly	IgG1 humano	Receptor do fator de crescimento epitelial (EGFR)	Câncer de pulmão de não pequenas células	2015 (EUA e UE)
Cosentyx	Secukinumabe	Novartis	IgG1 humano	Interleucina-17a (IL-17a)	Psoríase	2015 (EUA e UE)
Nucala	Mepolizumabe	GSK	IgG1 humanizado	Interleucina-5 (IL-5)	Asma eosinofílica	2015 (EUA e UE)
Praluent	Alirocumabe	Sanofi-Aventis	IgG1 humano	Pró-proteína convertase subtilisina/kexina tipo 9 (PCSK9)	Hipercolesterolemia familiar	2015 (EUA e UE)
Darzalex	Daratumumabe	Janssen-Cilag/ Janssen Biotech	IgG1 humano	Cluster de diferenciação 38 (CD38)	Esclerose múltipla	2015 (EUA), 2016 (UE)
Empliciti	Elotuzumabe	Bristol-Myers Squibb	IgG1 humanizado	Receptor membro da família de moléculas ativadoras de sinalização de linfócitos 7 (SLAMF7)	Esclerose múltipla	2015 (EUA), 2016 (UE)
Taltz	Ixekizumabe	Eli Lilly	IgG4 humanizado	Interleucina-17a (IL-17a)	Psoríase	2016 (EUA), 2016 (UE)
Cinqaero, Cinqair	Reslizumabe	Teva Pharmaceuticals	IgG4 humanizado	Interleucina-5 (IL-5)	Asma	2016 (EUA), 2016 (UE)
Lartruvo	Olaratumabe	Eli Lilly	IgG1 humano	Receptor-α de fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGFRα)	Sarcoma de tecidos moles	2016 (EUA), 2016 (UE)
Zinplava	Bezlotoxumabe	Merck	IgG1 humano	Enterotoxina B de C. difficile	Prevenção da infecção por C. difficile	2016 (EUA), 2017 (UE)

Nome comercial	Nome	Empresa	Formato	Alvo terapêutico	Principal indicação	Ano de Aprovação
Tecentriq	Atezolizumabe	Roche/Genentech	IgG1 humanizado	Ligante de morte programada 1 (PD-L1)	Câncer de bexiga	2016 (EUA), 2017 (UE)
Anthim	Obiltoxaximabe	Elusys Therapeutics	IgG1quimérico	Bactéria B. anthracis	Infecção por B. anthracis	2016 (EUA), Em revisão (UE)
Siliq, Lumicef	Brodalumabe	LEO Pharma/ Valeant Pharma	IgG2 humano	Receptor de interleucina-17 (IL-17R)	Psoríase em placas	2017 (EUA e UE)
Dupixent	Dupilumabe	Sanofi-Aventis	IgG4 humano	Receptor de interleucina-4 (IL-4R)	Dermatite Atópica	2017 (EUA e UE)
Besponsa	Inotuzumabe ozogamicin	Pfizer	IgG4 humanizado conjugado a caliqueamicina	Cluster de diferenciação 22 (CD22)	Leucemia linfoblástica aguda	2017 (EUA e UE)
Tremfya	Guselkumabe	Janssen-Cilag/ Janssen Biotech	IgG1 humano	Receptor de interleucina-23 (IL-23R)	Psoríase	2017 (EUA e UE)
Kevzara	Sarilumabe	Sanofi-Aventis	IgG1 humano	Receptor de interleucina-6 (IL-6R)	Artrite reumatóide	2017 (EUA e UE)
Bavencio	Avelumabe	Merck	IgG1 humano	Ligante de morte programada 1 (PD-L1)	Carcinoma de células de Merkel	2017 (EUA e UE)
Hemlibra	Emicizumabe	Roche/Genentech	IgG4 humanizado biespecífico	Fator IXa, X	Hemofiilia A	2017 (EUA), 2018 (UE)
Ocrevus	Ocrelizumabe	Roche/Genentech	IgG1 humanizado	Cluster de diferenciação 20 (CD20)	Esclerose múltipla	2017 (EUA), 2018 (UE)
Fasenra	Benralizumabe	AstraZeneca	IgG1 humanizado afucosilado	Receptor de interleucina-5 α (IL-5 α R)	Asma	2017 (EUA), 2018 (UE)
Imfinzi	Durvalumabe	AstraZeneca	IgG1 humano	Recepetor de morte programada 1 (PD-1)	Câncer de bexiga	2017 (EUA), 2018 (UE)
Mylotarg	Gemtuzumabe ozogamicin	Pfizer/Wyeth	IgG4 humanizado conjugado a caliqueamicina	Cluster de diferenciação 33 (CD33)	Leucemia mielóide aguda	2017 (EUA), 2018 (UE)
Aimovig	Erenumabe	Amgen/Novartis	IgG2 humano	Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP)	Prevenção de enxaqueca	2018 (EUA e UE)
Emgality	Galcanezumabe	Eli Lilly	IgG4 humanizado	Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP)	Prevenção de enxaqueca	2018 (EUA e UE)
Crysvita	Burosumabe	Kyowa Kirin	IgG1 humano	Fator de crescimento de fibroblasto 23 (FGF23)	Osteomalacia	2018 (EUA e UE)
Takhzyro	Lanadelumabe	Takeda Pharma	IgG1 humano	Calicreína plasmática	Angioedema hereditário	2018 (EUA e UE)

Nome comercial	Nome	Empresa	Formato	Alvo terapêutico	Principal indicação	Ano de Aprovação
Poteligeo	Mogamulizumabe	Kyowa Hakko Kirin	IgG1 humanizado	Receptor de quimiocina CC tipo 4 (CCR4)	Micose fúngica ou síndrome de Sézary	2018 (EUA e UE)
Ilumya	Tildrakizumabe	Merck	IgG1 humanizado	Subunidade p19 da interleucina-23 (IL-23 p19)	Psoríase em placas	2018 (EUA e UE)
Ajovy	Fremanezumabe	Teva Pharmaceuticals	IgG2 humanizado	Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP)	Prevenção de enxaqueca	2018 (EUA), 2019 (UE)
Ultomiris	Ravulizumabe	Alexion Pharmaceuticals	IgG2/4 humanizado	Proteína do complemento 5 (C5)	Hemoglobinúria paroxística noturna	2018 (EUA), 2019 (UE)
Libtayo	Cemiplimabe	Regeneron	IgG humano	Recepttor de morte programada 1 (PD-1)	Carcinoma de células escamosas da pele	2018 (EUA), 2019 (UE)
Trogarzo	Ibalizumabe, ibalizumabe-uiyk	TaiMed Biologics	IgG4 humanizado	Proteína CD4 de HIV	Infecção por HIV	2018 (EUA), 2019 (UE)
Gamifant	Emapalumabe, emapalumabe-lzsg	Sobi	IgG1 humano	Interferon-gama (IFNg)	Linfo-histiocitose hemofagocítica	2018 (EUA), Em revisão (UE)
Lumoxiti	Moxetumomabe pasudotox	AstraZeneca	IgG1 murino conjugado a imunotoxina dsFv	Cluster de diferenciação 22 (CD22)	Leucemia de células pilosas	2018 (EUA), NA (UE)
Cablivi	Caplacizumabe	Sanofi Genzyme	Nanoanticorpo biespecífico humano	Fator de von Willebrand	Púrpura trombocitopênica	2019 (EUA), 2018 (UE)
Skyrizi	Risankizumabe	AbbVie	IgG1 humanizado	Subunidade p19 da interleucina 23 (IL-23 p19)	Psoríase em placas	2019 (EUA e UE)
Polivy	Polatuzumabe vedotin	Genentech	IgG1 humano conjugado à bendamustina	Cluster de diferenciação 79 b (CD79b)	Linfoma difusivo de células B grandes	2019 (EUA), Em revisão (UE)
Evenity	Romosozumabe	Amgen	IgG2 humanizado	Esclerostina	Osteoporose pós-menopausa	2019 (EUA), NA (UE)
Beovu	Brolucizumab, brolucizumab-dbll	Novartis	Fragmento variável (scFv) humanizado	Fator de crescimento endotelial vascular A (VEGFA)	Degeneração macular relacionada à idade	2019 (EUA), Em revisão (UE)
Pendente	Crizanlizumab	Novartis	IgG2 humanizado	P-selectina ou CD62	Anemia falciforme	Em revisão (EUA e UE)
Pendente	Teprotumumab	Horizon Therapeutics	IgG1 humano	Receptor de fator de crescimento semellhante à insulina (IGF-1R)	Doença ocular associada à tireóide	Em revisão (EUA), NA (UE)
Pendente	Enfortumabe vedotin	SeattleGenetics	IgG1 humano conjugado à monometil auristatina E	Nectina-4	Câncer de bexiga	Em revisão (EUA), NA (UE)

Nome comercial	Nome	Empresa	Formato	Alvo terapêutico	Principal indicação	Ano de Aprovação
Pendente	Eptinezumabe	Alder Biopharmaceuticals	IgG1 humanizado	Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP)	Prevenção de enxaqueca	Em revisão (EUA), NA (UE)
Pendente	Leronlimabe	CytoDyn	IgG4 humanizado	Receptor CC de quimiocina tipo 5 (CCR5) do HIV	Infecção por HIV	Em revisão (EUA), NA (UE)
Pendente	Sacituzumabe govitecan	Pfizer	IgG1 humanizado conjugado à irinotecano SN-38	Antígeno da superfície celular de trofoblastos 2 (TROF-2)	Câncer de mama triplo-negativo	Em revisão (EUA), NA (UE)
Pendente	Satralizumabe	Roche	IgG2 humanizado	Receptor de interleucina-6 (IL-6R)	Distúrbios do espectro da neuromielite óptica	Em revisão (EUA e UE)
Pendente	Narsoplimabe	Omeros Corporation	IgG4 humano	Serina protease associada à lectina de ligação à manana (MASP-2)	Síndrome hemolítica urêmica atípica	Em revisão (EUA), NA (UE)
Pendente	Tafasitamabe	MorphoSys AG	IgG1 humanizado	Cluster de diferenciação 19 (CD19)	Linfoma difusivo de células B grandes	Em revisão (EUA), NA (UE)
Pendente	[fam-]Trastuzumabe deruxtecan	Daiichi Sankyo	IgG1 humanizado conjugado à um inibidor de topoisomerase I	Receptor de fator de crescimento epidérmico humano 2 (HER2)	Câncer de mama metastástico	Em revisão (EUA), NA (UE)

1.2.1. Hipercolesterolemia familiar e anticorpos monoclonais inibidores de PCSK9

As doenças cardiovasculares representam a principal causa de mortalidade em todo o mundo e estima-se que o número de mortes causadas mundialmente por estas desordens chegue a 23,3 milhões em 2030 (WHO, 2015). No Brasil, por exemplo, estas doenças foram responsáveis por cerca de 390 mil mortes registradas somente em 2017 (CARDIOMETRO, 2019). Elevados níveis de colesterol LDL (lipoproteína de baixa densidade) na circulação sanguínea estão diretamente relacionados com um aumento de cerca de 50% no risco de surgimento de aterosclerose e de doenças cardiovasculares (YUSUF *et al.*, 2004).

Os fármacos sintéticos da classe das estatinas foram introduzidos na década de 1980 para a redução dos níveis de colesterol e são hoje, o tratamento de primeira escolha. Estes medicamentos inibem a enzima HMG-CoA redutase (3-hidroxi-3-metil-glutaril-coenzima A redutase), responsável pela formação de colesterol no fígado, e estimulam a produção de receptores de LDL (LDLR). Entretanto, apesar do uso disseminado destes medicamentos, cerca de 20% dos pacientes ainda sofre com severos efeitos colaterais ou não consegue obter uma redução adequada dos seus níveis de LDL (NORDESTGAARD et al., 2013; LIN et al., 2018).

Indivíduos portadores da hipercolesterolemia familiar (HF) são um grupo de pacientes, nos quais as estatinas não conseguem reduzir adequadamente os níveis de LDL. A HF é uma desordem genética grave caracterizada pela concentração anormal de colesterol LDL (> 190 mg/dL) na corrente sanguínea e pelo desenvolvimento de doenças cardíacas mesmo em indivíduos jovens. A HF está geralmente associada a mutações no gene que codifica o receptor de LDL (LDLR). Entretanto, pode também ser causada por mutações no gene APOB que expressa a Apolipoproteína B-100 (parte proteica da LDL que interage com o LDLR), ou ainda pela super expressão do gene da pró-proteína convertase subutilisina/kexina tipo 9 (PCSK9), que leva a uma diminuição na quantidade de LDLR em células hepáticas (FARNIER, 2014). A HF atinge de 1 em cada 250 pessoas e estima-se que haja entre 14 e 34 milhões de portadores desta doença em todo o mundo, incluindo cerca de 800 mil brasileiros. Apesar da elevada incidência, cerca de 90% dos portadores desta desordem permanecem sem diagnóstico. A HF é responsável por 5 a 10% dos casos de doenças arteriais coronarianas em indivíduos com menos de 55 anos de idade. Os indivíduos do sexo masculino portadores de HF sem tratamento possuem uma chance 50% maior de infartar antes dos 50 anos, enquanto as mulheres têm uma chance 30% maior de infartar antes dos 60 anos. A HF é uma desordem autossômica dominante, que pode ser homo ou heterozigótica. No caso da

HF de natureza heterozigótica (HFHe), o tratamento é feito pela combinação de elevadas doses de diferentes drogas (estatinas com outras classes de drogas, por ex. ezetimiba) com exercícios físicos e alimentação controlada. Já a HF de natureza homozigótica (HFHo) é considerada a forma mais grave e rara da doença, atingindo 1 em cada 160.000 pessoas no mundo. Neste casos, os níveis de LDL são tão elevados, que às elevadas doses de diferentes drogas, aos exercícios e à alimentação controlada, soma-se a necessidade de aférese de LDL (um processo similar à diálise) e ocasionalmente de transplante de fígado (STOCK, 2015; NORDESTGAARD et al., 2013; EAS, 2014, SANTOS et al., 2012, FH FOUNDATION, 2015).

Neste contexto, a aprovação recente de biofármacos para redução de níveis elevados de colesterol, baseados em mAbs completamente humanos inibidores da enzima PCSK9, como os produtos Repatha[®] (evolocumabe/Amgen) e Praluent[®] (alirocumabe/Sanofi), surge como um tratamento eficiente alternativo ou complementar às tradicionais estatinas para os portadores de HF. Estes medicamentos, produzidos por processos biotecnológicos envolvendo o cultivo de células da linhagem CHO (*Chinese hamster ovary*) geneticamente modificadas, inibem a enzima PCSK9, uma serina protease descoberta por ABIFADEL et al. (2003), que está fortemente envolvida no controle dos níveis de colesterol LDL no organismo. As reduções significativas nos níveis de LDL e poucos efeitos colaterais observados nos vários estudos clínicos desses medicamentos geraram grandes expectativas. Esses produtos podem ser usados em substituição às estatinas ou juntamente a elas, visto que ambos os medicamentos se baseiam em diferentes mecanismos de ação (GESKE et al., 2015).

Em condições normais, as moléculas de LDL circulantes na corrente sanguínea se ligam ao LDLR presente nas membranas das células hepáticas, o que induz a degradação das mesmas pelo processo de endocitose. No citoplasma, o LDLR ligado à LDL se funde ao endossomo e, enquanto a LDL é levada ao lisossomo para degradação, o receptor é reciclado e retorna à membrana plasmática. A reciclagem dos receptores faz com que a LDL seja removida da corrente sanguínea com uma alta taxa, propiciando baixos níveis de colesterol. A PCSK9 é uma serina protease envolvida na regulação da homeostase do colesterol LDL, produzida predominantemente no fígado, intestino e rins, que atua como modulador negativo do LDLR. A estrutura da PCSK9 consiste basicamente em um peptídeo sinal, um pró-domínio e um domínio catalítico, contendo uma porção C-terminal rica em resíduos de cisteína e histidina. Esta é sintetizada como um precursor inativo com aproximadamente 72 kDa, que sofre clivagem por autocatálise entre o pró-

domínio e o domínio catalítico, sendo que o pró-domínio permanece ligado à proteína em sua forma madura, e trafega na célula entre seus compartimentos, regulando sua atividade enzimática. Nesse trânsito, a PCSK9 interfere na regulação do receptor de LDLR, formando um complexo com o mesmo, na membrana celular, que após ser endocitado favorece a degradação lisossomal do receptor, resultando no aumento no nível de LDL circulante (FDA, 2015; FERREIRA et al., 2012; HORTON et al., 2007). O mecanismo de regulação de LDL envolvendo a presença ou ausência da PCSK9 pode ser visualizado na Figura 2. Neste contexto, a utilização de mAbs capazes de inibir a PCSK9 permite que mais receptores de LDL estejam disponíveis para captação e processamento de LDL, possibilitando assim, uma redução dos níveis de colesterol (FERREIRA et al., 2012; LAMBERT et al., 2012). Vários estudos clínicos de fase 2 e 3 realizados nos últimos anos com o evolocumabe e o alirocumabe confirmaram a sua eficácia na redução de elevados níveis de colesterol. Os estudos mostraram que o uso do evolocumabe em adição às estatinas reduziu o nível de colesterol LDL entre 54 e 71% em pacientes com doenças cardiovasculares, em 61% em pacientes com HF de origem heterozigótica e em até 31% em pacientes com HF homozigótica. Além disso, também foi observado que a incidência de eventos cardiovasculares decresceu de 2,18% para 0,95% (SABATINE et al., 2015; FALA, 2016).

A ANVISA concedeu, em abril de 2016, o registro do produto Repatha[®] (evolocumabe) no Brasil. A empresa Amgen possui duas patentes protegendo este produto, previstas para expirarem em 2029. Um estudo de viabilidade técnico-econômica sobre a implantação de uma planta nacional de produção de um biossimilar do produto Repatha[®] demonstrou que este biofármaco poderia ser produzido no Brasil, com um investimento estimado total de US\$ 95 milhões e indicou viabilidade econômica mesmo em cenários adversos (LIMA, 2016). De acordo com dados do SUS, o Brasil gasta cerca de R\$ 8 bilhões por ano com a importação de biofármacos, representando aproximadamente 51% dos gastos com medicamentos adquiridos pelo governo, embora os mesmos representem apenas 4% das unidades adquiridas, o que demonstra a distorção provocada pelo elevado custo destes produtos (NBN BRASIL, 2017). Portanto, desenvolver tecnologias nacionais que permitam a produção deste tipo de produto no País, a menores custos, é de grande interesse tanto para o SUS, quando para a garantia de acesso da população a estes medicamentos biológicos de alto valor agregado.



Figura 2. Mecanismo de regulação do LDLR pela PCSK9. Quando os níveis de PCSK9 estão elevados, ocorre a indução de degradação do LDLR nos lisossomos e aumento dos níveis séricos de LDL. Na ausência de PCSK9, o LDLR na superfície celular endereça as partículas LDL para degradação em endossomos ácidos e, em seguida, o receptor é reciclado de volta à superfície celular. Adaptado de LIN et al. (2018).

Neste contexto, o produto Repatha[®] (evolocumabe) foi utilizado como produto de referência neste estudo para o desenvolvimento de um candidato a biossimilar. Para o desenvolvimento deste mAb inovador, inicialmente camundongos transgênicos, produtores de imunoglobulinas humanas, foram imunizados com PCSK9. Em seguida, linhagens de hibridomas foram geradas fusionando células tumorais murinas com os plasmócitos obtidos dos linfonodos desses camundos transgênicos (PMDA, 2015). Um processo de seleção celular foi feito e o clone mais promissor identificado. Os genes codificantes para as regiões variáveis das cadeias leves e pesadas das imunoglobulinas G humanas secretadas por este clone foram devidamente sequenciados e clonados em dois plasmídeos distintos contendo as regiões constantes das cadeias leves e pesadas de uma IgG2 humana. Para a obtenção de clones recombinantes da linhagem de células CHO (*Chinese hamster ovary*) foi feita a co-transfecção com os dois plasmídeos construídos, contendo separadamente os genes das cadeias leves e pesadas da IgG2.

Sendo assim, este medicamento consiste em uma IgG2 humana anti-PCSK9 produzida por células CHO recombinantes. Sua estrutura possui aproximadamente 144 kDa, contendo duas cadeias pesadas do tipo gama 2 (com 441 aminoácidos cada), com um sítio de N-glicosilação no resíduo de asparagina na posição 291, e duas cadeias leves do tipo lamba (com 215 aminoácidos cada). Suas indicações incluem o tratamento de HFHe, HFHo e prevenção de doenças cardiovasculares, como aditivo a dietas e ao uso de estatinas. O produto é formulado em solução (contendo prolina, polisorbato 80, acetato e, hidróxido de sódio para ajustar o pH para 5,0) a 140 mg/mL para administração subcutânea duas vezes por semana. O modo de ação deste mAb não envolve funções efetoras associadas à porção Fc, e consiste na simples neutralização da PCSK9 solúvel (EMA, 2015). A estrutura primária de aminoácidos do produto Repatha[®] está detalhadamente apresentada na Figura 3.

Cadeia pesada do evolocumabe

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVS<mark>C</mark>KAS<u>GYTLTSYG</u>ISWVRQAPGQGLEWMGW<u>VSFYNGNT</u> NYAQKLQGRGTMTTDPSTSTAYMELRSLRSDDTAVYY<mark>CARGYGMDV</mark>WGQGTTVTVSSAS TKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS SVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQF**N**STFRVVSVLTVV HQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH

Legenda: _____ CDR _____ Região de dobradiça (*hinge) ______* Região codificante C-terminal da cadeia pesada (CHS) N*: sítio de N-glicosilação (N291)

Cadeia leve do evolocumabe

ESALTQPASVSGSPGQSITIS<mark>C</mark>TGT<u>SSDVGGYNS</u>VSWYQQHPGKAPKLMIY<u>EVSN</u>RPSGVSNRF SGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYY<mark>C</mark>NSYTSTSMVFGGGTKLTVLG</mark>QPKAAPSVTLFPPSSEELQ ANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRS YSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

Legenda: —— CDR Região variável-Lambba (1-109) Região constante-Lambda (110-215) 🛱 cisteína (pontes dissulfeto)

Figura 3. Sequência de aminoácidos do produto comercial Repatha[®]. Os principais domínios e regiões das cadeias leve e pesada estão anotados conforme dados da base IMGT (2019).
1.3. Processo de produção de biofármacos

Para o desenvolvimento de biofármacos, como os mAbs, são requeridas basicamente seis etapas principais: (1) geração de linhagens celulares estáveis e altamente produtivas, através da inserção do(s) gene(s) que codifica(m) a proteína de interesse no genoma da célula hospedeira, seguida de seleção com antibióticos e isolamento de clones; (2) cultivo das células, geralmente realizado em biorreatores do tipo tanque agitado em meios de cultivo quimicamente definidos, sempre partindo de uma alíquota do banco celular criopreservado; (3) purificação da proteína de interesse, realizada em geral por uma série de etapas cromatográficas e de processos de inativação/remoção virais que visam à obtenção de um produto extremamente puro e isento de contaminantes críticos; (4) caracterização estrutural, físico-química e biológica detalhada da proteína terapêutica para obtenção de informações sobre atributos críticos de qualidade; (5) formulação do produto purificado, visando à manutenção da estrutura e atividade biológica do biofármaco até a administração nos pacientes, através da adição de excipientes específicos; (6) ensaios *in vivo* (pré-clínicos e clínicos), que garantem a eficácia, segurança, farmacodinâmica e farmacocinética do produto em sistemas biológicos. A seguir, cada uma destas etapas será discutida em maiores detalhes, focando mais especificamente nos mAbs.

1.3.1. Desenvolvimento de linhagens celulares

O desenvolvimento de linhagens de células de mamíferos recombinantes compreende uma série de etapas, como exemplificado na Figura 5. Inicialmente, é necessária a obtenção da sequência de DNA ou de aminoácidos que codifica a proteína de interesse, que pode ser feita pela consulta de bancos de dados de sequências, patentes ou documentos regulatórios. Preferencialmente, o gene de interesse deve ser obtido por síntese química, permitindo não só a otimização de códons para uma determinada célula hospedeira, mas também garantindo a ausência de mutações, íntrons, sítios de restrição indesejáveis, dentre outros. Em seguida, o gene heterólogo deve ser inserido em um vetor, geralmente um plasmídeo. Existem diversas estruturas possíveis para os plasmídeos e as mesmas afetam diretamente a expressão proteica, mas em geral, plasmídeos de expressão em células de mamíferos contêm três cassetes principais para: (1) a expressão do gene de interesse; (2) expressão de um gene de seleção, que permita o isolamento da população que efetivamente integrou o conteúdo do plasmídeo de forma estável em seu genoma; (3) replicação em células procarióticas, permitindo a expansão e obtenção de grandes quantidades do vetor.

A construção desses vetores pode ser feita através de técnicas clássicas de biologia molecular, como, digestão com enzimas de restrição e ligação com a enzima DNA ligase. O terceiro passo envolve a etapa de transfecção, em que o vetor é transferido para as células hospedeiras, sendo diferentes métodos aplicáveis, com a transfecção mediada por lipídeos catiônicos (lipofecção) um dos métodos mais populares. Posteriormente, as células são cultivadas na presença de um agente de seleção e só aquelas que expressam o gene marcador de seleção e, potencialmente, o gene de interesse, conseguem sobreviver. Em seguida, as células selecionadas são isoladas individualmente e expandidas para dar origem a populações clonais, que são avaliadas quanto à sua capacidade de expressão do biofármaco. Os clones mais produtivos são selecionados e aqueles que apresentam as melhores características de crescimento, estabilidade e produtividade são escolhidos para a produção em maior escala, em frascos agitados e em biorreatores. Além disso, também é feita a criopreservação dos clones gerados (BANDARANAYAKE E ALMO, 2014; HUNTER et al., 2019).



Figura 4. Etapas do processo típico de geração de linhagens clonais para produção de biofármacos. As principais considerações para cada etapa estão apresentadas. GC: guanina-citosina; IRES: sítio interno de entrada ribossomal. Adaptado de HUNTER et al., 2019.

Para a produção de uma IgG em células eucarióticas, as cadeias leves e pesadas são sintetizadas separadamente, ainda como polipeptídios desenovelados. Posteriormente, estas são translocadas para o lúmen do retículo endoplasmático (RE), onde são modificadas e agrupadas em sua estrutura conformacional heterodimérica característica. Para a finalização do processamento da glicosilação em sua porção Fc, a IgG formada também é transportada para o aparelho de Golgi, de onde é posteriormente secretada (LI et al., 2007). Sendo assim, para expressão de mAbs recombinantes, diversos genes devem ser expressos simultaneamente: o gene da HC, o gene da LC e um gene de seleção, usado para o isolamento da população que expressa o conteúdo do vetor de forma estável.

A produção industrial de mAbs é geralmente baseada na integração aleatória dos genes heterólogos no genoma da célula hospedeira, através de três abordagens principais: (1) cotransfecção com dois vetores (um contendo a sequência da HC e o outro a da LC); (2) utilização de um plasmídeo policistrônico com múltiplos promotores (um para a HC, outro para a LC e um terceiro para o marcador de seleção); (3) utilização de um plasmídeo policistrônico mediado por elementos IRES (sítio interno de entrada ribossomal). Dentre essas três abordagens, a co-expressão via dois vetores distintos é considerada a menos eficiente, devido à possível inserção dos genes em regiões genômicas totalmente distintas, o que afeta a eficiência transcricional e aumenta as chances de expressão desequilibrada de LC e HC e de geração de células não-produtoras resistentes ao marcador de seleção. Já a utilização de vetores com múltiplos promotores pode resultar em interferências transcricionais entre as diferentes unidades de expressão (RITA COSTA et al., 2010; WURM, 2004; LAI et a., 2013).

Sendo assim, a expressão de mAbs por um único vetor policistrônico contendo elementos IRES apresenta-se como uma opção bastante interessante. Os elementos IRES são sequências regulatórias de ação cis do RNA que permitem o recrutamento de ribossomos para sítios de iniciação de tradução independentes da região do cap 5'. Elementos IRES de origem viral são amplamente utilizados na expressão de proteínas heterólogas (HELLEN E SARNOW, 2002). A utilização desses elementos entre os genes a serem expressos reduz a presença de clones resistentes ao antibiótico de seleção que não expressem o gene de interesse, visto que os IRES permitem a expressão de vários genes a partir de um único RNA mensageiro (mRNA). Outra vantagem importante reside no fato de que a escolha de diferentes elementos IRES permite modular o nível de tradução de cada uma das proteínas codificadas pelo mesmo mRNA. Esta propriedade é muito

importante para a produção de mAbs, já que variações na razão de expressão LC:HC podem impactar na expressão do anticorpo bem como em sua qualidade. O excesso de cadeias pesadas, por exemplo, pode induzir a formação de agregados. Além disso, a utilização de IRES atenuados a montante dos marcadores de seleção pode ser uma opção efetiva para aumentar o rigor de seleção, favorecendo a obtenção de células mais produtivas. Sendo assim, a seleção do elemento IRES correto dentro do contexto experimental pode ajudar no aumento da expressão e na manutenção da qualidade de mAbs (GONZALEZ et al., 2002; JIANG et al., 2006; LAI et a., 2013; HO et al., 2012).

No desenvolvimento de linhagens recombinantes, existem gargalos relacionados à baixa expressão da proteína-alvo em populações altamente heterogêneas e a instabilidade gênica das células recombinantes geradas (CHAI et al., 2018). Por essa razão, várias estratégias foram desenvolvidas para aumentar a produtividade de células de mamíferos recombinantes como: amplificação gênica (VORONINA et al., 2016; NOH et al., 2018; AKBARZADEH-SHARBAF et al., 2013; FAN et al., 2012); integração sítio-dirigida (NEHLSEN et al., 2009; INNISS et al., 2017; BAUMANN et al., 2017; QIAO et al., 2009); recombinação mediada por transposon (BALASUBRAMANIAN et al., 2016; AHMADI et al., 2017; MATASCI et al., 2011; BALASUBRAMANIAN et al., 2011); aumento/avaliação da rigidez de seleção por antibióticos ou seleção dupla (HO et al., 2012; YEO et al., 2017; CHEN et al., 2004; WIRTH, 1997; YANG et al., 2018); diferentes desenhos de vetores (BAYAT et al., 2018; LI et al., 2007); co-expressão mediada por IRES (HO et al., 2012; HO et al., 2013b; CHAI et al., 2018; LI et al., 2007); coexpressão mediada por sítios de clivagem de furina (HO et al., 2013a); diferentes peptídeos sinal (HARYADI et al., 2015; ZHOU et al., 2016); modificação de promotores (QUILICI et al., 2012; ROCHA-PIZAÑA et al., 2017); uso de elementos moduladores de cromatina (ZHAO et al., 2017; NEVILLE et al., 2017; HARRAGHY et al., 2011); otimização de códons para a célula hospedeira (CARTON et al., 2007; KALWY et al., 2006); tecnologia de CRISPR/Cas9 (RAAB et al., 2019; INNISS et al., 2017); regulação por microRNA (GAMMELL et al., 2007; FISCHER et al., 2017); regulação induzida pelo sistema cumate gene-switch (POULAIN et al., 2017; MULLICK et al., 2006); engenharia metabólica (COST et al., 2010; YAMANE-OHNUKI et al., 2004), dentre outros.

No presente estudo, além da construção de vetores de expressão tricistrônicos mediados por elementos IRES, cujas vantagens já foram mencionadas, a investigação de diferentes peptídeos

sinal e de genes de resistência a antibióticos também foi realizada. Uma etapa limitante dentro da via secretória clássica é a translocação para o lúmen do RE de proteínas que serão secretadas. O peptídeo sinal é uma pequena sequência de 5 - 30 aminoácidos presente nas regiões N-terminais de proteínas nascentes e que é reconhecida por partículas reconhecedoras de sinal no citoplasma, levando ao direcionamento da proteína ao RE (EGEA et al., 2005; NAGAI et al., 2003). Já foi demonstrado que diferentes peptídeos sinal podem conduzir a uma secreção de proteína mais elevada (HARYADI et al., 2015).

Outro aspecto importante para a geração de linhagens recombinantes estáveis com elevada produtividade é o sistema de seleção empregado. Existem vários marcadores de seleção disponíveis para uso com células de mamíferos. Atualmente, a maioria das proteínas terapêuticas aprovadas, incluindo os mAbs, é produzida pela tecnologia de amplificação gênica baseada na inibição de enzimas essenciais para o metabolismo celular, como a diidrofolato redutase (DHFR) e a glutamina sintetase (GS), com as drogas metotrexato (MTX) e metionina sulfoximina (MSX), respectivamente. Nesta abordagem, células deficientes na produção destas enzimas são empregadas como linhagem hospedeira, sendo transfectadas com o gene de interesse em conjunto com o gene da enzima deficiente (LAI et al., 2013; MATASCI et al., 2008). Genes de resistência a antibióticos também são frequentemente utilizados na obtenção de linhagens recombinantes estáveis. Os mais comuns são os genes que codificam a neomicina fosfotransferase (Neo); a higromicina B fosfotransferase (Hyg); e a puromicina N-acetil-transferase (Puro), assim como os genes de resistência à zeocina (Zeo) e à blasticidina (Bla). Cada um deles possui mecanismos de ação distintos que podem afetar a expressão da proteína de interesse (YEO et al., 2017).

1.3.2. Produção

Atualmente, as células de mamíferos são as plataformas mais utilizadas na produção industrial de inúmeros biofármacos, incluindo os mAbs. Isto ocorre porque, ao contrário dos sistemas de expressão baseados em bactérias, leveduras e plantas, as células animais possuem o maquinário intracelular necessário para realizar as modificações pós-tradução críticas para a estrutura e função da maioria das proteínas complexas. Além disso, estas células são capazes de secretar a proteína de interesse para o meio de cultivo, facilitando os processos de recuperação e purificação destas biomoléculas. Embora existam várias linhagens utilizadas para a produção de mAbs recombinantes, como hibridomas, células NSO, Sp2/0, BHK (*baby hamster kidney*), HEK-293 (*human embryonic kidney*) e PER.C6, as células CHO são as dominantes, sendo utilizadas

para a expressão de 84% dos mAbs terapêuticos aprovados nos últimos 5 anos (BANDARANAYAKE E ALMO, 2014; WALSH, 2018). Isto se deve a uma série de vantagens proporcionadas por esta linhagem celular, como: (1) capacidade de realizar modificações póstradução, como glicosilação, de forma semelhante às modificações de proteínas humanas nativas; (2) adaptação robusta ao cultivo em suspensão em meios de cultivo quimicamente definidos e livres de soro, permitindo a produção e purificação mais eficiente e segura de biofármacos; (3) conhecimento abrangente sobre o seu genoma e metabolismo, (4) segurança, visto que possui baixa suscetibilidade aos principais vírus que afetam humanos; e (5) histórico bem estabelecido de produtos aprovados nas principais agências regulatórias mundiais, facilitando o processo de aprovação de novos produtos ou biossimilares produzidos por esta linhagem celular (BANDARANAYAKE E ALMO, 2014; XU et al., 2011; WURM, 2004).

O cultivo destas células é preferencialmente realizado em suspensão, devido à maior facilidade de ampliação de escala, em meios de cultivo ricos, quimicamente definidos e livres de qualquer componente de origem animal, como o soro fetal bovino (SFB), utilizando-se biorreatores. Para cultivos em maior escala, é comum o uso de biorreatores de tanque agitado, equipamentos capazes de controlar o ambiente físico-químico necessário para o cultivo *in vitro* eficiente das células em termos de: temperatura, pH, troca de gases adequada (suprimento de O₂ e eliminação do excesso de CO₂), suprimento de nutrientes e manutenção da assepsia. O crescimento celular em biorreatores também depende do modo de operação empregado. Existem, basicamente, quatro modos de operação para o cultivo de células animais em biorreatores: (1) batelada, (2) batelada alimentada; (3) contínuo e (4) perfusão, como observado na Figura 6 (CHICO et al., 2008; ZHANG et al., 2012; CASTILHO e MEDRONHO, 2002).



Figura 5. Esquema dos diferentes modos de operação de biorreatores. Adaptado de CASTILHO e MEDRONHO, (2002).

A batelada consiste em um processo descontínuo de simples execução, em que o meio de cultivo contendo os nutrientes necessários para o crescimento celular é fornecido apenas no início do processo, com o volume de trabalho mantido constante. Geralmente uma curva de crescimento clássica composta pelas fases lag, exponencial, estacionária e de declínio pode ser observada ao longo do cultivo. O crescimento celular e a geração de produtos de interesse são limitados pelo esgotamento de substratos do meio (como glicose e glutamina) e pelo acúmulo de metabólitos tóxicos (como lactato e amônio). Na batelada alimentada, ocorre uma adição controlada, contínua ou em pulsos, de uma solução concentrada de nutrientes (meio de alimentação ou *feed*) ao conteúdo do biorreator permitindo estender o cultivo e atingir maiores concentrações de células e de produtos. O desenvolvimento de um processo em batelada alimentada inclui, tipicamente, a otimização da composição do meio de alimentação, da estratégia de alimentação e do controle de parâmetros de funcionamento do biorreator em diferentes estágios de crescimento.

A principal desvantagem destes dois modos descontínuos é o longo tempo de residência do produto de interesse no sistema, que, mesmo sendo estável (como os mAbs), pode ser parcialmente degradado por proteases liberadas pelas células mortas. Neste contexto, o modo contínuo e o de perfusão são preferíveis, pois em ambos os casos os produtos podem ser coletados continuamente. No modo contínuo ocorrem, simultaneamente, a entrada de meio de cultivo fresco e a saída de meio de cultivo contendo células, o que mantém o volume de trabalho constante. A constante remoção de células do sistema, associada à baixa velocidade de crescimento de células de mamíferos, ocasiona baixas concentrações celulares e baixas produtividades. Já a perfusão consiste em um modo contínuo com reciclo celular que utiliza um dispositivo de retenção celular. Este modo de operação, embora mais complexo, possibilita elevadas concentrações celulares e altas produtividades volumétricas. O sistema de perfusão geralmente inclui um biorreator, um tanque de meio para a alimentação contínua do biorreator, um tanque de colheita para receber continuamente o perfundido, e um dispositivo de retenção celular. Existem vários dispositivos de retenção celular que podem ser usados para o cultivo de células animais, como centrífugas, sedimentadores gravitacionais, hidrociclones e filtros, que idealmente devem funcionar de forma eficiente ao longo de todo o período de cultivo, sem causar danos às células nem afetar a produtividade destas (CHICO et al., 2008; ZHANG et al., 2011; CARVALHO e CASTILHO, 2017).

Dentre estes modos de operação, a batelada, a batelada alimentada e a perfusão são os mais empregados industrialmente para a produção de mAbs (GAUGHAN, 2015). Os avanços no desenho de vetores de expressão, na obtenção de linhagens celulares clonais de alta produtividade específica, na composição dos meios de cultivo e na operação dos biorreatores permitiram que elevadas concentrações de mAbs fossem alcançados em escala industrial. A produção de mAbs por células CHO recombinantes em biorreatores operados em batelada pode alcançar concentrações de ~1 g/L, enquanto que nos processos em batelada alimentada pode chegar a 1-10 g/L. Em processos em perfusão, por sua vez, concentrações de células viáveis superiores a 2 x 10⁸ cels/mL e concentrações de mAb acima de 27 g/L já foram reportadas (KUNERT E REINHART, 2016). A demanda por processos biotecnológicos mais eficientes e de menor custo para a produção de biofármacos tem impulsionado a aplicação de processos contínuos e até mesmo integrados (associando os processos de cultivo e purificação) na indústria, que já são considerados uma tendência para o setor biofarmacêutico (WALTHER et al., 2015; WARIKOO et al., 2012; CARVALHO e CASTILHO, 2017).

1.3.3. Purificação

O processo de purificação de biofármacos é bastante complexo e geralmente envolve várias etapas de cromatografia líquida e de remoção/inativação viral, principalmente devido aos elevadíssimos graus de pureza requeridos pelas agências regulatórias para produtos de utilização humana. Por esta razão, o chamado processamento downstream, que engloba tais etapas sofisticadas de purificação, pode representar direta ou indiretamente até 80% dos custos de produção de biofármacos (HANKE E OTTENS, 2014; MELLADO E CASTILHO, 2008; HAGEL et al., 2008; HUNT et al., 2001). As etapas de purificação permitem não só a obtenção de biofármacos com elevada pureza e qualidade, mas também a remoção das principais impurezas relacionadas ao processo ou ao próprio produto, tais como DNA residual; proteínas da célula hospedeira (HCP); endotoxinas; vírus endógenos e adventícios, agregados proteicos, isoformas indesejáveis ou formas degradadas do produto, a níveis aceitáveis (GUIOCHON E BEAVERB, 2011; MELLADO E CASTILHO, 2008). A cromatografia é um método de separação de alta resolução, no qual os componentes de uma mistura são distribuídos entre duas fases, que estão em contato íntimo. Uma das fases permanece estacionária (fase estacionária), enquanto a outra se move através dela em uma determinada direção (fase móvel). Durante a passagem da fase móvel através da fase estacionária, os componentes da mistura são distribuídos pelas duas fases de tal

forma que resulte em migrações diferenciais desses componentes. A otimização das etapas cromatográficas deve ser realizada para garantir o melhor equilíbrio entre pureza, rendimento, produtividade e custos (COLLINS et al., 2006; HAHN, 2012).

O processo de purificação típico de um mAb envolve a etapa de clarificação do sobrenadante de cultivo celular, uma captura do mAb a partir do sobrenadante extremamente eficiente utilizando a cromatografia de afinidade por proteína A, seguida de pelo menos duas etapas de polimento, geralmente por cromatografia de troca catiônica (CEX) e de troca aniônica (AEX), para remoção de impurezas remanescentes; bem como incubação em baixo pH e nanofiltração para inativação/remoção viral, como esquematizado na Figura 7. A primeira etapa de purificação envolve a clarificação do sobrenadante de cultivo celular contendo o mAb de interesse, através da remoção de células e debris celulares e do preparo do material de partida para as corridas cromatográficas. Os principais métodos de clarificação são a centrifugação e a filtração, e outras estratégias menos convencionais incluem a floculação ou precipitação (LIU et al. 2010).



Figura 6. Etapas do processo de purificação típico de anticorpos monoclonais terapêuticos. Adaptado de SHUKLA et al. (2007); RATHORE (2009).

A cromatografia de afinidade (AC) consiste na separação de moléculas com base numa interação reversível entre a proteína alvo e um ligante específico imobilizado em uma matriz cromatográfica. Esta técnica apresenta um elevado poder de separação, permitindo a obtenção de proteínas com elevada pureza e alto rendimento. Por esta razão, é ideal para as primeiras etapas de purificação (captura), possibilitando o isolamento e a concentração de proteínas presentes em grandes volumes de misturas complexas e a remoção de contaminantes. Neste processo cromatográfico, a amostra encontra-se em condições de pH e força iônica que favorecem a adsorção específica da proteína ao ligante imobilizado. Os compostos presentes na amostra, que majoritariamente possuem pouca ou nenhuma interação com o ligante de afinidade, passam diretamente pela matriz cromatográfica, resultando em um patamar de alto sinal no UV, 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 (HAGE, 2012; GE HEALTHCARE, 2004a).

A cromatografia de afinidade por proteína A é o principal método de escolha para a purificação industrial de anticorpos. A interação entre a proteína A (proteína de aproximadamente 42 kDa encontrada na parede celular de *Staphylococcus aureus*) e a porção Fc de IgGs humanas é altamente específica, permitindo a ligação de até duas moléculas de mAbs por molécula de proteína A, com rendimentos elevados (95 - 99%) (GRAILLE et al., 2000; SHUKLA et al., 2007). Apesar dos esforços para o desenvolvimento de métodos alternativos à cromatografia de afinidade por proteína A para a captura de mAbs, como, por exemplo, a utilização de cromatografia multimodal (MARIA et al., 2015) ou de floculação (MCNERNEY et al., 2015), e das preocupações com o desprendimento da proteína A da matriz cromatográfica, baixa durabilidade e alto custo (tipicamente superior a US\$ 10.000/ L), as grandes empresas farmacêuticas continuam utilizando a proteína A para purificação de mAbs (RATHORE, 2009; LIU et al. 2010). Além disso, nos últimos anos, as resinas de proteína A vêm sendo ainda mais aprimoradas, tornando-se mais resistentes e altamente porosas, combinando altas capacidades adsortivas e vazões elevadas (MEHTA, 2016).

Além da captura inicial dos mAbs por cromatografia de afinidade por proteína A, geralmente duas outras etapas cromatográficas são empregadas para o polimento (remoção de

contaminantes críticos residuais) das amostras. A cromatografia de troca iônica (IEX) é, sem dúvida, a técnica mais utilizada nos processos de polimento de mAbs. Esta consiste na separação de proteínas com base em suas diferenças de cargas elétricas superficiais. A separação ocorre em condições de pH e força iônica selecionadas para que ocorra interação eletrostática reversível entre regiões carregadas das proteínas presentes na amostra e a matriz cromatográfica carregada com carga oposta. As resinas cromatográficas podem ser carregadas positivamente (trocadoras aniônicas) ou carregadas negativamente (trocadoras catiônicas), caracterizando as cromatografias de troca aniônica (AEX) e de troca catiônica (CEX), respectivamente. Conhecer o ponto isoelétrico (pI) das proteínas é bastante útil para traçar as melhores condições para o processo de purificação por IEX. As proteínas adsorvem à fase estacionária à medida que são alimentadas à mesma. Em seguida, as condições são alteradas, de modo que as moléculas adsorvidas são eluídas separadamente. A eluição é frequentemente realizada aumentando-se a força iônica do tampão, para competir com a proteína pelos locais carregados da matriz, ou alterando-se o pH para mudar a carga global da proteína (GE HEALTHCARE, 2004b; SHUKLA et al., 2007; HAGEL et al., 2008). Para a purificação de mAbs com pI básico (maioria dos mAbs), a CEX é geralmente empregada após a purificação por proteína A no modo bind-elute, auxiliando na remoção de agregados, isoformas de carga, DNA residual, HCP, partículas virais e resíduos de proteína A. Já a AEX é geralmente empregada como última etapa cromatográfica de purificação no modo flowthrough ou de "cromatografia negativa", em que as impurezas, como DNA residual, HCP, endotoxinas, agregados e uma variedade de vírus adsorvem à matriz, enquanto o mAb é recuperado no efluente da etapa de alimentação. Em alguns casos, as cromatografias de interação hidrofóbica (HIC) e pseudo-afinidade por hidroxiapatita também podem ser utilizadas no polimento de amostras de mAbs (LIU et al. 2010; SHUKLA et al., 2007).

Por fim, em relação às etapas de inativação ou remoção viral, é recomendado pelas agências regulatórias que pelo menos duas etapas ortogonais, ou seja, baseadas em princípios distintos, sejam empregadas para garantir o menor risco possível de contaminação viral do produto final. Considerando que os mAbs são eluídos das resinas de proteína A com tampões de baixo pH e que estas moléculas são relativamente estáveis por um período definido a condições acídicas, o emprego da etapa de incubação de mAbs em baixo pH é amplamente utilizado como uma das etapas de inativação viral. Já a nanofiltração viral é utilizada como etapa complementar a

inativação viral por baixo pH, auxiliando na remoção de vírus baseada em tamanho (LIU et al. 2010; SHUKLA et al., 2007).

1.3.4. Caracterização

A caracterização de biofármacos, sejam eles inovadores ou biossimilares, consiste na extensa avaliação de suas propriedades estruturais, físico-químicas, biológicas e imunoquímicas, além do seu perfil de impurezas, por meio de diversas técnicas analíticas já bem descritas na literatura. Os estudos de caracterização inicial ou comparativa envolvem uma ampla gama de técnicas e instrumentação de ponta para determinação de várias características das proteínas como: pureza, massa molecular, estrutura primária, estruturas de ordem superior (secundária, terciária e quaternária), estabilidade térmica e coloidal, heterogeneidade de carga e tamanho, modificações pós-tradução (N-glicosilação, ligações dissulfeto), modificações adicionais (desamidação, oxidação), vias de degradação, perfil de impurezas, propriedades biológicas e imunoquímicas (KIRCHHOFF et al., 2017; BERKOWITZ et al., 2012; KÁLMÁN-SZEKERES et al., 2012). Um resumo das principais técnicas empregadas para a caracterização de biofármacos pode ser observado na Tabela 2.

Categoria	Atributos críticos de qualidade	Métodos analíticos empregados
Estrutura primária	 Composição de aminoácidos Sequenciamento N/C terminal Mapeamento peptídico Massa intacta 	Análise de aminoácidos, degradação de Edmam, LC-MS (proteína intacta e subunidades), mapeamento peptídico por RP-HPLC ou LC-MS/MS
Estruturas de maior ordem	 Estrutura secundária Estrutura terciária Estrutura quaternária Estabilidade 	Espectroscopias de CD, Fluorescência, FTIR, Raman, DLS, DSC, RMN e cristalografia de raios- X, HDX e ensaios biológicos
Heterogeneidade de cargas	 pI % isoformas básicas, acídicas e principais Variantes (oxidação, deamidação, glicação) 	Eletroforese bidimensional, CE, IEF, IEX-HPLC
Heterogeneidade de tamanho	 Massa molecular/tamanho LMMS HMMS Partículas sub-visíveis e visíveis 	SDS-PAGE (em condições redutoras e não-redutoras), CE, MS, AUC, SEC-HPLC, DLS, SLS, MFI, inspeção visual

Tabela 2. Principais ensaios analíticos utilizados na caracterização de biofármacos. Adaptado de KÁLMÁN-
SZEKERES et al. (2012); KIRCHHOFF et al. (2017).

Categoria	Atributos críticos de qualidade	Métodos analíticos empregados
Perfil cromatográfico	 Carga Hidrofobicidade Hidrofilicidade Afinidade Tamanho 	IEX-HPLC RP-HPLC, HIC-HPLC HILIC-HPLC AC-HPLC SEC-HPLC
Glicosilação	 Perfil qualitativo de glicanos % fucosilação, galactosilação, sialilação Sítios de glicosilação 	HILIC-HPLC, LC-MS/MS
Pontes dissulfeto	 Localização e conectividade de grupos sufidril Tióis livres 	LC-MS/MS (em condições redutoras e não-redutoras)
Demais modificações pós-tradução	 Fosforilação/sulfatação/carboxilação Acetilação/metilação/ubiquitinação Adição de grupos ou ligações químicas 	HPLC (IEX, RP, AC), IEF, CE, LC- MS, LC-MS/MS
Impurezas	DNA residualHCPEndotoxinas	Hibridização, ELISA, Western blot
Propriedades imunoquímicas	Identidade/Pureza	ELISA, Western blot, imunoprecipitação
Ligação à proteína-alvo e a outros receptores	 Ligação a proteína-alvo (solúvel) Ligação aos receptores de Fc (FCRn, FcγR) 	SPR, BLI, ELISA
Atividade biológica/efetora	 Ligação a proteína-alvo (de membrana) Atividade CDC Atividade ADCC Apoptose 	Ensaios <i>in vitro</i> com células específicas

Tabela 2. Principais ensaios analíticos utilizados na caracterização de biofármacos. (Continuação)

Abreviações - AC: cromatografia de afinidade; ADCC: citotoxicidade celular dependente de anticorpos; AUC: ultracentrifugação analítica; BLI: interferometria de bio-camada; CD: espectroscopia de dicroísmo circular; CDC: citotoxicidade dependente de complemento; CE: eletroforese capilar; DLS: espalhamento dinâmico da luz; DSC: calorimetria diferencial de varredura; ELISA: ensaio imunoenzimático em fase sólida; HDX: troca hidrogênio/deutério; HIC: cromatografia de interação hidrofóbica; HILIC: cromatografia líquida de interação hidrofóbica; HILIC: cromatografia líquida de alta eficiência; IEF: focalização isoelétrica; IEX: cromatografia de troca iônica; FTIR: espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier; LC: cromatografia líquida; LMMS: espécies de baixa massa molecular; MFI: imageamento de micro-fluxo; MS: espectrometria de massas; MS/MS: espectrometria de massas sequencial; pI: ponto isoelétrico; NMR: ressonância magnética nuclear; RP: fase reversa; SDS-PAGE: eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio; SEC: cromatografia de exclusão molecular; SLS: espalhamento estático da luz; SPR: ressonância plasmônica de superfície.

A estrutura primária das proteínas é definida pela sequência linear de aminoácidos da cadeia polipeptídica, ordenada a partir de sua região amino-terminal para a sua região carboxiterminal. Os produtos biossimilares devem ter uma estrutura primária idêntica ao seu produto de referência. Atualmente, o uso da cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas sequencial (LC-MS/MS) tem dominado o processo de sequenciamento de proteínas, que pode ser realizado por duas abordagens proteômicas: (1) *bottom up*, em que proteína é identificada após a proteólise de seus peptídeos por enzimas específicas (mapeamento peptídico) e (2) *top down/middle down*, em que proteínas intactas são analisadas. As duas abordagens geram resultados complementares, facilitando uma caracterização mais completa dos biofármacos (ICH Q6B, 1999; KÁLMÁN-SZEKERES et al., 2012; BERKOWITZ et al., 2012; KIRCHHOFF et al., 2017).

Diversas técnicas espectroscópicas estão associadas à análise das estruturas de ordem superior das proteínas. A espectroscopia de dicroísmo circular (CD), por exemplo, é uma técnica amplamente utilizada na identificação de elementos de estrutura secundária das proteínas, como α -hélice, folha β , voltas e estruturas randômicas. As espectroscopias de FTIR e Raman também são métodos de baixa resolução interessantes para avaliar a estrutura secundária/terciária de biofármacos. Já a espectroscopia de fluorescência é bastante útil para investigação da estrutura terciária, informando sobre os perfis de enovelamento através da fluorescência intrínseca de determinados resíduos de aminoácidos específicos (triptofano, tirosina e fenilalanina) ou da fluorescência extrínseca de sondas que auxiliam na identificação de transições estruturais nos biofármacos. A estabilidade térmica e coloidal (propensão à formação de agregados) das proteínas geralmente é investigada pelas técnicas de calorimetria diferencial de varredura (DSC) e espalhamento dinâmico da luz (DLS), que informam sobre a conformação global de proteínas. A cristalografia de raios-X e a ressonância magnética nuclear (NMR) são técnicas de alta resolução utilizadas para a determinação da estrutura tridimensional das proteínas. Entretanto, devido a questões envolvendo limitações na análise de proteínas com alta massa molecular em solução por NMR e à elevada complexidade experimental das mesmas, estas metodologias não são usadas como rotina para a análise de biofármacos (ICH Q6B, 1999; KÁLMÁN-SZEKERES et al., 2012; BERKOWITZ et al., 2012; KIRCHHOFF et al., 2017).

A identificação e caracterização dos principais tipos de modificações pós-tradução (PTMs) também faz parte da caracterização estrutural dos biofármacos. Existem diversos tipos de PTMs, como a glicosilação, sulfatação, fosforilação, formação de pontes dissulfeto, entre outras. Todas

estas afetam diretamente a atividade ou conformação das proteínas terapêuticas e, portanto, devem ser devidamente analisadas. Tipicamente, para os mAbs a N-glicosilação, as pontes dissulfeto e as modificações de carga, hidrofobicidade e tamanho causadas por processos de deamidação, oxidação, glicação, dentre outros, são as principais PTMs a serem avaliadas. A Figura 8 resume as principais vias de degradação de mAbs e seus impactos na estrutura dos mesmos. A N-glicosilação na porção Fc de mAbs desempenha em geral um papel importante na estabilidade estrutural e atividade biológica/efetora, como previamente mencionado. O perfil e quantificação das principais espécies de N-glicanos geradas pela digestão de mAbs com a enzima PNGase F podem ser facilmente obtidos por cromatografia líquida de alta resolução de interação hidrofílica (HILIC-HPLC), enquanto os sítios de glicosilação podem ser identificados por LC-MS/MS. A formação de pontes dissulfeto intra e intercadeias é fundamental para a manutenção da estrutura tridimensional de mAbs e geralmente também é estudada pelo uso de LC-MS/MS em condições redutoras e não redutoras (ICH Q6B, 1999; KÁLMÁN-SZEKERES et al.,2012; BERKOWITZ et al., 2012; KIRCHHOFF et al., 2017).

A pureza e a heterogeneidade de tamanho de biofármacos (monômeros, espécies de baixa massa molecular – LMMS, espécies de alta massa molecular – HMMS) são geralmente avaliadas pelas técnicas de cromatografia líquida de alta eficiência de exclusão molecular (SEC-HPLC) e eletroforese capilar (CE). Já as heterogeneidades de cargas, como conteúdo de isoformas principais, acídicas e básica, e o ponto isoelétrico (pI) das proteínas terapêuticas podem ser investigados por focalização isoelétrica capilar (cIEF) ou cromatografia líquida de alta eficiência de troca iônica (IEX-HPLC) (ICH Q6B, 1999; KÁLMÁN-SZEKERES et al.,2012; BERKOWITZ et al., 2012; KIRCHHOFF et al., 2017).



Figura 7. Principais modificações e vias de degradação de anticorpos monoclonais terapêuticos. As setas indicam os principais sítios de degradação. Adaptado de NOWAK et al. (2017) e HIGEL et al. (2016).

As impurezas podem estar associadas ao processo ou ao próprio produto biofarmacêutico e devem ser devidamente caracterizadas. Aquelas derivadas do processo de fabricação podem ser classificadas em três categorias principais: (1) impurezas associadas à linhagem celular, como HCP e DNA residual; (2) impurezas associadas ao cultivo *in vitro*, como antibióticos, SFB e outros componentes do meio de cultivo; e (3) impurezas associadas ao processo de purificação, como reagentes químicos, bioquímicos, sais e solventes, utilizados na composição dos tampões, além de ligantes cromatográficos (como proteína A ou anticorpos monoclonais). Já as impurezas relacionadas ao produto são variantes moleculares do biofármaco que são geradas durante o processo e/ou estocagem. Os principais tipos são produtos de degradação da proteína terapêutica, como formas truncadas ou modificadas (oxidadas, por exemplo), e agregados proteicos, que são de grande relevância devido à geração de respostas imunológicas não desejadas (ICH Q6B, 1999; KÁLMÁN-SZEKERES et al.,2012; BERKOWITZ et al., 2012; KIRCHHOFF et al., 2017).

Além disso, informações sobre as propriedades imunoquímicas, ligação à proteína-alvo e funções biológicas também precisam ser incluídas na caracterização de proteínas terapêuticas. A atividade biológica refere-se à capacidade específica do produto de promover um efeito biológico definido. No caso de IgGs com função efetora, além da análise da cinética de ligação com a proteína-alvo, geralmente feita pela técnica de ressonância plasmônica de superfície (SPR), a avaliação de respostas imunes efetoras como, ADCC e CDC, e da ligação à receptores de Fc específicos é fundamental. Os ensaios biológicos podem ser bioquímicos ou baseados no uso de animais ou no

cultivo de células específicas (ICH Q6B, 1999; KÁLMÁN-SZEKERES et al., 2012; BERKOWITZ et al., 2012; KIRCHHOFF et al., 2017).

A caracterização de biofármacos permite a identificação de atributos críticos de qualidade (CQAs), que afetam a qualidade, eficácia e segurança do produto, além da melhor definição de estratégias de controle de qualidade. Existem vários estudos na literatura discutindo sobre a avaliação de comparabilidade de diferentes mAbs biossimilares, como: rituximabe (VISSER et al., 2013; LEE et al., 2018; NUPUR et al., 2017; XU et al., 2019), adalimumabe (LEE et al., 2019; VELAYUDHAN et al., 2016), infliximabe (HONG et al., 2016; BEYER et al., 2018) e etanercept (CHO et al., 2016). O acesso público aos dados de caracterização é extremamente importante para o desenvolvimento de biossimilares. A caracterização analítica detalhada é obrigatória em diferentes etapas do processo de produção de biofármacos, como desenvolvimento inicial, ensaios clínicos, licenciamento do produto e durante alterações pós-comercialização, além de ser crucial para o processo de aprovação de produtos biossimilares (KIRCHHOFF et al., 2017).

1.3.5. Formulação

O principal objetivo do desenvolvimento de uma formulação é converter a proteína recombinante purificada (princípio ativo) em um medicamento eficaz e estável durante as etapas de armazenamento, transporte e, principalmente, para a administração em pacientes. A primeira etapa do desenvolvimento de uma formulação é a chamada pré-formulação, que engloba a determinação das principais propriedades físico-químicas e vias de degradação da proteína-alvo. Isso permite a seleção racional de excipientes (substâncias farmacologicamente inertes usadas como veículos e estabilizadores do princípio ativo) e condições (pH, força iônica, temperatura) que garantam a melhor estabilidade proteica nas condições de armazenamento desejadas (KAMERZELL et al., 2011).

As proteínas são entidades termodinamicamente instáveis em solução e altamente suscetíveis à degradação durante as várias etapas de seu processo de produção (cultivo, purificação, formulação, armazenamento, transporte), o que pode afetar drasticamente a sua potência biológica e levar a respostas imunogênicas não desejadas. Existem vários fatores que podem induzir a degradação química ou física de proteínas terapêuticas como: agitação, exposição à luz, pH, temperatura, ciclos de congelamento/descongelamento, força iônica, oxigênio atmosférico, composição de formulações, dentre outros. A degradação química está geralmente associada a modificações a nível de ligações covalentes, como a deamidação de resíduos de Asn,

isomerização de resíduos de asparagina, oxidação de resíduos de metionina, proteólise da cadeia polipeptídica, desorganização de pontes dissulfeto. Já a degradação física envolve diversas vias de alteração conformacional causadas por desnaturação, agregação, adsorção superficial ou precipitação das proteínas (ALSENAIDY et al., 2014a; RATORE E RAJAN, 2008).

Para o desenvolvimento de formulações, diferentes métodos analíticos, tais como os descritos na seção 1.3.4., são utilizados para monitorar a integridade físico-química do produto purificado na presença de diferentes excipientes farmacêuticos. O emprego de ensaios de degradação forçada e de estabilidade acelerada permite a elucidação dos mecanismos de degradação do produto ao longo do tempo em diferentes temperaturas e formulações. A compreensão dos efeitos do período de armazenamento (curto ou longo) e dos diferentes excipientes em diferentes condições ambientais é fundamental para a comparação de formulações. Neste contexto, a utilização de técnicas de alta capacidade está cada vez mais difundida industrialmente para uma avaliação rápida do maior número de formulações possível com um gasto relativamente baixo de proteínas (ALSENAIDY et al., 2014a; RATORE E RAJAN, 2008; KAMERZELL et al., 2011). A Figura 9 mostra um esquema das principais etapas usadas para o desenvolvimento de formulações eficientes. Inicialmente, um grande número de experimentos em potencial é desenhado, geralmente envolvendo diferentes tipos de excipientes e condições (pH, temperatura, força iônica). A técnica do planejamanto experimental pode ser utilizada para a definição mais robusta das melhores condições a serem estudas. Em seguida, o emprego da robótica auxilia na preparação de centenas de amostras líquidas antes do processo de caracterização físico-química usando diversos métodos analíticos. Estes métodos geralmente permitem o uso de microplacas de 96 ou 384 poços. Por fim, as grandes quantidades de dados gerados são então analisadas por diferentes métodos matemáticos avançados como, por exemplo, os diagramas empíricos de fases (EPD) (KIM et al., 2012; MADDUX et al., 2011). Isso permite uma interpretação integrada e mais precisa dos dados das diferentes técnicas empregadas, facilitando a seleção de formulações mais eficientes para a manutenção da estabilidade do produto biológico em questão.



Figura 8. Etapas para o desenvolvimento de formulações de proteínas. DLS: espalhamento dinâmico de luz; DSC: calorimetria de varredura diferencial; ITC: calorimetria de titulação isotérmica; DSF: fluorescência de varredura diferencial; CD: espectroscopia de dicroísmo circular, UV/Vis: espectroscopia de absorção ultravioleta/visível; EPD: diagrama empírico de fase; PCA/SVD: análise de componentes principais/decomposição de valores singulares. Adaptado de KAMERZELL et al. (2011).

Para o desenvolvimento de uma formulação, somente os excipientes que sejam essenciais para a atividade e estabilidade do produto devem ser incluídos e, para isto, alguns fatores importantes devem ser analisados, como: o tipo de produto; a via, dose e frequência de administração; as propriedades físico-químicas dos excipientes; as potenciais interações com outros componentes do produto; a forma de apresentação (líquida ou liofilizada); e o tipo de recipiente em que o produto será armazenado (JORGENSEN et al., 2009). A estabilidade conformacional (enovelamento proteico) e coloidal (propensão à agregação) das proteínas pode ser afetada de forma independente por diferentes excipientes, por isso um balanço entre estes dois tipos de estabilidade deve ser alcançado para o desenvolvimento racional de formulações eficientes (ALEKSEYCHYK et al., 2014). A Tabela 3 resume as principais classes de excipientes usados em formulações de produtos biofarmacêuticos e suas funções.

Considerando a grande relevância terapêutica dos mAbs e de produtos deles derivados, um estudo realizado por KANG et al. (2016) resumiu os principais excipientes usados nestes produtos, tanto em formulações líquidas, quando liofilizadas (Tabela 4). Os excipientes das classes de tampões, sais, surfactantes, osmólitos (polióis/açúcares), aminoácidos e antioxidantes são os mais utilizados. Os trabalhos de KAMERZELL et al. (2011) e OHTAKE et al. (2011) fornecem revisões extremamente detalhadas que podem ser consultadas para mais informações sobre os mecanismos de ação de cada uma das classes de excipientes usados na formulação de produtos biológicos.

Tabela 3. Principais excipientes utilizados na formulação de proteínas terapêuticas. Adaptado de KAMERZELL et al. (2011).

Categorias	Exemplos	Funções
Tampões	Citrato, acetato, histidina, fosfato, sulfato, tris	Mantêm o pH adequado da solução
Aminoácidos	Histidina, arginina, glicina, prolina, lisina, metionina	Atuam como agentes tamponantes, de tonicidade, estabilizantes e antioxidantes
Osmólitos	Sacarose, trealose, sorbitol, glicina, prolina, glutamato, glicerol, ureia	Atuam como estabilizadores naturais de proteínas contra estresses ambientais, como variações de temperatura e desidratação.
Açúcares e carboidratos	Sacarose, trealose, sorbitol, manitol, glicose, rafinose, lactose	Promovem estabilização da proteína no estado líquido e liofilizado e atuam como agentes de tonicidade
Proteínas e polímeros	HSA, gelatina, PVP, PLGA	Atuam como inibidores competitivos da adsorção de proteínas, utilizados na liofilização e como veículos no transporte de drogas
Sais	Cloreto de sódio, cloreto de potássio, sulfato de sódio	Atuam como agentes de tonicidade e possuem efeito estabilizante/desestabilizante em proteínas
Surfactantes	Polisorbato 20, Polisorbato 80, Polaxamer 188	Inibem por competição a adsorção e a desnaturação superficial de proteínas
Quelantes e antioxidantes	EDTA, DTPA, ácido cítrico, aminoácidos (histidina, metionina), ácido ascórbico, glutationa	Atuam como ligantes de íons metálicos e capturam radicais livres
Conservantes	Álcool benzílico, fenol, m-cresol	Previnem o crescimento microbiano em formulações multidose
Outros ligantes	Metais, ligantes, aminoácidos, poliânions	Auxiliam na estabilização da conformação tridimensional e afetam a flexibilidade de proteínas

	Frequência em formulações de mAbs comerciais (%)	
Excipientes	Formulações liofilizadas	Formulações líquidas
Polisorbato 80	45	62
Polisorbato 20	36	12
Polaxamer 188	0	4
Manitol	9	8
Sorbitol	9	0
Sacarose	82	15
Trealose	18	12
Dextrose	9	0
Dextrano 40	9	0
Cloreto de sódio	18	62
Arginina	0	12
Glicina	0	12
Metionina	0	4
Ácido ascórbico	0	4
Acetato de sódio	9	0
Fosfato	27	35
Citrato	9	12
Acetato	0	23
Tris	0	4
Succinato	9	0
Histidina	27	38

Tabela 4. Principais excipientes utilizados na formulação de mAbs terapêuticos. Adaptado de KANG et al. (2016).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

O objetivo geral do presente trabalho foi desenvolver uma plataforma de produção para um anticorpo monoclonal humano inibidor de PCSK9 biossimilar ao produto Repatha[®] (evolocumabe, Amgen), investigando desde a geração de populações recombinantes estáveis de células CHO até a caracterização e formulação do biofármaco produzido.

2.2. Objetivos específicos

Foram objetivos específicos do presente trabalho:

- Construir plasmídeos de expressão tricistrônicos mediados por elementos IRES contendo a sequência gênica das cadeias leve e pesada de um anticorpo monoclonal anti-PCSK9, juntamente com um gene marcador de seleção (Neo ou Hygro);
- Fazer a transfecção de células da linhagem CHO-K1 e a seleção das populações recombinantes estáveis geradas com o respectivo antibiótico por um período de dois meses;
- Caracterizar o perfil de crescimento, metabolismo, produtividade e afinidade por PCSK9 das populações estáveis obtidas;
- Produzir o anticorpo monoclonal através de cultivos em batelada em frascos agitados utilizando a população estável mais promissora;
- Purificar a glicoproteína através de cromatografia de afinidade à proteína A;
- Caracterizar o anticorpo monoclonal produzido de modo comparativo com o biofármaco de referência Repatha[®], empregando diversas técnicas analíticas para determinação da sua identidade, homogeneidade, estruturas primária, secundária e terciária, afinidade pela PCSK9, perfil de cargas, solubilidade, N-glicosilação e propriedades físico-químicas;
- Realizar estudos comparativos de degradação acelerada e estabilidade em diferentes condições de pH e temperatura;
- Avaliar a utilização de excipientes-chave para a formulação de anticorpos monoclonais e analisar comparativamente a estabilidade do produto em diferentes formulações.

3. METODOLOGIA

3.1. Construção dos plasmídeos

Para a expressão do mAb anti-PCSK9, vetores plasmidias triscistrônicos mediados por elementos IRES foram construídos. A sequência de DNA codificante do evolocumabe foi obtida a partir da comparação de informações encontradas em documentos regulatórios do produto Repatha® (WHO, 2013) e na base de dados IMGT® (The International Immunogenetics Information System). Para favorecer a secreção eficiente do mAb, foram selecionados dois potenciais peptídeos sinal para a cadeia leve (L1: com sequência de aminoácidos MDMRVPAQLLGLLLLWLSGARC L2: sequência e de aminoácidos com MKYLLPTAAAGLLLLAAQPAMA) e um para a cadeia pesada (H7: com sequência de aminoácidos MEFGLSWVFLVALFRGVQC), oriundos do trabalho de HARYADI et al. (2015). A escolha do promotor CMV-IE (do inglês, human cytomegalovirus- immediate early gene), dos elementos IRES EMCV (do inglês, encephalomyocarditis virus) selvagem e atenuado, bem como do posicionamento das sequências referentes às cadeias leve e pesada do mAb foi feita com base nos trabalhos de HO e colaboradores (2012, 2013b). Os genes da neomicina fosfotransferase (Neo) e da higromicina B fosfotransferase (Hygro) foram usados como marcadores de seleção. Em seguida, a otimização de códons para expressão em células CHO e a síntese de DNA foram realizadas pela empresa GeneArt (Thermo). Como foram avaliados dois peptídeos sinal para a cadeia leve e dois genes de resistência, foram construídos quatro plasmídeos de expressão baseados no vetor de integração aleatória pCI-neo (Promega). Os três genes foram flanqueados por diferentes sítios de restrição, visando à construção de uma plataforma flexível para a expressão de outros mAbs, como observado na Figura 9A.

Utilizando-se técnicas tradicionais de clonagem molecular o inserto foi ligado ao vetor de integração aleatória pCI-neo. Os vetores recombinantes obtidos foram propagados em culturas de *Escherichia coli* e posteriormente purificados empregando kits comerciais. Todo o trabalho foi monitorado por meio de: quantificação de DNA em espectrofotômetro Nanodrop (Thermo), amplificação de fragmentos por PCR, digestões enzimáticas duplas seguidas de análise por eletroforese em gel de agarose e por sequenciamento de DNA (Genewiz), para confirmação das sequências nas regiões de ligação. Os procedimentos experimentais utilizados para a construção dos vetores de expressão serão detalhados a seguir (sessões 3.1.1 - 3.1.5).

Além da utilização dos plasmídeos circulares resultantes para a transfecção de células CHO, duas outras abordagens foram testadas visando à obtenção de populações estáveis mais produtivas: (1) linearização dos vetores, mediante digestão em um sítio único com a enzima de restrição *BamHI* (New England Biolabs), e (2) seleção dupla com antibióticos através da co-transfecção de plasmídeos expressando cada um dos dois marcadores de seleção, totalizando-se 12 diferentes condições de transfecção (Figura 9B). Os mapas dos vetores sintéticos ou comerciais empregados para a construção dos plasmídeos de expressão do mAb anti-PCSK9 foram desenhados com o auxílio do *Vector NTI Suite 8* (Thermo Fisher) e podem ser observados na Figura 10. As etapas para a construção dos quatro vetores de expressão do mAb anti-PCSK9 foram esquematizadas nas Figuras 11, 12, 13 e 14.



Figura 9. (A) Diagrama do inserto desenhado para expressão de mAbs. Sítios de reconhecimento de enzimas de restrição permitem a manipulação individual de cada gene. Elementos IRES permitem a expressão de vários genes a partir de um único promotor. (B) Estrutura das diferentes construções propostas para expressão do mAb anti-PCSK9 e suas combinações para geração de populações estáveis de células CHO. CMV: citomegalovírus; EMCV: vírus da encefalomiocardite; L1, L2, H7: peptídeos sinal (derivados do trabalho de HARYADI et al., 2015). Neo: gene da neomicina fosfotransferase; Hygro: gene da higromicina B fosfotransferase; C: vetor circular; L: vetor linearizado.



Figura 10. Mapas dos plasmídeos sintéticos e comerciais utilizados neste estudo para a construção dos vetores de expressão do mAb anti-PCSK9. (A) pMA-RQ L1-LC-IRES-H7-HC-IRES-Neo, vetor de transporte contento o inserto sintético L1-LC-IRES_{EMVC}-H7-HC-IRES_{at}-Neo (GeneArt); (B) pMA-T L2-LC, vetor de transporte contento o inserto sintético L2-LC (GeneArt); (C) pCI-neo, vetor comercial de integração aleatória utilizado para a expressão de mAbs em células CHO-K1 (Promega); (D) pCI-hygro, vetor comercial utilizado como molde para amplificação por PCR do gene da higromicina B fosfotransferase (marcador de seleção).



Figura 11. Construção do vetor pCI L1-LC-IRES-H7-HC-IRES-Neo. (A) Mapa do vetor de transporte pMA-RQ L1-LC-IRES-H7-HC-IRES-Neo com sítios de digestão para *Nhel e BamHI*. (B) Mapa do vetor de comercial pCI-neo (Promega) com sítios de digestão para *Nhel e BamHI*. (C) Mapa final do vetor pCI L1-LC-IRES-H7-HC-IRES-Neo (7.611 pb) obtido por meio de ligação do inserto L1-LC-IRES-H7-HC-IRES-Neo no vetor pCI-neo com a enzima T4 DNA ligase. Os tamanhos dos fragmentos de interesse (sublinhados), em pares de base (pb), foram preditos *in silico* com o auxílio do programa *Vector NTI* (Thermo).



Figura 12. Construção do vetor pCI L2-LC-IRES-H7-HC-IRES-Neo. (A) Mapa do vetor de transporte pMA-RQ L1-LC-IRES-H7-HC-IRES-Neo com sítios de digestão para *EcoRI e NheI*. (B) Mapa do vetor de transporte pMA-T L2-LC com sítios de digestão para *EcoRI e NheI*. (C) Mapa do vetor intermediário pMA-RQ L2-LC-IRES-H7-HC-IRES-Neo com sítios de digestão para *EcoRI, BamHI e NheI*. (D) Mapa do vetor de comercial pCI-neo com sítios de digestão para *EcoRI, BamHI e NheI*. (D) Mapa do vetor de comercial pCI-neo com sítios de digestão para *EcoRI, BamHI e NheI*. (D) Mapa do vetor de comercial pCI-neo com sítios de digestão para *EcoRI, BamHI e NheI*. (D) Mapa do vetor de comercial pCI-neo com sítios de digestão para *EcoRI, BamHI e NheI*. (D) Mapa do vetor de comercial pCI-neo com sítios de digestão para beta do vetor pCI L2-LC-IRES-H7-HC-IRES-Neo (7.611 pb) obtido por meio de ligação do inserto L2-LC-IRES-H7-HC-IRES-Neo no vetor pCI-neo com a enzima T4 DNA ligase. Os tamanhos dos fragmentos de interesse (sublinhados), em pares de base (pb), foram preditos *in silico* com o auxílio do programa *Vector NTI* (Thermo).



Figura 13. Construção do vetor pCI L1-LC-IRES-H7-HC-IRES-Hygro. (A) Mapa do vetor de transporte pMA-RQ L1-LC-IRES-H7-HC-IRES-Neo com sítios de digestão para *BamHI e AflII*. (B) Fragmento de PCR referente ao gene da higromicina B fosfotransferase (obtido a partir do vetor comercial pCI-Hygro) com sítios de digestão para *BamHI e AflII*. (C) Mapa do vetor intermediário pMA-RQ L1-LC-IRES-H7-HC-IRES-Hygro com sítios de digestão para *AflII, BamHI e NheI*. (D) Mapa do vetor de comercial pCI-neo com sítios de digestão para *NheI e BamHI*. (E) Mapa final do vetor pCI L1-LC-IRES-H7-HC-IRES-Hygro (7.710 pb) obtido por meio de ligação do inserto L1-LC-IRES-H7-HC-IRES-Neo no vetor pCI-neo com a enzima T4 DNA ligase. Os tamanhos dos fragmentos de interesse (sublinhados), em pares de base (pb), foram preditos *in silico* com o auxílio do programa *Vector NTI* (Thermo).



Figura 14. Construção do vetor pCI L2-LC-IRES-H7-HC-IRES-Hygro. (A) Mapa do vetor de expressão pCI L1-LC-IRES-H7-HC-IRES-Hygro com sítios de digestão para *EcoRI e NheI*. (B) Mapa do vetor de transporte PMA-T L2-LC com sítios de digestão para *EcoRI e NheI*. (C) Mapa final do vetor pCI L2-LC-IRES-H7-HC-IRES-Hygro (7.710 pb) obtido por meio de ligação do inserto L2-LC no vetor pCI L1-LC-IRES-H7-HC-IRES-Hygro com a enzima T4 DNA ligase. Os tamanhos dos fragmentos de interesse (sublinhados), em pares de base (pb), foram preditos *in silico* com o auxílio do programa *Vector NTI* (Thermo).

3.1.1. Transformação e manutenção de bactérias

A linhagem comercial de *E. coli DH5a* quimiocompetente (# C2992I, New England Biolabs) foi utilizada para amplificar os diferentes plasmídeos gerados ao longo deste estudo. Os meios LB e LB ágar (Sigma Aldrich), suplementados com 100 μ g/mL do antibiótico ampicilina (Thermo Fisher), foram utilizados para o cultivo das bactérias recombinantes. O protocolo de transformação usado foi o "High Efficiency Transformation Protocol (C2992)", descrito no site da empresa New England Biolabs. Brevemente, uma alíquota de células quimiocompetentes foi descongelada em banho de gelo. Em um microtubo de 1,5 mL previamente resfriado em gelo, uma

alíquota, de 1 - 5 μ L (~100 ng de DNA) de produto de ligação ou plasmídeo purificado foi adicionada a 50 μ L de células competentes descongeladas. A mistura foi gentilmente homogeneizada e incubada em gelo por 30 min. Em seguida, a suspensão celular foi incubada durante 30 s a 42 °C (em termobloco, Eppendorf) e transferida imediatamente ao gelo, onde foi incubada por mais 5 min. A cada microtubo foram adicionados 950 μ L de meio SOC (extrato de levedura 0,5 % (m/v); triptona 2% (m/v); NaCl 10mM; KCl 2,5mM, MgSO4 20mM; glicose 20% (m/v)) em seguida, os mesmos foram incubados durante 1 h a 37 °C sob agitação a 250 rpm. Para obtenção de colônias únicas, 100 μ L da suspensão celular foram distribuídos homogeneamente em placas de Petri contendo meio LB ágar com ampicilina (100 μ g/mL), com o auxílio de uma alça de Drigalski. As bactérias foram mantidas por 12 h a 37 °C até a observação de colônias únicas.

Os pré-inóculos dos clones de bactérias foram preparados através da coleta de uma colônia única, com auxílio de alça de inoculação estéril, e sua posterior homogeneização em 5 mL de meio LB suplementado com ampicilina. Os cultivos foram realizados em tubos do tipo *Falcon*[®] estéreis de 50 mL com as tampas levemente rosqueadas por no mínimo 6 h a 37 °C sob agitação a 200 rpm. O escalonamento dos cultivos foi feito nas condições supracitadas por 12 h, com a adição dos 5 mL do pré-inóculo à frascos agitados do tipo *erlenmeyer* previamente preenchidos com 100 mL de meio LB. Para a purificação do DNA plasmidial de interesse foi utilizado o kit comercial PureLink[™] HiPure Plasmid Midiprep (# K210004, Thermo Fisher), seguindo as instruções do fabricante. Os vetores de expressão finais foram ainda submetidos à filtração estéril (filtros de seringa de 0,22 µm de tamanho de poro) para evitar possíveis contaminações durante a transfeccção das células CHO-K1.

3.1.2. Eletroforese em gel de agarose

Para o preparo do gel de agarose 1%, 3 g de agarose foram pesados e dissolvidos em 300 mL tampão TAE 1X (Tris base 40 mM; ácido acético 0,11% (v/v); Na₂EDTA 1 mM) mediante aquecimento em micro-ondas. Após o resfriamento, o corante brometo de etídeo foi adicionado a uma concentração final de 1 μ g/mL e a solução vertida em um molde horizontal apropriado para o preparo de géis de agarose. Depois da completa gelificação, o gel foi submerso em uma cuba eletroforética contendo tampão TAE 1X. As amostras de DNA foram misturadas com tampão de amostra 6X (B7024S, New England Biolabs) e aplicadas em cada um dos poços do gel. O padrão de tamanho de fragmento 1 kb Plus (New England Biolabs) foi utilizado. Uma voltagem de 100 V

foi aplicada durante 90 minutos. As bandas de DNA foram observadas em transiluminador de UV (MultiDoc-ItTM Imaging System UVP[®]) e as imagens do gel registradas.

3.1.3. Reação em cadeia da polimerase (PCR)

A técnica de PCR foi utilizada para a amplificação do gene da higromicina B, seleção de colônias de bactérias recombinantes ou validação final dos vetores construídos. A enzima de alta fidelidade PlatinumTM Taq Polimerase (#1666124, Thermo Fisher) e uma solução equimolar de desoxinucleotídeos (dNTPs) 2 mM (dATP, dCTP, dGTP, dTTP, #N0446S, New England Biolabs) foram utilizadas. As reações foram preparadas em microtubos de PCR estéreis de 0,2 mL, utilizando um volume final de reação de 25 µL ajustado com água ultrapura autoclavada, contendo: 2,5 µL de tampão da polimerase 10X; 1 µL de cloreto de magnésio; 2,5 µL de solução de dNTPs; 1 µL de cada oligonucleotídeo iniciador (*primer*), 0,25 µL de DNA polimerase e 2 µL de DNA. As reações foram realizadas em termociclador (Veriti 9902, Applied Biosystems). Os produtos de PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose 1% (m/v) e, quando necessário, purificados utilizando o kit comercial illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification (# 28-9034-70, GE Healthcare) para prosseguir com as etapas seguintes de digestão enzimática. Os oligonucleotídeos iniciadores (primers) utilizados neste ensaio estão listados na Tabela 5. Todos eles foram sintetizados quimicamente pela empresa ThermoFisher. Para o ensaio de PCR de colônia, utilizado para a seleção de colônias de bactérias positivas para os vetores desejados, ponteiras estéreis de 100 µL foram encostadas brevemente às colônias e incubadas por 1 min dentro dos tubos de PCR contendo o mix para a reação.

3.1.4. Digestão de DNA com enzimas de restrição

Para geração de fragmentos específicos de DNA ou validação dos vetores construídos, 1 μg de DNA plasmidial foi digerido com enzimas de restrição (*NheI, BamHI, EcoRI, AflII*), todas da marca New England Biolabs. As reações foram preparadas e conduzidas à temperatura ótima (37 °C), utilizando o respectivo tampão indicado pelo fabricante, durante 2 h. Após a digestão, as amostras foram visualizadas mediante eletroforese em gel de agarose. No caso em que era necessária a recuperação de algum dos fragmentos, as bandas foram excisadas do gel e purificadas utilizando o kit illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification (# 28-9034-70, GE Healthcare), segundo as instruções do fabricante. A predição do tamanho dos fragmentos gerados foi feita com o auxílio do programa *Vector NTI Suite 8* (ThermoFisher).

Oligonucleotídeos	Sequência (5'-3')	Função
LC1_F	CCTGGCCAGTCCATCACCAT	Confirmação da transformação com o vetor de transporte pMA-RO L1-LC-IRES-H7-HC-IRES-
LC1_R	CAGTTCCTCAGAGGATGGGG	neo.
LC2_F	CCTGGCCAGTCCATCACCAT	Confirmação da transformação com o vetor de transporte pMA-T L2-LC.
LC2_R	CAGTTCCTCAGAGGATGGGG	
LC1_neo 1F	GTAAGTATCAAGGTTACAAGACAGG	Confirmação da ligação entre pMA-RQ L1-LC- IRES-H7-HC-IRES-neo e pCI-neo (5') e da ligação
LC1_neo 1R	TACCAGGACACGGAGTTGTA	entre pMA-RQ L1-LC-H7-HC-IRES-HC-IRES-neo e o gene da higromicina B fosfotransferase (5').
LC1_neo 2F	CATTGATGAGTTTGGACAAACC	Confirmação da ligação entre pMA-RQ L1-LC-
LC1_neo 2R	CGGTCACAGCTTGTCTGTAA	IRES-H/-HC-IRES-neo e pCI-neo (3') e da ligação entre pMA-RQ L1-LC-IRES-H7-HC-IRES-neo e o gene da higromicina B fosfotransferase (5').
LC2_pMA 1F	GCAAGGCGATTAAGTTGGGT	Confirmação da ligação entre pMA-T L2-LC e pMA-
LC2_pMA 1R	CAGGACACGGAGTTGTAGCC	RQ L1-LC-IRES-H7-HC-IRES-neo (5')
LC2_pMA 2F	CCGACAGCTCTCCTGTGAAG	Confirmação da ligação entre pMA-T L2-LC e pMA-
LC2_pMA 2R	GGCCCTCACATTGCCAAAAG	RQ L1-LC-IRES-H7-HC-IRES-neo (3 ²).
LC2_Neo_1F	TGTCGAGACAGAGAAGACTCTT	Confirmação da ligação entre pMA-RQ L2-LC-
LC2_Neo_1R	AGCTGATGGTGATGGACTGG	entre pMA-RQ L2-LC-IRES-H7-HC-IRES-neo e o gene da higromicina B fosfotransferase (5').
LC2_Neo_2F	CATTGATGAGTTTGGACAAACC	Confirmação da ligação entre pMA-RQ L2-LC-
LC2_Neo_2R	CGGTCACAGCTTGTCTGTAA	entre pMA-RQ L2-LC-IRES-H7-HC-IRES-neo e o gene da higromicina B fosfotransferase (3').
Hygro B_F	GCTTAAGATGAAGAAACCTGAACTGAC	Amplificação do gene marcador de seleção higromicina B fosfotransferase a partir do vetor pCI-
Hygro B_R	GCGGATCCTTATCGCTATCGATTCACACA	A hygro.

Tabela 5. Oligonucleotídeos iniciadores (primers) utilizados nas reações de PCR.

3.1.5. Ligação de fragmentos de DNA

As reações de ligação foram realizadas durante 16 h a 16 °C utilizando a enzima T4 DNA ligase (#M02025, New England Biolabs). O inserto de interesse e o vetor linearizado (ambos previamente digeridos com enzimas de restrição que geram extremidades coesivas compatíveis para a ligação) foram homogeneizados em diferentes proporções (3:1, 5:1 e 7:1) em um volume final de 20 μ L, contendo 1 μ L da enzima T4 DNA ligase e 2 μ L de seu respectivo tampão 10X. A mistura resultante foi posteriormente usada para a transformação de bactérias *E. coli* quimiocompetentes, conforme descrito em 3.1.1.

3.2. Cultivo e transfecção de células CHO

3.2.1. Linhagem celular e condições de cultivo

Células da linhagem CHO-K1 (ATCC), previamente adaptadas ao cultivo em suspensão, foram cultivadas em meio de cultivo TC-LECC (Xell AG), quimicamente definido e livre de componentes de origem animal ou humana, suplementado com 8 mM de glutamina, 0,1 mg/L de IGF (fator de crescimento semelhante à insulina recombinante), 8 mM HT (hipoxantina e timidina). Os cultivos foram realizados em estufa com atmosfera de 5% de CO₂ e a 37 °C, sob velocidade de agitação de 180 rpm, em agitador com órbita de 5 cm (Innova 2300, New Brunswick). Exclusivamente durante o processo de transfecção, as células CHO-K1 foram mantidas em meio de cultivo CHO-TF (Xell AG), devido à presença, no meio de cultivo TC-LECC, de componentes inibitórios do processo transfecção (informação fornecida pelo fabricante).

3.2.2. Transfecção e geração de populações estáveis

Aproximadamente 1 h antes do processo de transfecção (ou co-transfeccção), células CHO-K1, previamente em cultivo em meio TC-LECC e com elevada viabilidade (> 97%), foram centrifugas a 200 g por 10 min e ressuspensas em meio CHO-TF. Em seguida, as células foram diluídas para a concentração de 1 x 10^6 células viáveis/mL e 2 mL da suspensão celular transferidos, em duplicata, para tubos agitados (*spintubes*, TPP). As células foram mantidas em cultivo sob agitação até o momento da transfecção.

Inicialmente, em microtubos de 1,5 mL estéreis foram preparadas duas misturas para o processo de lipofecção: (1) 1 μ g (0,5 μ g/mL) dos vetores de expressão e 2 μ L (1 μ L/mL) do reagente estabilizador de DNA P3000 (ThermoFisher) foram diluídos em 50 μ L de meio Opti-

MEMTM (Thermo Fisher), de acordo com as condições descritas na Figura 10B; (2) 2 μ L (1 μ L/mL) do lipídeo catiônico Lipofectamine 3000 (ThermoFisher) foram diluídos em 50 μ L de meio Opti-MEMTM (Thermo Fisher). Em seguida, as duas misturas (DNA + lipídeo catiônico) foram combinadas e incubadas por 30 min a temperatura ambiente. Após este intervalo, 50 μ L do complexo formado foram adicionados a cada replicata dos tubos agitados contento as células CHO-K1. As células foram então mantidas em cultivo por 6 h, centrifugadas (200 *g* por 10 min) e diluídas em 2 mL de seu meio de cultivo original, o TC-LECC.

Decorrido o período de 48 h, as células foram novamente centrifugadas e diluídas em meio TC-LECC fresco, contento antibióticos, para dar início ao processo de seleção de populações estáveis que perdurou por 2 meses, com o objetivo de garantir que apenas células efetivamente estáveis sobreviveriam. As células foram diluídas duas vezes por semana em TC-LECC contendo 500 µg/mL de G418 (Gibco), 300 µg/mL de higromicina B (Gibco) ou para a seleção dupla a combinação de 100 µg/mL de G418 e 300 µg/mL de higromicina B. Estas concentrações foram definidas com base em experimentos anteriores realizados no Laboratório de Engenharia de Cultivos Celulares (PEQ/COPPE/UFRJ). Amostras foram retiradas durante todo o processo de seleção para a avaliação do crescimento celular e produção do mAb. Bancos celulares foram preparados a partir das populações estáveis geradas, através da criopreservação das células a -80 °C.

3.2.2. Estudos de cinética em frascos agitados

Os cultivos das populações estáveis geradas (*pools* 1, 2, 3, 4, 8 e 10) foram realizados em batelada, em frascos agitados do tipo *erlenmeyer* de 125 mL, com volume de trabalho de 75 mL. A concentração do inóculo foi de aproximadamente 0,4 x 10⁶ células/mL. Os ensaios foram realizados em duplicata biológica até a redução pronunciável da viabilidade celular. Foram retiradas amostras diariamente para avaliação do crescimento e metabolismo das células. A determinação da concentração celular e da viabilidade foi feita utilizando o contador automático Vi-Cell (Beckman Coulter), via método de exclusão por azul de tripan. As concentrações de glicose (substrato) e lactato (metabólito) presentes no sobrenadante livre de células foram determinadas através do analisador bioquímico YSI 2700 Select (Yellow Springs Instruments) imediatamente após a amostragem.

3.2.3. Produção do anticorpo monoclonal para os ensaios de caracterização e formulação

Para a geração do mAb anti-PCSK9 a partir da população estável 1 (oriunda da transfecção com o vetor circular L1-LC-IRES-H3-HC-IRES-Neo), vários cultivos sucessivos em batelada foram realizados por 7 dias em frascos agitados do tipo de erlenmeyer de 500 mL e com volume de trabalho de 300 mL. O sobrenadante de cultivo celular foi clarificado por centrifugação (1000 g por 10 min) seguida de filtração com membrana de tamanho de poro de 0,22 μ m (Sartopore® 2, Sartorius). O material clarificado foi armazenado a 4 °C até o momento da purificação.

3.3. Purificação por cromatografia de afinidade por proteína A

As corridas cromatográficas foram realizadas no sistema de purificação ÅKTA Purifier (GE Healthcare) que permite o monitoramento em linha de absorvância a 280 nm, condutividade e pH. Os tampões de equilíbrio (fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,4) e de eluição (fosfato de sódio/ácido fosfórico 0,1 M, pH 3,0) usados neste estudo foram baseados no trabalho de CASTILHO et al. (2002), e devidamente filtrados com membranas de tamanho de poro de 0,45 µm (Millipore). A purificação do mAb produzido ocorreu por cromatografia de afinidade por proteína A (Eshmuno[®] A, 5 mL, Merck) a uma vazão de 10 mL/min. Inicialmente, a coluna foi equilibrada com 50 mL de tampão de adsorção. Em seguida, o sobrenadante clarificado oriundo de cultivo celular foi diretamente injetado à coluna, que foi posteriormente lavada com mais 50 mL de tampão de adsorção. O mAb foi eluído com 40 mL de tampão de eluição e monitorado a 280 nm. As frações de 2 mL referentes ao pico do mAb foram coletadas em tubos do tipo *Falcon[®]* e neutralizadas com tampão de adsorção. Após a finalização do processo de purificação, a coluna foi devidamente sanitizada com NaOH 0,1M, lavada com água ultrapura e armazenada a 4 °C condicionada em etanol 20%. As amostras de mAb purificadas foram armazenadas a 4 °C para os ensaios posteriores de caracterização.

3.4. Preparo de amostras para os ensaios biofísicos e bioquímicos comparativos

As amostras de mAbs (produto de referência e biossimilar) foram dialisadas por 2 vezes (6 h + 16 h a 4 °C) contra: (1) tampões citrato-fosfato (CP) 20 mM (pH 3,5 - 7,5, intervalos de 1 unidade) com força iônica ajustada para 0,15 com NaCl ou (2) solução salina tamponada com fosfato (PBS), através de cassetes de diálise *Slide-A-LyzerTM* (massa molecular de corte de 10.000 Da, Thermo Fisher). Para os experimentos de espectroscopia de Raman, as amostras de mAb foram também concentradas para 10 mg/mL por processo de ultrafiltração com filtros Amicon (0,5 mL,

massa molecular de corte de 10.000 Da, Merck). Um lote do produto de referência Repatha[®] (evolocumab, Amgen) foi adquirido no mercado brasileiro como uma solução injetável de 140 mg/mL em canetas pré-preenchidas (lote 1078695, validade: 10/2019).

3.5. Ensaios analíticos para caracterização

3.5.1. Quantificação de anticorpos monoclonais

A concentração do mAb purificado foi medida a 280 nm no espectrofotômetro NanoDrop 2000 (Thermo Fisher), empregando um coeficiente de extinção molar calculado a partir da sequência de aminoácidos do Repatha[®] utilizando a ferramenta de bioinformática *ProtParam* ($\epsilon 0,1\% = 1,37$ (g/ 100 mL)⁻¹cm⁻¹).

3.5.2. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Para as análises preliminares com as diferentes populações estáveis produtoras de mAbs, a eletroforese foi realizada em condições desnaturantes e redutoras utilizando o sistema de eletroforese modular Mini-Protean II Cell (Bio-Rad). Géis de poliacrilamida com espessura de 1,5 mm, foram preparados empregando uma concentração de 5% acrilamida/bisacrilamida para o gel de empilhamento e 12% acrilamida-bisacrilamida para o gel de resolução. As amostras foram diluídas em tampão de amostra (Tris.HCl 50 mM, SDS 2% (m/v), azul de bromofenol 0,1% (m/v), glicerol 10% (v/v)) na proporção de 25% de tampão para 75% de amostra e, posteriormente, aquecidas a 95 °C por 5 min. Na cuba para eletroforese, o gel foi submergido em tampão de corrida (Tris-base 125 mM, glicina 1,25 M, SDS 0,1% (m/v), pH 8,3). Para os experimentos, 30 µL de amostra foram aplicados em cada poço do gel e a corrida realizada por aproximadamente 80 min à voltagem constante de 150 V, empregando-se uma fonte modelo 3000 Xi (Bio-Rad). O padrão de massa molecular utilizado foi o *Precision Dual Color* (Bio-Rad) e como referência para migração de mAbs, foi usada uma IgG comercial derivada de soro humano (#I4506, Sigma-Aldrich). A visualização das bandas foi realizada por meio de coloração com nitrato de prata.

Já para o ensaio comparativo com o produto de referência Repatha[®], 5 µg de cada mAb foram analisadas sob condições redutoras e não-redutoras usando géis NuPAGE 4% - 12% Bis-Tris (Life Technologies) e tampão de corrida MES (Life Technologies). As amostras foram misturadas 1:4 com tampão de amostra 4x NuPAGE-LDS (Life Technologies) e com iodoacetamida (IAA) para uma concentração final de 15 mM (Life Technologies). Para amostras reduzidas, foi adicionado ditiotreitol (DTT) para uma concentração final de 50 mM (Life
Technologies). Todas amostras foram então aquecidas a 70 °C por 10 min. Uma voltagem constante de 150 V foi aplicada por 60 min. A massa molecular foi estimada com base na migração do padrão Novex Sharp (Life Technologies) e coloração do gel feita com *Coomassie blue*.

Para o método de coloração por nitrato de prata, os géis foram submetidos às seguintes etapas sob agitação constante a 320 rpm: (1) fixação durante 2 h (etanol 30% (v/v) e ácido acético 10% (v/v) em água ultrapura); (2) lavagem por 10 min (etanol 30% (v/v) em água ultrapura); (3) nova lavagem por duas vezes durante 10 min em água ultrapura; (4) sensibilização por 5 minutos (tiossulfato de sódio 0,02% (m/v) em água ultrapura); (5) rinsagem por três vezes em água ultrapura; (6) incubação por 30 min em solução de prata (nitrato de prata 0,15% (m/v) em água ultrapura); (7) revelação em função da detecção visual de bandas (carbonato de sódio 3% (m/v); formaldeído 0,05% (v/v) em água ultrapura); (8) incubação por 10 min em solução de parada (ácido acético 5% (v/v) em água ultrapura); (9) lavagem final por 10 min com água ultrapura e por fim; (10) registro fotográfico.

Para a coloração com *Coomassie blue*, os géis foram corados com solução comercial de *Coomassie blue R-250* (Teknova) por 2 h e posteriormente, descorados com uma mistura de metanol 40% (v/v), ácido acético 10% (v/v), em água ultrapura, até a remoção completa do corante. As imagens dos géis foram obtidas usando o sistema de AlphaImager (Protein-Simple).

3.5.3. Ensaios de imunodetecção

Neste estudo, três tipos de ensaios de imunodetecção (*Western blot, spot blot, slot blot*) foram utilizados para confirmar a presença de mAbs humanos no sobrenadante de cultivo celular e em frações cromatográficas.

Para os ensaios qualitativos de *spot/slot blot*, as amostras são totalmente transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Millipore) sem nenhuma separação prévia por massa molecular. No *slot blot*, 300 µL de cada amostra foram filtrados através da membrana por meio da aplicação de vácuo, utilizando o sistema Bio-Dot[®] SF (Bio-Rad), que delimita a área de retenção das amostras a pequenos poços retangulares (*slots*). Já no caso do *spot blot*, somente 5 µL de cada amostra foram pipetados diretamente sobre a membrana difundindo lentamente e formando pequenos círculos. Após a aplicação das amostras, as membranas foram submetidas às etapas de bloqueio, incubação com anticorpos e revelação como descrito abaixo: (1) Bloqueio: a membrana foi incubada com solução de bloqueio (tampão TBS, Tween 20 0,05% (v/v), leite em pó desnatado (Molico) 5% (m/v)) por 1 h sob agitação constante de 320 rpm à temperatura ambiente.

(2) Incubação com anticorpo de detecção: após ser rinsada duas vezes com solução de lavagem 1 (tampão TBS, Tween 20 0,05% (v/v)) a membrana foi incubada por 1 h sob agitação constante de 320 rpm à temperatura ambiente em solução de diluição (tampão TBS, Tween 20 0,05% (v/v), leite em pó desnatado 0,5% (m/v)) contendo: (1) para o *slot blot* - o anticorpo monoclonal anti-IgG Fc humano produzido em camundongo e conjugado à fosfatase alcalina (# 054222, Thermo Fisher) ou (2) para o *spot blot* - o anticorpo policlonal anti-IgG humano (H+L) produzido em cabra e conjugado à peroxidase (# A18805, ThermoFisher).

(3) Lavagem: a membrana foi lavada três vezes por 5 min com solução de lavagem 1 e, em seguida, duas vezes por 5 min com tampão TBS.

(4) Revelação: para os anticorpos de detecção conjugados à fosfatase alcalina, a membrana foi incubada em solução de revelação (Tris base 100 mM, NaCl 100 mM, MgCl2 5 mM, pH 9,5) contendo os reagentes cromogênicos NBT e BCIP (#S3771, Promega) até a detecção do sinal. Após o término da revelação, a membrana foi lavada com água ultrapura e digitalizada. Já no caso dos anticorpos de detecção conjugados à peroxidase, usado nos ensaios de *spot blot*, membrana foi incubada com os reagentes do kit ECLTM Prime (GE Healthcare), segundo as recomendações do fabricante. A detecção do sinal de quimiluminescência foi feita com o auxílio do sistema ChemiDocTM (Bio-Rad). Devido ao uso de anticorpos específicos para IgG humanas, somente detecta-se coloração nas amostras contendo os mAbs anti-PCSK9.

Para o *Western blot*, inicialmente a etapa de eletroforese foi executada. A transferência das proteínas do gel para uma membrana de nitrocelulose foi realizada através da montagem de um "sanduíche" com folhas de papel filtro embebidas no tampão de transferência (Tris base 5,82g/L, glicina 2,93 g/L, solução de SDS (10%) 0,375%, metanol 20% (v/v)), o gel e a membrana na seguinte ordem: (1) catodo do aparelho de transferência; (2) três folhas de papel filtro; (3) gel; (4) membrana de nitrocelulose; (5) três folhas de papel filtro; (6) anodo do aparelho de transferência. A transferência foi feita utilizando-se o aparelho *Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell* (Bio-Rad), com voltagem constante de 15 V por 3 h. Após a transferência, a membrana passou pelas mesmas etapas descritas acima para o imunoensaio de *spot blot*, com revelação com peroxidase.

3.5.4. Cromatografia de exclusão molecular de alta eficiência

Os experimentos de cromatografia de exclusão molecular (SEC) foram realizados usando um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) Shimadzu Prominence equipado com um detector de matriz de fotodiodo e um amostrador automático com temperatura controlada (Shimadzu). Vinte microgramas de cada mAb diluído em PBS foram injetadas em uma pré-coluna TSKgel SWXL (6,0 mm x 40 mm, TOSOH Biosciences), seguida por uma coluna TSK-Gel G3000 SWXL (7,8 mm ID × 30,0 cm, TOSOH Biosciences). A vazão utilizada foi de 0,7 mL/min por um tempo de corrida de 30 min, com a coluna mantida a 30 °C. O tampão fosfato de sódio 0,2 M, pH 6,8 foi utilizado como fase móvel. O sinal de absorvância foi monitorado a 214 nm e a análise dos dados realizada no programa *LC Solutions* (Shimadzu).

3.5.5. Ensaios de afinidade de ligação à PCSK9 in vitro

Para uma avaliação qualitativa da afinidade de ligação dos mAbs produzidos pela PCSK9 foi utilizada uma adaptação do imunoensaio de *slot blot*, previamente descrito em 3.6.3. Resumidamente, 100 ng de PCSK9 recombinante (# 10594H08H25, Thermo Fisher) foram transferidos para uma membrana de nitrocelulose usando um sistema *Bio-Dot*[®] *SF* (Bio-Rad). Após o passo de bloqueio, 2 mL dos mAbs purificados de diferentes populações estáveis geradas foram utilizados como anticorpo primário. Um anticorpo secundário conjugado à fosfatase alcalina (# 054222, Thermo Fisher) foi usado para sondar a ligação dos mAbs à PCSK9 imobilizada.

Adicionalmente, a cinética de ligação das amostras de mAb (referência e biossimilar) à proteína alvo PCSK9 foi caracterizada por detecção óptica via interferometria de bio-camada (BLI) usando o sistema Octet Red 96 (Pall ForteBio) e empregando biossensores de captura *anti-human IgG Fc (AHQ)* (Pall ForteBio). Antes do início do ensaio, as pontas dos sensores foram hidratadas por 20 min em tampão de cinética (HEPES 10 mM, EDTA 3mM, NaCl 150 mM, BSA 1 mg/mL, Tween-20 0,02% (v/v), pH 7,4). Tampões, mAbs (a 2,5 nM) e 7 concentrações tituladas (100 nM - 1,56 nM, em diluições seriadas) de PCSK9 humana recombinante (# 592502, BioLegend) foram carregados em uma placa de 96 poços de fundo preto (Corning), com um volume de 200 µL por poço. O ensaio cinético foi realizado em cinco etapas: (1) Equilíbrio - 120 s com tampão de cinética para obter uma linha de base estável; (2) Carregamento - 300 s de carregamento dos anticorpos anti-PCKS9 para captura pelos biossensores; (3) Equilíbrio/lavagem - equilíbrio de 120 s com o tampão de cinética para remoção dos mAbs não ligados; (4) Associação - 600 s de interação entre a PCSK9 humana e os mAbs anti-PCSK9; (5) Dissociação - 600 s de

incubação com tampão de cinética. Depois disso, as pontas do biossensor AHQ foram regeneradas com 10 ciclos de 10 s em tampão de regeneração (10 mM glicina, pH 1,7), seguidos por 10 s em tampão de cinética. A análise dos dados foi realizada usando o programa Octet Data Analysis v 8.2 (Pall ForteBio). As constantes de associação (k_a) e dissociação (k_{dis}), bem como a constante de dissociação de equilíbrio (K_D) foram obtidas ajustando as curvas resultantes a um modelo de ligação 1:1 (mab:PCSK9).

3.5.6. Mapeamento peptídico

A comparação da sequência primária dos mAbs foi realizada utilizando duas abordagens: (1) análise do perfil cromatográfico dos peptídeos trípticos por cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa (RP-HPLC), (2) análise da composição de aminoácidos do mAb biossimilar por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas sequencial (LC-MS/MS).

Para a análise do perfil cromatográfico dos peptídeos trípticos, 200 µg de mAb em PBS passaram pelo processo de troca de tampão para bicarbonato de amônio 50 mM, pH 7,8, utilizando filtros Amicon de 10 kDa (Merck), que foram centrifugados por 12 min, a 17000 g a 4 °C. Aproximadamente 50 µL de cada amostra foram recuperados e transferidos para tubos de 1,5 mL contendo 400 µL de cloridrato de guanidina 8 M em tampão de bicarbonato de amônio. A redução das ligações dissulfeto foi realizada pela adição de DTT 5 mM e incubação a 70 °C em banhomaria por 40 min. Em seguida, a alquilação das amostras foi realizada por adição de iodoacetamida (IAA) 25 mM e incubação a 45 °C por 45 min. As proteínas foram então lavadas três vezes com tampão de bicarbonato de amônio usando filtros Amicon de 10 kDa. Aproximadamente 70 µg de cada proteína foram digeridos com uma mistura de 20 µg de tripsina e quimotripsina (# T7168, Sigma-Aldrich) e incubados a 37 °C por 14 h. A separação dos peptídeos digeridos das proteases e proteínas não digeridas foi realizada por uma ultrafiltração adicional usando filtros Amicon, como descrito anteriormente. A separação e análise dos peptídeos foram realizadas em um instrumento nanoAcquity UPLC (Waters) acoplado a uma nano-coluna CSH de fase reversa (C18, 150 mm, 75 μm, Waters). As fases móveis usadas foram: ácido fórmico 0,1% (v/v) em água ultrapura (fase A) e acetonitrila contendo ácido fórmico 0,1% (fase B). As soluções contendo os peptídeos foram diluídas 1:1 em solução de ácido fórmico 0,1% (v/v) e 5 µL foram injetados na coluna C18. A separação dos peptídeos trípticos foi realizada com um gradiente linear,

aumentando a fase móvel B de 5 para 60% em 80 minutos. Os dados brutos dos cromatogramas foram exportados e plotados no programa *Origin* (OriginLab Corporation).

Já para a análise da composição de aminoácidos do mAb biossimilar, cerca de 100 µg de mAb purificado foram primeiramente resolvidas em gel de 12% por SDS-PAGE. O gel foi corado com Coomassie blue para permitir a excisão das bandas referentes às cadeias leve e pesada do mAb. As bandas foram inicialmente lavadas com acetonitrila 50% (v/v) em 25 mM de bicarbonato de amônio pH 8,0 e vortexadas por 15 min. O sobrenadante foi descartado e o passo anterior repetido por mais duas vezes. As amostras foram então deixadas na mesma solução por aproximadamente 16 h, para a remoção completa do corante e de resíduos de SDS. No dia seguinte, as bandas de gel foram desidratadas por 5 min com 200 µL de acetonitrila e incubadas em 100 µL de solução de DTT 10 mM em bicarbonato de amônio 25 mM pH 8,0, por 1 h a 56 °C em banho seco. Em seguida, as mesmas foram lavadas por três vezes com 300 µL de tampão bicarbonato de amônio para remoção do excesso de DTT. O sobrenadante das lavagens foi descartado e as bandas incubadas com solução de IAA 55 mM em bicarbonato de amônio 25 mM pH 8,0, por 30 min a temperatura ambiente e protegidas da luz. Logo após esta etapa, o sobrenadante foi descartado e as bandas lavadas por três vezes com 300 µL de tampão bicarbonato de amônio. As bandas foram então novamente desidratadas por duas vezes com 200 µL de acetonitrila pura durante 5 min. Em seguida, as bandas foram incubadas com solução gelada de tripsina a 50 µg/mL (#V5280, Promega) por 10 min em banho de gelo. Por fim, as amostras foram cobertas com mais solução de tripsina (até a cobertura completa das bandas de gel) e digeridas a 37 °C em banho seco por 18 h. No terceiro dia, primeiramente, todo o sobrenadante da digestão foi transferido para novos microtubos e, em seguida, os géis foram incubados com 100 μ L de solução acetona 50% (v/v), ácido fórmico 0,1% (v/v) durante 30 min em banho ultrassônico. O sobrenadante gerado foi também adicionado aos novos microtubos. Logo após este processo, as amostras foram totalmente secas em speedvac e armazenadas a -20 °C. Para a realização das análises foi utilizado um cromatógrafo líquido de ultra alta eficiência (UPLC) modelo nanoAcquity (Waters), acoplado a um espectrômetro de massas de alta resolução com ionização por *electrospray* (ESI) e dois analisadores (quadrupolo e tempo-de-voo) modelo Xevo Q-TOF (Waters). As amostras foram injetadas em uma coluna de fase reversa C18 (BEH 130 C18, 1.7 µm, 75 µm × 150 mm, Waters). As condições operacionais utilizadas no UHPLC e no espectrômetro de massas encontram-se descritas no trabalho de ECHEVARRIA-LIMA et al. (2018). Os espectros gerados para cada uma das cadeias foram exportados no formato (.mgf) e analisados no programa *Biotools 3.2 SR2* (Bruker) com o auxílio da ferramenta *Sequence Editor* (Bruker). Para as análises de tripsinização *in silico*, utilizaram-se as sequências das cadeias leve e pesada do produto Repatha[®], acrescidas de suas modificações pós-traducionais (pontes de dissulfeto). Não foram adicionadas informações sobre os sítios de N-glicosilação, pois os fragmentos glicosilados possuem alta massa molecular, dificultando sua identificação e caracterização pelo método utilizado. Além disso, devido ao processamento das amostras, algumas modificações adicionais foram incluídas nas análises, como a modificação carbamidometilação nos resíduos de cisteína, associada às etapas de redução e alquilação com o uso de DTT e IAA, e a oxidação nos resíduos de metionina.

3.5.7. Perfil de N-glicosilação por cromatografia líquida de interação hidrofílica

As etapas a seguir foram baseadas no protocolo experimental desenvolvido pelo professor Cremata (CIGB, Cuba, in memoriam), conforme detalhado por AGUEDO-ARISA (2017). Para a análise de N-glicanos, amostras contendo 35 μ g de mAbs em PBS foram incubadas com 1 μ L de PNGase F (LOO et al., 2002) durante 16 h a 37 ° C. Posteriormente, os N-glicanos foram recuperados por precipitação fria com etanol, secos em speed-vac e marcados com o reagente fluorescente 2-AB (2-aminobenzamida), usando um kit comercial (#GKK-804, Prozyme). Os oligossacarídeos derivatizados foram então purificados usando cartuchos GlycoCleanTM S (# GKI-4726, Prozyme), mais uma vez secos em speed-vac e ressuspensos em 200 µL de água. As amostras foram analisadas em um sistema UPLC Shimadzu Prominence equipado com uma coluna TSKgel Amide-80 (5 µm, 25,0 cm x 4,6 mm, TOSOH BIOSCIENCE) e um detector de fluorescência. Os N-glicanos marcados foram resolvidos a 30 °C a uma vazão de 0,4 mL/min com fase móvel A (formato de amônio 50 mM, pH 4,4) e fase móvel B (acetonitrila). O sinal de fluorescência foi detectado com comprimentos de onda de excitação e emissão de 330 e 420 nm, respectivamente. O assinalamento de cada pico observado foi realizado por comparação com o perfil de um padrão de homopolímero de glicose (# GKSB-503, Prozyme), usado para converter o tempo de retenção em unidades de glicose (UG). O tempo de retenção dos picos dos glicanos foi convertido em UG, através do programa *Glyco* 2 (criado pelo professor Cremata do CIGB, Cuba). A predição de estruturas prováveis para cada N-glicano foi feita usando a sub-base de glicosilação de IgGs humanas da plataforma online GlycoStore. Os picos principais foram integrados manualmente com auxílio do programa LC Solutions (Shimadzu) e as abundâncias relativas de diferentes espécies de N-glicanos foram determinadas.

3.5.8. Focalização isoelétrica capilar

A focalização isoelétrica capilar (cIEF) foi realizada usando o sistema ICE3 (Protein-Simple) equipado com uma lâmpada D2 (280 nm), um amostrador automático e um capilar revestido de fluorocarbono (FC Cartridge, Protein-Simple). Para a focalização, 20 µg de cada mAb em PBS foram misturados a uma solução contento anfólitos Pharmalyte[®] 3.0-10.0 (GE Healthcare), marcadores de ponto isoelétrico (pI) básico e ácido de 4,65 e 9,46 (Protein-Simple) e metilcelulose 1% (Protein-Simple). As misturas foram transferidas para frascos de 300 µL e injetadas em duplicata. As amostras foram resolvidas usando a condição de pré-focalização de 1 min a 1500V e uma condição de focalização de 4,5 min a 3000 V, à temperatura ambiente (~ 23 °C). Um padrão analítico de hemoglobina foi injetado antes e após a focalização das amostras como controle de qualidade do processo. A análise dos dados foi realizada no programa *Chromperfect* (Protein-Simple).

3.5.9. Ensaio de precipitação com polietilenoglicol

O protocolo experimental deste ensaio foi adaptado do trabalho de TOPRANI et al. (2016). Resumidamente, soluções estoque dos mAbs em PBS (0,7 mg/mL) e soluções estoque de PEG-10.000 (polietilenoglicol) em PBS foram misturadas na proporção de 1:4 para preparar várias concentrações de soluções de polietilenoglicol (PEG) variando de 0% a 30% (m/v). As misturas resultantes contendo 0,175 mg/mL de mAb cada foram preparadas em microtubos de 1,5 mL e incubadas por aproximadamente 16 h à temperatura ambiente (~23 ° C). Um volume de 30 µL de cada amostra foi aplicado em triplicata em uma microplaca de 384 poços contendo filtros com tamanho de poro de 0,45 µm (Corning). Esta placa foi então posicionada sobre uma outra microplaca de 384 poços transparente ao UV (Greiner) e centrifugada a 1610 g por 15 min para recuperar o filtrado. A concentração de proteína nos filtrados foi determinada a 214 nm utilizando um leitor de placas SpectraMax M5 UV-Visible (Molecular Devices). O ponto médio da concentração de PEG (%PEGmidpt) foi determinado plotando a concentração de mAb versus a concentração de PEG-10.000 e ajustada à função Sigmoidal Boltzmann (y = A2 + (A1-A2) / (1 + $\exp((x-x0) / dx)$). O ponto x0 foi definido como o %PEGmidpt. Para determinar a solubilidade aparente, os mesmos dados foram plotados em uma escala logarítmica para a região de transição (9,5 - 13,0% de PEG) e ajustados a uma função linear. A extrapolação da interceptação no eixo y foi tomada como a solubilidade aparente (MIDDAUGH et al., 1984). A análise dos dados foi realizada usando o programa Origin (OriginLab Corporation).

3.5.10. Espectroscopia de dicroísmo circular

Os experimentos de espectroscopia de dicroísmo circular (CD) foram realizados usando o espectrômetro Chirascan-plus CD (Applied Photophysics) equipado com um controlador de temperatura Peltier com um suporte para 6 cubetas (Quantum Northwest). Os espectros das amostras de mAb (a 0,2 mg/mL) foram coletados na região do UV distante na faixa de 200 a 260 nm em intervalos de 1 nm e usando um tempo de integração de 2 s. As curvas de desnaturação térmica foram realizadas em uma faixa de temperatura de 10 - 90 ° C, a intervalos de 1,0 °C, com um tempo de equilíbrio de 2 min a cada temperatura. As medições foram feitas em duplicata usando cubetas de quartzo (com caminho óptico de 1 mm) seladas com uma rolha de Teflon (Starna Cells). Os dados brutos foram convertidos em elipticidade molar residual média (MRME), conforme a Equação (1) (JOSHI et al., 2014), e o sinal de CD a 217 nm (indicador de alterações na estrutura de folha β) plotado em função da temperatura. O *midpoint* da temperatura de desenovelamento (ou fusão/desnaturação/transição), conhecida como T_m, foi determinado pelo máximo local da primeira derivada das curvas de desnaturação térmica, conforme descrito por WEI et al. (2018), empregando o programa Origin (OriginLab Corporation). O conteúdo de estrutura secundária a 10 °C foi predito usando o servidor online BeStSel (MICSONAI et al., 2015).

MRME (deg * cm²/dmole) =
$$\frac{\theta * \frac{M}{n}}{10 * c * 1}$$
 (1)

Onde: θ é o sinal de CD (mdeg); *M* é a massa molecular da proteína em g/mol (141578,62); *n* é número de resíduos de aminoácidos (1310); *c* é a concentração da proteína em mg/mL (0,2); *l* é comprimento do caminho óptico em cm (0,1).

3.5.11. Espectroscopia de Raman

O ensaio de espectroscopia de Raman foi realizado a 25 °C usando o instrumento Zetasizer Helix (Malvern Instruments) equipado com um laser de 785 nm. As amostras de mAb (20 μ L a 10 mg/mL) foram cuidadosamente pipetadas em uma microcubetas de metal (Malvern) para evitar a formação de bolhas. Os espectros de Raman foram registrados em triplicata com 10 aquisições de 40 s cada. Os espectros brutos foram subtraídos dos respectivos sinais dos tampões e normalizados de acordo com o pico do aminoácido fenilalanina (1003 cm⁻¹). As bandas de Amida I (1600 - 1700 cm⁻¹), triptofano (1520 - 1580 cm⁻¹) e tirosina (780 - 860 cm⁻¹) foram analisadas usando o programa *Zetasizer Helix Analyze* (Malvern Instruments).

3.5.12. Espectroscopia de fluorescência intrínsica e extrínsica

Os experimentos de espectroscopia de fluorescência foram realizados usando um leitor de placas de fluorescência (Fluorescence Innovations). Um volume de 20 μ L (a 0,2 mg/mL) de cada amostra de mAb foi pipetado em duplicata em uma microplaca de 384 poços de fundo preto (Bio-Rad). A microplaca foi centrifugada a 1610 g por 1 min, e 2 µL de óleo de silicone (Merck) foram adicionados sobre as amostras para evitar a evaporação. O estado de enovelamento das proteínas foi medido monitorando a fluorescência intrínseca dos resíduos de triptofano (Trp) presentes nestas proteínas. As amostras de mAb foram excitadas a 295 nm (emissão de Trp > 95%) e os espectros de emissão foram coletados na faixa de 300 - 405 nm com um tempo de aquisição de 5 s. Para o ensaio de fluorescência extrínseca, uma solução estoque do reagente fluorescente SYPRO® Orange (5000x, Thermo Fisher) foi adicionada às amostras de mAb com um fator de diluição de 1000. As amostras foram excitadas a 532 nm. As curvas de desnaturação térmica foram ajustadas de 10 - 90 ° C a intervalos de 2,5 °C (para fluorescência intrínseca) ou 1,0 °C (para fluorescência extrínseca) com um tempo de equilíbrio de 2 minutos para cada temperatura. A intensidade total de fluorescência (área sob a curva do espectro de emissão de fluorescência) e o centro de massa espectral (centro de energia do espectro de emissão de fluorescência, que divide o mesmo verticalmente em duas partes) foram calculados automaticamente, conforme as Equações (2) e (3) descritas por WEI et al. (2018), e plotados em função da temperatura. Os valores de T_m foram calculados como descrito para medições de CD, usando o programa Origin (OriginLab Corporation).

Intensidade total (u. a.) =
$$\int l(x)dx$$
 (2)

Centro de massa espectral (nm) =
$$\frac{\int l(x) x dx}{\int l(x) dx}$$
 (3)

Onde: $x \notin o$ comprimento de onda em nm e $l(x) \notin o$ sinal de fluorescência em unidades arbitrárias (u.a.).

3.5.13. Espalhamento de luz dinâmico (DLS)

Os experimentos espalhamento de luz dinâmico (DLS) foram realizados usando o leitor de placas DynaPro DLS (Wyatt Technology). Vinte microlitros de amostras (a 0,2 mg/mL) foram pipetados em duplicata em uma placa de 384 poços de fundo preto (Corning). A placa foi centrifugada a 1610 g por 1 min, e 5 μ L de óleo de silicone (Merck) foram adicionados para evitar a evaporação da amostra. As curvas de desnaturação térmica foram realizadas por uma rampa linear de 10 - 80 °C (0,5 °C/min) e cinco medições de 30 s por amostra foram coletadas. Uma análise cumulativa foi realizada e os diâmetros hidrodinâmicos foram obtidos. Os dados brutos foram interpolados usando o programa *Origin* (OriginLab Corporation) e o diâmetro hidrodinâmico em nm plotado em função da temperatura.

3.5.14. Calorimetria de varredura diferencial (DSC)

Os experimentos de calorimetria de varredura diferencial (DSC) foram realizados utilizando o microcalorímetro capilar Microcal VP-DSC (GE Healthcare). Inicialmente, 400 μ L das amostras (0,2 mg / mL) e de seus respectivos tampões foram carregados em duplicata em uma placa de 96 poços mantida a 4 °C. Os termogramas foram registrados de 10 - 110 °C a uma taxa de varredura de 1 °C/min usando um período de filtragem de 16 s. A subtração do tampão de referência, a normalização da concentração para a capacidade térmica molar (Cp) e o ajuste dos dados para calcular a temperatura inicial de transição (T_{onset}) e os valores da T_m foram realizados usando o *plug-in DSC MicroCal LLC* (GE Healthcare) para o programa *Origin 7.0* (OriginLab Corporation).

3.5.15. Diagrama empírico de fases (EPD)

Para uma intepretação global dos resultados dos ensaios biofísicos, o método de visualização de dados denominado "diagrama empírico de fases - EPD", foi empregado, conforme descrito por KIM et al. (2012) e MADDUX et al. (2011). Cinco conjuntos de dados biofísicos foram utilizados: (1) espectroscopia de dicroísmo circular; (2) espectroscopia de fluorescência intrínseca do triptofano; (3) espectroscopia de fluorescência extrínseca de *SYPRO Orange*; (4) espalhamento de luz dinâmico; (5) calorimetria de varredura diferencial. Os dados dos vários métodos foram combinados com o auxílio do programa *Middaugh Suite* (desenvolvido na Universidade do Kansas - EUA), matematicamente processados e convertidos em um mapa de cores que fornece uma visão geral da estabilidade dos mAbs em função da temperatura e do pH.

A Figura 15 resume de forma simplificada todas as etapas do processamento de dados para a construção de um EPD.



Figura 15. Esquema simplificado das etapas de processamento de dados para a construção de um EPD.

3.6. Ensaios de formulação e estabilidade

3.6.1. Avaliação de excipientes para a estabilização de anticorpos monoclonais

Diferentes excipientes, mostrados na Tabela 6, foram selecionados com base na combinação de dados da literatura (KANG et al., 2016) e da experiência prévia do grupo do professor Russ Middaugh (Universidade do Kansas, EUA) com o desenvolvimento de formulações para produtos biológicos. Inicialmente, foi feito o processo de troca de tampão das amostras de mAb, com o auxílio de ultrafiltração por filtros Amicon (0,5 mL, 30 kDa, Merck) para: (1) tampão citrato de sódio/ácido cítrico 100 mM, pH 6,0; (2) tampão acetato de sódio/ácido acético 100 mM, pH 5,0. Devido a limitações de massa disponível do mAb biossimilar, este foi estudado apenas em tampão citrato. As diferentes preparações foram feitas de acordo com a Tabela 6, combinando 25 μ L de mAb em tampão citrato ou acetato (a 0,7 mg/mL) a 25 μ L das soluções estoque 2x dos excipientes, resultando em uma concentração final de mAb de ~0,3 mg/mL. Um volume de 10 μ L de cada amostra (em quatro replicatas) foi analisado via espectroscopia de fluorescência intrínseca dos resíduos de Trp (vide 3.6.16). Através de curvas de desnaturação térmica foi possível calcular a T_m de cada amostra, permitindo o ranqueamento dos diferentes excipientes em relação à condição controle (tampão apenas).

Condições	Excipientes (concentração final)	Tipo de excipiente	
1	Tampão (sem excipientes)		
2	L-arginina 100 mM	aminoácido	
3	L- arginina 50 mM + L-glutamato 50 mM	aminoácido	
4	Glicina 100 mM	aminoácido	
5	L-prolina 100 mM	aminoácido	
6	L-histidina 100 mM	aminoácido	
7	β-alanina 100 mM	aminoácido	
8	L-serina 100 mM	aminoácido	
9	Metionina 100 mM	aminoácido	
10	D-trealose 10% (m/v)	osmólito	
11	D-sorbitol 10% (m/v)	osmólito	
12	Sacarose 10% (m/v)	osmólito	
13	Manitol 10% (m/v)	osmólito	
14	Ureia 100 mM	agente caotrótipo	
15	EDTA 1 mM	agente quelante	
16	Sulfato de amônio 150 mM	sal	
17	Cloreto de amônio 150 mM	sal	
18	Cloreto de césio 150 mM	sal	
19	Acetato de amônio 150 mM	sal	
20	Cloreto de sódio 150 mM	sal	
21	Cloreto de potássio150 mM	sal	
22	Cloreto de lítio 150 mM	sal	
23	Glicerol 10% (v/v)	poliol	

Tabela 6. Excipientes testados para a estabilização de mAbs.

Condições	Excipientes (concentração final)	Tipo de excipiente
24	Etilenoglicol 1% (v/v)	poliol
25	PEG 200 1% (v/v)	poliol
26	α-ciclodextrina 10% (m/v)	ciclodextrina
27	γ-ciclodextrina 10% (m/v)	ciclodextrina
28	Polisorbato 80 0,05% (v/v)	surfactante
29	Polisorbato 20 0,05% (v/v)	surfactante
30	Poloxamer 188 0.05% (v/v)	surfactante
31	Brij 35 0,05% (v/v)	surfactante

Tabela 6. Excipientes testados para a estabilização de mAbs. (Continuação)

3.6.2. Ensaio comparativo de degradação acelerada em diferentes formulações

Com base em dados da literatura para a formulação de mAbs e nos efeitos benéficos observados na utilização de açúcares (osmólitos) e de aminoácidos na estabilização das amostras, um estudo comparativo de degradação acelerada a 40 °C com duração de 2 meses foi desenhado, de acordo com a Tabela 7. Amostras de cada mAb (biossimilar e referência) passaram pela etapa de troca de tampão, através da utilização de filtros Amicon (0,5 mL, 10 kDa, Merck). Em seguida, as amostras foram diluídas 1:1 em soluções estoque 2x estéreis de diferentes formulações. Devido a limitações de massa disponível do mAb biossimilar, este experimento foi realizado com uma concentração final de 0,1 mg/mL. Para cada condição testada foram analisados 3 tempos de incubação diferentes (0, 1 e 2 meses). As amostras referentes aos tempos de 1 e 2 meses foram divididas em 2 frascos de vidro estéreis de 1 mL (300 μ L cada) e mantidas a 40 °C. A análise da estabilidade dos mAbs foi realizada pelas técnicas de espectroscopia de fluorescência intrínseca dos resíduos de Trp e SEC-HPLC, através do cálculo da T_m e quantificação do pico monomérico dos mAbs ao longo do tempo.

Condições	Formulações		
1	tampão citrato 50 mM, pH 5,5 (controle 1)		
2	tampão L-histidina 50 mM, pH 6,0 (controle 2)		
3	manitol 10% (m/v) em tampão citrato		
4	sacarose 10% (m/v) em tampão L-histidina		
5	glicina 100 mM em tampão citrato		
6	prolina 100 mM em tampão L-histidina		
7	manitol 10% (m/v), polisorbato 80 0,01% (v/v) em tampão L-histidina		
8	sacarose 10% (m/v), polisorbato 80 0,01% (v/v) em tampão citrato		
9	glicina 100 mM, polisorbato 80 0,01% (v/v) em tampão L-histidina		
10	prolina 100 mM, polisorbato 80 0,01% (v/v) em tampão citrato		
11	manitol 10% (m/v), polisorbato 80 0,01% (v/v), NaCl 150 mM em tampão citrato		
12	sacarose 10% (m/v), polisorbato 80 0,01% (v/v), NaCl 150 mM em tampão L-histidina		
13	glicina 100 mM, polisorbato 80 0,01% (v/v), NaCl 150 mM em tampão citrato		
14	prolina 100 mM, polisorbato 80 0,01% (v/v), NaCl 150 mM em tampão L-histidina		

Tabela 7. Formulaçã	ões testadas pa	ara o ensaio co	mparativo de de	gradação acelerada.
3				0 3

3.6.3. Análise da estabilidade do produto Repatha® em diferentes formulações

Para uma avaliação clinicamente relevante da estabilidade do mAb estudado, o produto comercial Repatha[®] foi utilizado em sua concentração original de 140 mg/mL. Neste contexto, quatro formulações distintas, incluindo a própria formulação original do Repatha[®] (contendo prolina, acetato, polisorbato 80 e, hidróxido de sódio para ajuste do pH para 5,0) (EMA, 2015) foram comparadas: (A) controle – formulação comercial; (B) formulação comercial acrescida de sacarose (acetato 50 mM, prolina 100 mM, polisorbato 80 0,05% v/v, sacarose 10% m/v, pH 5,0); (C) citrato de sódio 50 mM, sacarose 10% (m/v), polisorbato 80 0,05% (v/v), pH 5,5; (D) L-

histidina 50 mM, sacarose 10% (m/v), polisorbato 80 0,05% (v/v), pH 6,0. Inicialmente, 130 μ L (~18 mg) do produto de referência passaram pelo processo troca de tampão com auxílio de filtros Amicon (0,5 mL, 10 kDa, Merck). Todos os tampões foram mantidos estéreis durante o processo. As amostras de mAb (100 μ L) foram mantidas a 40 °C por 4 meses, em microtubos estéreis vedados com parafilme e armazenado em frascos de vidro de 10 mL, para evitar perdas por evaporação. A cada tempo de incubação (0, 1, 4, 8, 12 e 16 semanas), 12 μ L de cada condição foram retirados dentro de fluxo laminar e os tubos imediatamente condicionados a 40 °C para dar continuidade ao ensaio. As amostras foram posteriormente diluídas, em seus respectivos tampões, para uma concentração de 1 mg/mL e analisadas pelas técnicas de SDS-PAGE, espectroscopia de fluorescência intrínseca dos resíduos de Trp, SEC-HPLC e DSC (previamente descritas na sessão 3.5).

3.7. Análise estatística

Para a comparação estatística entre os dados do mAb de referência e do biossimilar, foi realizado um teste t de *Student* com nível de confiança de 95%, usando o programa GraphPad Prism. Um valor de p < 0,05 foi considerado significativo.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Construção dos vetores para expressão do mAb anti-PCSK9

A crescente demanda por mAbs terapêuticos levou ao emprego de várias abordagens para obtenção dos melhores desenhos de vetores para uma expressão eficiente em células de mamíferos (BAYAT et al. 2018, LI et al. 2007). Neste estudo, quatro diferentes plasmídeos tricistrônicos mediados por elementos IRES foram construídos, como previamente mostrado na Figura 10, na sessão 3.1. Resumidamente, as cadeias leve e pesada do produto Repatha[®] (evolocumabe, Amgen), assim como os genes dos marcadores de seleção, foram expressos em um único vetor sob o controle de um promotor de CMV-IE (do inglês, human cytomegalovirus immediate early promoter). Para a cadeia leve (LC), dois peptídeos-sinal diferentes foram avaliados (L1 e L2), enquanto para a cadeia pesada apenas um peptídeo-sinal foi empregado (H7). Um elemento IRES de EMCV (do inglês, encephalomyocarditis virus) do tipo selvagem foi colocado entre o gene da cadeia leve (LC) e H7. A jusante do gene da cadeia pesada (HC), um elemento IRES de EMCV atenuado (com mutações para uma eficiência de tradução reduzida) foi inserido, seguido pelo gene marcador de seleção e pelo sinal de poliadenilação. Para a avaliação da estratégia de seleção dupla (utilizando simultaneamente dois antibióticos diferentes) foram construídos dois conjuntos de vetores tendo a neomicina fosfotransferase (Neo) ou higromicina B fosfotransferase (Hygro) como marcadores de seleção. Com o objetivo de desenvolver uma plataforma flexível para expressão de diferentes mAbs, todos os cistrons foram flanqueados por diferentes sítios de enzimas de restrição. As etapas para a construção dos quatro vetores de expressão do mAb anti-PCSK9 foram previamente apresentadas na sessão 3.1, englobando os processos de: (1) digestão dupla com enzimas de restrição; (2) separação de fragmentos por eletroforese, seguida de purificação de bandas de interesse; (3) ligação mediada pela T4 DNA ligase. A validação da construção de cada um dos plasmídeos foi feita por meio de digestão enzimática dupla e por PCR (para amplificação das regiões de ligação inserto-vetor), seguidas de análise por eletroforese em gel de agarose, conforme observado nas Figuras 16, 17, 18 e 19.



Figura 16. Validação da construção do vetor pCI L1-LC-IRES-H7-HC-IRES-Neo. (A) Mapa do vetor pCI L1-LC-IRES-H7-HC-IRES-Neo (7.611 pb). (B) Validação do vetor recombinante por eletroforese em gel de agarose - raia 1: *ladder* (padrão de tamanho de fragmento); raia 2: vetor circular; raia 3: vetor digerido com *NheI* e *BamHI*; raias 4-5: produtos de PCR das regiões de ligação do vetor construído. Os tamanhos dos fragmentos e amplicons, em pares de base (pb), observados coincidem com os tamanhos preditos *in silico* com o auxílio do programa *Vector NTI* (Thermo).



Figura 17. Validação da construção do vetor pCI L2-LC-IRES-H7-HC-IRES-Neo. (A) Mapa do vetor pCI L2-LC-IRES-H7-HC-IRES-Neo (7.611 pb). (B) Validação do vetor recombinante por eletroforese em gel de agarose - raia 1: *ladder* (padrão de tamanho de fragmento); raia 2: vetor circular; raia 3: vetor digerido com *EcoRI* e *NheI*; raias 4-5: produtos de PCR das regiões de ligação do vetor construído. Os tamanhos dos fragmentos e amplicons, em pares de base (pb), observados coincidem com os tamanhos preditos *in silico* com o auxílio do programa *Vector NTI* (Thermo).



Figura 18. Validação da construção do vetor pCI L1-LC-IRES-H7-HC-IRES-Hygro. (A) Mapa do vetor pCI L1-LC-IRES-H7-HC-IRES-Hygro (7.710 pb). (B) Validação do vetor recombinante por eletroforese em gel de agarose - raia 1: *ladder* (padrão de tamanho de fragmento); raia 2: vetor circular; raia 3: vetor digerido com *NheI e BamHI*; raias 4-5: produtos de PCR das regiões de ligação do vetor construído. Os tamanhos dos fragmentos e amplicons, em pares de base (pb), observados coincidem com os tamanhos preditos *in silico* com o auxílio do programa *Vector NTI* (Thermo).



Figura 19. Validação da construção do vetor pCI L2-LC-IRES-H7-HC-IRES-Hygro. (A) Mapa do vetor pCI L2-LC-IRES-H7-HC-IRES-Hygro (7.710 pb). (B) Validação do vetor recombinante por eletroforese em gel de agarose - raia 1: *ladder* (padrão de tamanho de fragmento); raia 2: vetor circular; raia 3: vetor digerido com *EcoRI e NheI*; raias 4-5: produtos de PCR das regiões de ligação do vetor construído. Os tamanhos dos fragmentos e amplicons, em pares de base (pb), observados coincidem com os tamanhos preditos *in silico* com o auxílio do programa *Vector NTI* (Thermo).

Para o desenvolvimento de um biossimilar, a obtenção da sequência de DNA ou de aminoácidos do produto de referência é crucial e relativamente fácil de ser encontrada em bancos de dados como, o IMGT (*The International Immunogenetics Information System*), em patentes ou em documentos regulatórios. Por outro lado, há pouquíssimas informações publicadas sobre os peptídeos-sinal empregados na produção de mAbs terapêuticos. Nesse contexto, um estudo abrangente foi realizado por HARYADI et al. (2015), em que vários peptídeos-sinal para LC e HC de IgGs humanas foram comparados para obter a melhor produção de biossimilares de alguns dos mAbs mais comercializados mundialmente (Herceptin[®], Avastin[®], Remicade[®], Rituxan[®], Humira[®]). Para a construção dos vetores propostos neste estudo foram selecionados três peptídeos-sinal avaliados no estudo supracitado, referidos como L1, L2 e H7.

Além dos peptídeos-sinal, a seleção do promotor de CMV, dos elementos IRES de EMCV e do arranjo da LC no primeiro cistron também foi baseada em outros estudos relacionados à expressão de mAbs. O promotor de CMV é classificado como forte e é amplamente utilizado para expressão de proteínas heterólogas em células CHO e por isso, foi escolhido para a construção dos vetores (LI et al. 2007). Já os elementos IRES, por permitirem a co-expressão de múltiplas cadeias polipeptídicas a partir de um único RNA mensageiro, provaram controlar eficientemente a razão entre LC e HC e, a expressão do marcador de seleção, minimizando a quantidade de clones não produtores de mAb (HO et al. 2012, 2013b). Os elementos IRES de EMCV são conhecidos por sua estabilidade em relação às sequências gênicas adjacentes e por mediar uma tradução eficiente de proteínas (BORMAN et al., 1997, HENNECKE et al., 2001). Além disso, já foi descrito que uma maior expressão da LC em relação à HC proporciona a secreção de mAbs com melhor qualidade em termos de perfil de glicosilação e estabilidade conformacional, bem como redução da propensão à agregação. Enquanto uma maior expressão de HC está diretamente relacionada ao aumento na formação de agregados imunonêgicos. A lógica por trás da inserção de um IRES atenuado a montante do gene do marcador de seleção foi aumentar ainda mais o rigor de seleção, para obtenção de populações estáveis mais produtivas, visto que já é bem estabelecido na literatura que genes associados a elementos IRES, em geral, possuem uma menor taxa de transcrição (HO et al., 2012, 2013b).

4.2. Transfecção e seleção de células CHO-K1

Como descrito anteriormente na Figura 9B (na sessão 3.1.), doze condições distintas foram testadas para a expressão do mAb anti-PCSK9. Células da linhagem CHO-K1 foram transfectadas

(ou co-transfectadas com os dois plasmídeos diferindo apenas em relação ao marcador de seleção, Neo ou Hygro) por lipofecção, utilizando plasmídeos circulares ou linearizados. Os níveis de mAb no sobrenadante de cultura de células das diferentes populações transfectadas foram analisados qualitativamente pelo imunoensaio de *spot blot*, usando anticorpos de detecção anti-IgG humana, 48 h pós-transfecção. Para a transfecção transiente, todas as construções e combinações exibiram níveis semelhantes de expressão de mAb, como observado na Figura 20. No entanto, as populações transfectadas com plasmídeos circulares mostraram uma maior expressão em relação àquelas transfectadas com plasmídeos linearizados. Estes resultados podem ser explicados pelo fato de o DNA circular ser menos suscetível à degradação por exonucleases. No trabalho de MCLENACHAN et al. (2007), por exemplo, uma menor eficiência de transfecção de célulastronco embrionárias de camundongos também foi reportada com a utilização de plasmídeos linearizados em comparação a vetores circulares. Já VON GROLL et al. (2006) descreveram, por análise de microscopia de força atômica, que o processo de complexação de lipídeos catiônicos com moléculas de DNA com diferentes topologias é bastante distinto. Enquanto a transfecção de plasmídeos circulares (mais compactos) provavelmente envolva o processo de endocitose, a via de entrada de estruturas de DNA linearizadas pode ser bem diferente e menos eficiente, corroborando os resultados observados.

Circular (C)	Linear (L)	CTL+	CTL-		
				1.	L1-NEO C
	7			2.	L2-NEO C
				3.	L1-HYGRO C
	8			4.	L2-HYGRO C
		•		5.	L1-NEO C e L1-HYGRO C
030	,	1.4		6.	L2-NEO C e L2-HYGRO C
		•		7.	L1-NEO L
. 4 .	10			8.	L2-NEO L
				9.	L1-HYGRO L
. 5 .	11			10.	L2-HYGRO L
				11.	L1-NEO L e L1-HYGRO L
0 6 0	12			12.	L2-NEO L e L2-HYGRO L

Figura 20. Imunoensaio de *spot-blot* **para detecção da expressão transiente do mAb anti-pCSK9 com os diferentes vetores construídos.** C: vetor circular; L: vetor linearizado com a enzima de restrição *BamH*I; controle positivo: IgG padrão 50 µg/mL (#I4506, Sigma); controle negativo transfecção: sobrenadante de células CHO-K1 não transfectadas. Detecção com anticorpo policional de cabra anti-IgG humano (H+L) conjugado à peroxidase (#A18805, Themo). Revelação por quimioluminescência com o reagente ECL Plus (GE Healthcare).

Decorrido o período de 48 h, deu-se início ao processo de seleção de populações estáveis expressando constitutivamente o mAb anti-PCSK9, que perdurou por 2 meses. As células foram diluídas duas vezes por semana para concentrações entre $1 - 2 \ge 10^6$ cels/mL em meio de cultivo TC-LECC contendo G418 (geneticina), higromicina B ou ambos os antibióticos (nos casos de seleção dupla ou para o controle negativo). Amostras foram retiradas durante todo o processo de seleção para a avaliação do crescimento celular, em termos de concentração de células viáveis e viabilidade, como mostrado na Figura 21. As populações de células CHO transfectadas com vetores circulares e resistentes ao antibiótico G418 recuperaram-se mais rapidamente (~25 dias) do processo de seleção. Neste mesmo período, as células CHO-K1 parentais, usadas como controle negativo do processo de seleção, já se encontravam com baixíssimas concentrações ($< 0,1 \times 10^6$ cels/mL) e viabilidade inferior a 10%, indicando que populações estáveis expressando o mAb anti-PCSK9 poderiam ser obtidas dentro de um mês. Já as populações resistentes à higromicina B ou transfectadas com vetores linearizados, mostraram um perfil de recuperação bastante lento (~60 dias). Nenhuma das populações submetidas ao processo de seleção dupla sobreviveu. Em diversos trabalhos na literatura, o processo de seleção de populações estáveis geralmente dura cerca de 2-4 semanas (YANG et al., 2018, AHMADI et al., 2017; HO et al., 2012).



Figura 21. Processo de seleção de populações estáveis de células CHO com antibióticos. As células foram diluídas duas vezes por semana em meio TC-LECC fresco contendo: 500 µg/mL de G418 (*pools* 1, 2, 7 e 8); 300 µg/mL de higromicina B (*pools* 3, 4, 9 e 10); ou para a seleção dupla (*pools* 5, 6, 11 e 12) e controle negativo (células CHO-K1 parentais), a combinação de 100 µg/mL de G418 e 300 µg/mL de higromicina B. As setas indicam o tempo necessário para cada um dos *pools* alcançar uma viabilidade superior a 80%.

Após o período de 2 meses de cultivo sob pressão seletiva, os sobrenadantes das populações estáveis geradas foram novamente coletados e analisados via imunoensaio de *slot blot*, como mostrado na Figura 22. Mais uma vez, as populações estáveis geradas a partir de vetores circulares apresentaram uma expressão mais intensa do mAb (*pools* 1 a 4), em relação aos gerados pelos vetores linearizados (*pools* 8 a 10). As populações estáveis que não apresentaram sinal (*pools* 5, 6, 7, 11 e 12) foram as que apresentaram viabilidade extremamente baixa ao final do processo de seleção.



Figura 22. Imunoensaio de *spot-blot* **para detecção da expressão do mAb anti-pCSK9 pelas populações de células CHO após 60 dias de seleção com antibióticos**. C: vetor circular; L: vetor linearizado. Controle positivo: IgG padrão 50 µg/mL (#I4506, Sigma). Controle negativo transfecção: sobrenadante de células CHO-K1 não transfectadas. Detecção com anticorpo policional de cabra anti-IgG humano (H+L) conjugado à peroxidase (#A18805, Themo). Revelação por quimioluminescência com o reagente ECL Plus (GE Healthcare).

A eficiência da transfecção de células de mamíferos pode ser afetada por vários fatores, como o método de transfecção, densidade celular, tempo de incubação, vetor utilizado e até pela topologia do DNA. A linearização dos plasmídeos antes do processo de transfecção é uma abordagem comum e possivelmente aumentaria a eficiência da geração de clones estáveis, visto que o DNA linearizado, com suas extremidades livres, seria mais facilmente incorporado ao genoma da célula hospedeira através do processo de recombinação (STUCHBURY E MÜNCH, 2010). Considerando este fato, decidiu-se comparar a expressão do mAb anti-PCSK9 utilizando vetores circulares e linearizados. Os resultados obtidos mostraram que a linearização de plasmídeos pela digestão em sítio único com a enzima *BamHI* não contribuiu para uma maior expressão transiente ou estável do mAb. A dupla seleção combinando dois marcadores de seleção

é outra maneira de aumentar o rigor do processo de seleção e poderia melhorar a expressão proteica de clones estáveis de 5 a 100 vezes (WIRTH, 1997). Neste estudo, por outro lado, a abordagem da dupla seleção mostrou-se ineficiente para a geração de populações estáveis de células CHO. Algumas possíveis explicações para isso seriam: (1) a aplicação de uma pressão seletiva extrema sobre as células CHO, através da utilização de concentrações não adequadas de antibióticos; ou (2) silenciamento gênico, causado pela integração aleatória dos genes de resistência em regiões de heterocromatina.

4.3. Avaliação comparativa das populações estáveis geradas

As populações estáveis de células CHO resultantes (*pools* 1, 2, 3, 4, 8 e 10) foram comparadas em termos de crescimento celular, metabolismo e produção do mAb anti-PCSK9. Devido a uma rápida diminuição de viabilidade, o *pool* 9 não foi utilizado nos ensaios comparativos.

A análise do comportamento cinético dos sistemas de produção de biofármacos é fundamental para compreender como variam as concentrações de células, substratos, metabólitos, produtos e subprodutos ao longo do tempo. Estas informações auxiliam no desenvolvimento de estratégias para otimizar o processo e aumentar a produtividade das células recombinantes (AUGUSTO et al., 2008, LÓPEZ-MEZA et al., 2016). Por esta razão, visando caracterizar os perfis de crescimento e de metabolismo das diferentes populações estáveis de células CHO geradas, foram realizados os cultivos em batelada em frascos agitados. Conforme descrito na sessão 3.2.2., os experimentos de cinética em pequena escala foram realizados em duplicata biológica em frascos agitados do tipo erlenmeyer. A concentração de células viáveis (Xv), a viabilidade celular e o perfil de consumo/produção de glicose e lactato ao longo do tempo podem ser observados na Figura 23, para cada uma das populações estáveis (pools 1, 2, 3, 4, 8 e 10). Em geral, a duração dos cultivos foi de 10 dias. O perfil de crescimento celular das populações estáveis mostrou-se bastante distinto, apesar de apresentar as fases típicas de um cultivo em batelada, com fase de crescimento lag, exponencial, e de declínio ou morte. Visivelmente, os pools 1 e 2 apresentaram um crescimento celular mais acelerado. A Xv máxima alcancada foi de aproximadamente 11 - 14 x10⁶ células/mL no dia 7. Os *pools* 3 e 4 apresentaram o crescimento mais lento, o pico de Xv foi de 9 - 20×10^6 células/mL no dia 9. Já, os pools 8 e 10 apresentaram um crescimento celular intermediário com Xv máxima de 6 - 13 x10⁶ células/mL no dia 8. As populações resistentes a G418 (pools 1, 2 e 8) mostraram uma maior viabilidade (>90%) ao longo

de todo o cultivo em relação às resistentes a higromicina B (*pools* 3, 4 e 10). Foi observado um declínio na viabilidade de todas as populações estáveis após a depleção dos nutrientes do meio de cultura. Embora tenham sido observadas diferenças, todas as populações estáveis apresentaram um perfil metabólico semelhante, caracterizado inicialmente pelo consumo de glicose e produção de lactato. Com a diminuição dos níveis de glicose, as células mudaram seu metabolismo da produção de lactato para o consumo, um comportamento comum observado nas células CHO (ZAGARI et al. 2013). A produção de mAbs usando populações estáveis é uma alternativa eficiente ao desenvolvimento de linhagens clonais para geração rápida de quantidades razoáveis de proteína para ensaios de caracterização, estabilidade e estudos pré-clínicos (YANG et al., 2018). Portanto, a caracterização do crescimento celular em estágios iniciais de desenvolvimento é fundamental para subsidiar a futura produção em larga escala.



○ Pool 1 □ Pool 2 △ Pool 3 ◇ Pool 4 ※ Pool 8 ☆ Pool 10

Figura 23. Avaliação comparativa dos perfis de crescimento e metabolismo das populações estáveis de células CHO cultivadas em frascos agitados de pequena escala. (A) Concentração de células viáveis; (B) viabilidade; (C) concentração de glicose (substrato); (D) concentração de lactato (metabólito). Pool 1: L1-NEO C; pool 2: L2-NEO C; pool 3: L1-HYGRO C; pool 4: L2-HYGRO C; pool 8: L2-NEO L; pool 10: L2-HYGRO L.Os experimentos foram conduzidos em duplicata biológica e os dados estão representados nos gráficos como média e desvio padrão.

Para a comparação da expressão do mAb anti-PCSK9, as populações estáveis foram cultivadas em batelada por 7 dias em frascos agitados com volume de trabalho de 300 mL. Os sobrenadantes de cada pool (250 mL) foram clarificados e purificados por cromatografia de afinidade por proteína A. A Figura 24A ilustra o perfil cromatográfico típico observado nas corridas realizadas. A recuperação eficiente do mAb no pico do eluato foi confirmada por imunoensaio de spot blot (Figura 24B), nenhum sinal foi observado nas frações de flow through (material não adsorvido) e lavagem. A Figura 21C destaca comparativamente a intensidade do sinal de absorbância do pico de eluição para os diferentes sobrenadantes purificados. As frações purificadas foram quantificadas por espectrofotometria e as concentrações medidas (Figura 24D) refletem a capacidade de produção de mAb das diferentes populações estáveis geradas, uma vez que o mesmo volume de sobrenadante foi purificado sem nenhum sinal de perda observado durantes as etapas cromatográficas. As populações estáveis resistentes a G418 (pools 1, 2 e 8) apresentaram uma maior expressão de mAb, em relação as populações estáveis resistentes à higromicina B (pools 3, 4 e 10), independentemente do peptídeo sinal associado à expressão da cadeia leve. O pool estável 1 mostrou a melhor produção de mAb, indicando também a maior eficiência de secreção de mAb ao se utilizar o peptídeo sinal L1, comparativamente ao peptídeo sinal L2.

É sabido que os marcadores de seleção possuem um papel crucial no desenvolvimento de linhagens celulares recombinantes, tanto para a eliminação de células não recombinantes, quanto para obtenção de altos níveis de expressão de produto. Uma grande variedade de marcadores de seleção pode ser usada individualmente ou em combinação. As diferenças de eficiência e nos modos de ação dos antibióticos comumente usados também podem afetar significativamente os níveis de expressão de proteína heteróloga. O gene codificante da neomicina fosfotransferase já foi relatado como um silenciador transcricional em células eucarióticas, enquanto nenhum efeito adjacente foi observado para o gene de resistência à puromicina (ARTELT et al., 1991). No trabalho de YEO et al. (2017), por exemplo, a influência de cinco marcadores de seleção distintos para a expressão de mAbs em células CHO foi avaliada. As maiores concentrações de mAb foram produzidos pelas populações estáveis resistentes ao antibiótico zeocina, enquanto as populações resistentes a higromicina B e neomicina secretaram os piores títulos de mAb. No presente trabalho, o gene da neomicina fosfotransferase mostrou-se mais eficiente do que o da higromicina B

fosfotransferase, abrindo perspectivas para estudos futuros envolvendo outros marcadores de seleção para uma maior produção do mAb anti-PCSK9.



Figura 24. Avalição comparativa dos perfis de purificação dos sobrenadantes das populações estáveis geradas. (A) Cromatograma típico da purificação por cromatografia de afinidade por proteína A do sobrenadante do *pool* 1. (B) *Spot-blot* correspondente às diferentes frações cromatográficas. (C) Comparação dos picos de eluição obtidos na purificação dos sobrenadantes dos diferentes *pools* estáveis. (D) Concentração final de mAb após a purificação, medida por absorvância de UV a 280 nm. *Pool* 1: L1-NEO C; pool 2: L2-NEO C; pool 3: L1-HYGRO C; pool 4: L2-HYGRO C; pool 8: L2-NEO L; pool 10: L2-HYGRO L. Os resultados são mostrados como média e desvio padrão de triplicatas analíticas.

A análise qualitativa de SDS-PAGE e o imunoensaio de *Western blot* referentes às frações cromatográficas da purificação do sobrenadante da população estável 1 podem ser observados nas Figuras 25A e 25B, respectivamente. A partir do gel de SDS-PAGE, foi observada uma diminuição significativa na complexidade de proteínas após o processo de purificação. O mAb purificado apresentou alta pureza e migração semelhante à IgG padrão de soro humano. A massa molecular (MM) aparente das duas bandas observadas (~30 e ~50 kDa) correlaciona-se com a MM teórica de 50 kDa para cadeia pesada e 25 kDa para cadeia leve de moléculas de IgG humanas. O imunoensaio de *Western blot* confirmou a identidade do mAb purificado. A maior intensidade de

sinal nas bandas de HC em relação à LC está associada aos epítopos preferenciais do anticorpo de detecção usado neste ensaio.

Para avaliação de antigenicidade *in vitro*, a afinidade dos mAbs purificados pela PCSK9 foi avaliada por uma abordagem qualitativa, usando o imunoensaio de *slot blot*, como mostrado na Figura 25C. Apenas os mAbs purificados a partir dos sobrenadantes das populações estáveis resistentes a G418 (*pools* 1, 2 e 8) mostraram um sinal detectável, confirmando a afinidade pela proteína alvo. Uma vez que, para fins comparativos, foi utilizado um volume igual de cada mAb purificado no teste, as concentrações mais baixas de mAb oriundos de *pools* resistentes à higromicina B (3, 4 e 10) provavelmente foram insuficientes para a detecção do sinal.

Embora todas as populações estáveis tenham produzido concentrações relativamente baixas de mAb, o *pool* estável 1 apresentou níveis mais altos de expressão de mAb. Assumindo 100% de recuperação na etapa de purificação por proteína A, a concentração de mAb determinada no sobrenadante (0,9 mg/L) para o *pool* 1, em estudos iniciais realizados em frascos agitados em batelada, foi superior aos valores relatados em outros estudos usando vetores mediados por elementos IRES para expressão por integração aleatória de mAbs, como: 0,105 mg/L (BAYAT et al., 2018); 0,020 mg/L (RAHIMPOUR et al., 2016); < 0,050 mg/L (AHMADI et al., 2017). O desenho racional de plasmídeos empregado neste trabalho pode ser potencialmente associado às estratégias de amplificação gênica (NOH et al., 2018, VORONINA et al., 2016) ou expressão mediada por transposon (BALASUBRAMANIAN et al., 2015) para futuramente melhorar a produtividade das linhagens celulares geradas.

Considerando as características promissoras da população estável 1 (sp1LC-NEO) em relação ao seu elevado crescimento celular e boa produção de glicoproteína, diversos cultivos em batelada em frascos agitados com volume de trabalho 300 mL foram feitos para a geração de mAb purificado para os ensaios posteriores de caracterização e formulação. A Figura 26 mostra a análise de pureza (por SDS-PAGE e *Western blot*) para dois diferentes lotes de mAb produzido. Mais uma vez confirmou-se a pureza/homogeneidade das frações de mAb purificadas, que posteriormente foram reunidas e concentradas por ultrafiltração para a geração de um *pool* do mAb biossimilar.



Figura 25. Resultados analíticos da purificação dos sobrenadantes das populações estáveis. (A) Gel de poliacrilamida 12% (v/v) corado com nitrato de prata e (B) membrana do imunoensaio de *Western blot* referentes ao processo de purificação do sobrenadante de cultivo do *pool* 1 (L1-NEO C). 1: Padrão de massa molecular com destaque para as massas de 50 kDa (cadeia pesada do mAb) e 25 kDa (cadeia leve do mAb); 2: Padrão comercial de IgG humana (#I4506, Sigma); 3: Sobrenadante alimentado à coluna Eshmuno A; 4: Fração não-adsorvida (*flow-through*); 5: Lavagem; 6: Eluição. Detecção realizada com anticorpo policional de cabra anti-IgG humano (H+L) conjugado à peroxidase (#A18805, Themo). (C) Imunoensaio de afinidade pela proteína PCSK9. *Pool* 1: L1-NEO C; *pool* 2: L2-NEO C; *pool* 3: L1-HYGRO C; *pool* 4: L2-HYGRO C; *pool* 8: L2-NEO L; *pool* 10: L2-HYGRO L.



Figura 26. Análise de pureza de diferentes lotes de mAb produzido para os ensaios de caracterização e formulação. Gel de poliacrilamida 12% (v/v) corado com nitrato de prata e membrana do imunoensaio de *Western blot* referentes as amostras purificadas de diferentes lotes de cultivo em batelada do *pool 1* (L1-NEO C). MMM: marcador de massa molecular; 1: Produto de referência para o mAb anti-PCSK9 (Repatha[®], Amgen); 2: mAb purificado do lote de cultivo 15; 3: mAb purificado do lote de cultivo 17. Detecção realizada com anticorpo policional de cabra anti-IgG humano (H+L) conjugado à peroxidase (#A18805, Themo).

4.4. Caracterização comparativa do mAb produzido

Considerando as quantidades limitadas do mAb anti-PCSK9 produzido neste estágio inicial de desenvolvimento, uma estratégia racional foi empregada para avaliar o máximo de atributos críticos de qualidade usando apenas alguns miligramas de mAb. Basicamente, uma série de métodos analíticos, já bem estabelecidos na literatura, foram utilizados para a caracterização comparativa entre o biossimilar produzido e o seu produto de referência (Repatha®, Amgen). A seguir, estes resultados serão apresentados e discutidos em maiores detalhes.

4.4.1. Pureza e heterogeneidade de tamanho

O mAb de referência e o biossimilar foram analisados por SDS-PAGE sob condições redutoras e não redutoras para avaliar a pureza da proteína (Figura 27A). Ambos os mAbs apresentaram elevada pureza e migração semelhante. Sob condições não redutoras, duas bandas principais (entre as bandas de 110 e 160 kDa do marcador de proteína) foram observadas refletindo diferentes isoformas de ligação dissulfeto. As moléculas de IgG2 geralmente apresentam isoformas distintas geradas por múltiplas disposições de ligações dissulfeto (LIU e MAY, 2012; WYPYCH et al., 2008). O produto Repatha[®] é uma IgG2, e isoformas de ligação dissulfeto com atividades biológicas comparáveis também foram detectadas para este mAb (EMA, 2015). Estimase que a massa molecular (MM) teórica de uma IgG intacta seja cerca de 150 kDa, o que está de acordo com a MM observada para ambos os mAbs. Nas amostras reduzidas, duas bandas de proteínas correspondentes às cadeias pesada e leve foram observadas, uma vez que as ligações dissulfeto intermoleculares presentes na região da dobradiça foram rompidas. A MM aparente dessas 2 bandas (~30 e ~50 kDa) correlaciona-se com a MM teórica de 50 kDa para a cadeia pesada e 25 kDa para a cadeia leve.

A formação de agregados/fragmentos pode diminuir a bioatividade e aumentar o potencial imunogênico e toxicológico dos produtos biofarmacêuticos (BERKOWITZ et al., 2012). Assim, a técnica de SEC-HPLC foi utilizada para caracterizar a heterogeneidade das amostras em termos da distribuição de espécies de alta massa molecular (HMMS), monômeros e espécies de baixa massa molecular (LMMS). Os cromatogramas representativos de SEC dos mAbs de referência e biossimilar podem ser observados nas Figuras 27B e 27C, respectivamente. Os resultados não mostraram diferenças significativas nos níveis de monômeros para ambos os mAbs, que são principalmente monoméricos (> 98%) e eluídos em ~13 min. Níveis baixos de HMMS, provavelmente decorrentes de dímeros de mAb, foram detectados no mAb de referência (1,2%),

enquanto concentrações ainda menores foram detectadas no mAb biossimilar (0,3% \pm 0,1). Além disso, baixos níveis de LMMS foram observados para o mAb biossimilar (1,2%), provavelmente relacionados a fragmentos de mAb ou proteínas residuais das células hospedeiras. De acordo com o relatório de avaliação da EMA sobre o Repatha[®] (2015), o mAb de referência existe predominantemente na forma de monômeros, com baixos níveis de HMMS e LMMS, compostos por dímeros de cadeia leve ou cadeias leves livres.





4.4.2. Mapeamento peptídico

Inicialmente, a análise do perfil cromatográfico dos peptídeos das amostras de mAb (referência e biossimilar) digeridas com tripsina/quimotripsina foi analisado por RP-HPLC. Os cromatogramas representativos para cada mAb podem ser observados na Figura 28. Um perfil bastante similar para ambos os mAbs foi obtido, sugerindo uma alta compatibilidade de estruturas primárias. A confirmação da sequência primária de aminoácidos do mAb biossimilar foi feita por mapeamento peptídico usando cromatografia líquida de fase reversa de nano-ultra-desempenho acoplada a espectrometria de massas sequencial (nanoRP-UPLC/MS-MS). A análise de MS/MS dos peptídeos trípticos obtidos confirmou cerca de 70% da composição de aminoácidos com base na digestão *in silico* da sequência do produto de referência Repatha[®] (Figura 29). Para aprovação de biossimilares, a estrutura primária deve ser idêntica ao produto de referência (KIRCHHOFF et al. 2016). Sendo assim, para a confirmação de 100% da sequência de aminoácidos de ambos os mAbs, novos experimentos envolvendo a combinação de outras endoproteases, como a Lys-C (cliva na região C-terminal de resíduos de lisina), Asp-N (cliva na região N-terminal de resíduos de asparagina) deverão ser realizados futuramente.



Figura 28. Cromatogramas representativos de RP-HPLC referentes a separação dos peptídeos das amostras de mAb digeridas com tripsina/quimotripsina.

Cobertura da cadeia pesada = 65.76%

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTLTSYGISWVRQAPGQ GLEWMGWVSFYNGNTNYAQKLQGRGTMTTDPSTSTAYMELR SLRSDDTAVYYCARGYGMDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLA PCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDK<u>TVERK</u> CCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVV HQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPP SREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP MLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGK

Cobertura da cadeia leve = 74.42%

ESALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNSVSWYQQHPGK APKLMIYEVSNRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYY CNSYTSTSMVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKA TLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAA SSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

Cobertura global= 69.60%

Figura 29. Cobertura da sequência de aminoácidos do mAb biossimilar obtida pela análise de mapeamento peptídico por UPLC-MS/MS. Os resíduos de aminoácidos identificados por MS/MS estão sublinhados.

4.4.3. Perfil de cargas

O perfil de cargas das amostras de mAb foi avaliado pela técnica de focalização isoelétrica capilar (icIEF) e os eletroferogramas representativos para o mAb de referência e para o biossimilar podem ser observados na Figuras 30. Ambos os mAbs exibiram perfis semelhantes, com quatro isoformas cada. Em geral, as isoformas de carga dos mAbs são definidas como acídicas ou básicas em relação ao ponto isoelétrico (pI) da espécie principal/majoritária (AMBROGELLY et al., 2018). O pI observado para o pico principal em cada amostra de mAb foi de 7,8 - 7,9, corroborando com o pI teórico de 7,89 do evolocumabe com base em sua sequência de aminoácidos. No entanto, o mAb biossimilar apresentou uma maior proporção da isoforma principal ($61,59 \pm 2,30\%$) do que o produto de referência ($53,59 \pm 1,07\%$). Duas espécies acídicas foram detectadas em ambas as amostras de mAb, com um intervalo de pI de 7,5 - 7,7 para o mAb de referência e, de 7,5 - 7,6 para o mAb biossimilar, representando ~38% de todas as espécies para o mAb de referência em ~30% para o mAb biossimilar. Uma variante básica com pI de 8,1 também foi observada em

pequenas quantidades (~8%) para ambos os mAbs. As heterogeneidades de carga podem se originar de desamidação, oxidação, agregação, glicanos carregados (sialilação), fragmentação, glicação, entre outras razões, e podem afetar os perfis de afinidade de ligação, farmacocinética e farmacodinâmica (PK/PD) de IgGs (NOWAK et al., 2017). As mesmas isoformas (acídicas, principais e básicas) também foram relatadas no relatório de avaliação da EMA para o Repatha[®]. Além disso, vários sítios de desamidação de asparagina nas frações acídicas, enriquecimento de HMMS nas frações básicas, oxidação de metionina, variantes de lisina na região C-terminal da cadeia pesada e variantes truncadas da cadeia leve foram reportados para o mAb de referência (EMA, 2015). Em resumo, esses resultados demonstraram que ambos os mAbs apresentam perfis de pI semelhantes, com algumas poucas diferenças no conteúdo relativo de suas isoformas.



Figura 30. Análise do perfil de cargas. Eletroferogramas representativos de: (A) mAb de referência; (B) mAb biossimilar. Os valores de pI e o conteúdo relativo dos picos acídicos, principal e básico foram resumidos em forma de tabela. O desvio padrão foi calculado a partir de medições duplicadas analíticas. Os asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas (p < 0.05).

4.4.4. Solubilidade relativa

Para a autoadministração subcutânea de pequenos volumes de anticorpos terapêuticos são necessárias formulações com alta concentração de proteína (WHITAKER et al., 2017), como no caso do Repatha[®] (140 mg/mL). Neste contexto, a solubilidade torna-se um aspecto importante que pode afetar a estabilidade e a atividade dos mAbs, bem como o desenvolvimento de formulações (MORE et al., 2016). Como mostrado na Figura 31, as curvas de precipitação por PEG foram plotadas para estimar dois parâmetros: (1) a concentração (% m/v) de PEG necessária para reduzir a concentração de proteína em 50% do seu valor inicial (ponto médio da concentração de PEG - %PEGmidpt) e (2) a solubilidade aparente, estimada a partir da interceptação no eixo y (quando a concentração de PEG é zero) produzida pela extrapolação linear quando a curva de solubilidade de PEG é plotada em escala logarítmica. As curvas de precipitação por PEG, para ambos os mAbs, mostraram-se semelhantes, ressaltando que a concentração dos mAbs em solução diminuiu de maneira similar quando a concentração de PEG-10.000 aumentou. Os mAbs de referência e biossimilar também apresentaram valores parecidos de %PEGmidpt (10,76% e 10,57%) e de solubilidade aparente (log 2,96 e 2,72 mg/mL). Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas para estes dois parâmetros.



Figura 31. Análise de solubilidade relativa. Comparação das curvas de precipitação com PEG 10.000 do mAbs de referência e biossimilar em: (A) escala de concentração linear para estimar o ponto médio da concentração de PEG (%PEG_{midpt}); (B) escala logarítmica para extrapolação do ajuste linear e estimativa da solubilidade aparente. Os valores do %PEG_{midpt} e solubilidade aparente estão resumidos em forma de tabela. As barras de erro e o desvio padrão referemse a medições em triplicata experimental. As linhas pontilhadas indicam os dados ajustados às curvas.

107

4.4.5. Perfil de N-glicosilação

A glicosilação é uma modificação pós-tradução muito prevalente e complexa em biofármacos, devido à sua heterogeneidade e sensibilidade a variações no processo de produção (linhagem celular, meio de cultivo, condições de cultivo) (HOSSLER et al., 2009). No presente trabalho, os N-glicanos foram clivados das amostras de mAb e suas estruturas foram analisadas por cromatografia líquida de interação hidrofílica de ultra alto desempenho (HILIC-UPLC). Esta análise foi feita de modo global, sem ser associada a digestões sucessivas das amostras por diferentes exoglicosidases, como realizado por CABRERA et al. (2005) e AGUEDO-ARIZA (2017). Cromatogramas representativos para os N-glicanos livres de ambos os mAbs podem ser observados na Figura 32. De todos os picos detectados para os mAbs, para cada um deles dois picos não coincidiram com os do outro mAb, porém todos os picos não coincidentes eram minoritários no respectivo mAb.



Figura 32. Análise do perfil de N-glicosilação. Cromatogramas representativos de HILIC-UPLC do: (A) mAb de referência; (B) mAb biossimilar. Todos os picos principais identificados foram enumerados conforme a Tabela 8. Os picos 1 e 10 são encontrados apenas no mAb de referência, enquanto os picos 4 e 13 são exclusivos do biossimilar.

A Tabela 8, baseada em cinco cromatogramas (como os da Figura 32) para cada mAb, mostra as estruturas possíveis dos N-glicanos detectados, de acordo com a base de dados GlycoStore (https://glycostore.org), para o mAb de referência e o biossimilar. Para a maioria dos picos, há mais de uma estrutura possível e somente um estudo mais aprofundado de glicosilação, por exemplo adotando digestão sequencial dos glicanos com exoglicosidases específicas,
permitiria a determinação definitiva da glicoforma em questão. Contudo, sabe-se que as glicoformas mais prevalentes em IgGs humanas são as glicoformas comumente denominadas G0, G0F, G1F, G2F e Man5, assim como é relatado que glicoformas bissectadas são muito raras em mAbs expressos por células CHO, devido à ausência do gene GnTIII em seu genoma, responsável por catalisar a formação de glicanos bissectados (REUSCH E TEJADA, 2015). Sendo assim, sugere-se que os picos 3, 5, 8 + 9, 11 e 6 se referem às glicoformas G0, G0F, G1F, G2F e Man5, respectivamente.

Tabela 8. Possíveis N-glicanos presentes no mAb de referência e no biossimilar. Os principais picos obtidos foram assinalados e as prováveis estruturas de
glicanos encontram-se agrupadas de acordo com as suas unidades de glicose (UG), segundo os dados depositados na GlycoStore. O desvio padrão foi calculado a
partir de cinco replicatas experimentais. ND: não detectado.

Pico	mAb referência Tempo de UG retenção (min)		mAb bios Tempo de retenção (min)	similar UG	Abundância mAb referência	relativa (%) mAb biossimilar	Possíveis estruturas conforme a GlycoStore	Nomenclaturas conforme a GlycoStore (nomenclatura Oxford)	Nomenclaturas usadas para glicosilação de IgGs (DE LEOZ et al., 2020)
1	$62,09 \pm 0,07$	4,93 ± 0,01	NE)	0,5±0,0	ND		A1; M3B	G0-N; Man3B
2	62,86±0,07	5,00 ± 0,01	62,86±0,05	5,00 ± 0,01	1,7±0,1	$0,4 \pm 0,1$		A1; M3B	G0-N; Man3B
3	67,11±0,07	5,49±0,01	67,24 ± 0,03	5,50±0,00	0 14,0±0,3	0,7±0,1		A2	G0
4	ND)	67,62±0,04	5,55±0,00) ND	$2,4 \pm 0,2$		A1G1	G1-N
5	71,27±0,07	5,97±0,01	71,27±0,04	5,96±0,00	62,6±0,8	56,6±1,2		F(6)A2	G0F

N-acetilglicosamina 🔘 Manose 🛕 Fucose 🕞 Galactose 🔶 N-acetilneuramínico

	mAb referência		mAb biossimilar		Abundância	relativa (%)	- Possíveis estruturas	Nomenclaturas conforme a	Nomenclaturas usadas	
Pico	Tempo de Pretenção (min)	G	Tempo de retenção (min) UG	mAb referência	mAb biossimilar	conforme a GlycoStore	(nomenclatura Oxford)	(DE LEOZ et al., 2020)	
6	$73,32 \pm 0,07$ $6,23 \pm$	0,01	73,31±0,04	6,23±0,01	12,5±0,2	2,0±0,1		M5; F(6)A2B; A2[6]G(4)1	Man5; G0FB; G1[6]	
7	$74,78\pm 0,07\ \ 6,42\pm$	0,01	$74,\!83\pm0,\!04$	6,43±0,01	0,8±0,1	1,1 ± 0,1		A2[3]G(4)1; A2[6]BG1	G1[3]; G1B	
8	$77,29 \pm 0,07$ $6,76 \pm$	0,01	$77,27 \pm 0,04$	$6,75 \pm 0,01$	2,3 ± 0,1	14,4 ± 0,5		F(6)A2[6]G(4)1; A2[3]BG(4)1; F(6)A2[3]G(4)1; F(6)A2BG(4)1	G1F[6]; G1B[3]; G1F[3]; G1FB	
9	$78,13 \pm 0,08$ $6,87 \pm$	0,01	$78,13 \pm 0,04$	6,87±0,01	2,7±0,1	16,8±0,4		F(6)A2[3]G(4)1; F(6)A2BG(4)1; F(6)A2[6]BG(4)1	G1F[3]; G1FB; G1FB [6]	
				N-acetilglico	osamina 🔵 Mano	ose 🔺 Fucos	e 🔵 Galactose 🔶 N-acetilneuramín	nico		

Tabela 8. Possíveis N-glicanos presentes no mAb de referência e no biossimilar. (Continuação)

	mAb refe	rência	mAb bios	similar	Abundância 1	relativa (%)	Possívois estrutures	Nomenclaturas conforme a	Nomenclaturas usadas para glicosilação de IgGs (DE LEOZ et al., 2020)	
Pico	Tempo de retenção (min)	UG	Tempo de retenção (min)	UG	mAb referência	mAb biossimilar	conforme a GlycoStore	GlycoStore (nomenclatura Oxford)		
10	$79,87 \pm 0,07$	7,11 ± 0,01	NE)	$1,2 \pm 0,2$	ND		F(6)A2[3]BG(4)1; A2G(4)1Ga(3)1	G1FB [3]; G1 + 1aGal	
11	83,17±0,37	7,62 ± 0,06	83,50±0,05	7,67±0,0	1 1,0 ± 0,3	$4,4 \pm 0,5$		F(6)A2G(4)2; F(6)A2BG(4)2	G2F; G2GB	
12	85,80 ± 0,06	8,02 ± 0,01	86,31 ± 0,05	8,11±0,01	0,6±0,2	0,7±0,1		F(6)A2[3]G(4)1S(6)1; F(6)A2[6]BG(4)1S(6)1; F(6)A2G(4)1S(6)1	G1FS[3] (NeuAc); G1FSB[6] (NeuAc);	
13	NE)	89,26±0,06	8,61±0,0	I ND	0,5±0,1		F(6)A2G(4)1S(6)1	G1FS (NeuAc)	
				N-acetilgli	cosamina 🔵 Ma	nose 🔺 Fucc	se 🔵 Galactose 🔶 N-acetilne	uramínico		

Tabela 8. Possíveis N-glicanos presentes no mAb de referência e no biossimilar. (Continuação)

Apesar de haver diferenças na distribuição de possíveis espécies de N-glicanos, em ambos os mAbs cerca de 95% destes se referem aos glicanos mais prevalentes em IgGs humanas (glicoformas comumente denominadas G0, G0F, G1F, G2F e Man5). No trabalho de GOETZE et al. (2011), por exemplo, o perfil de N-glicosilação de três diferentes mAbs da subclasse IgG2, produzidos por células CHO recombinantes na empresa Amgen (mesmo produtor do evolocumabe), foi detalhadamente analisado. Conforme a Figura 33, a distribuição apresentada pelo mAb biossimilar, considerando as glicoformas mais comumente encontradas em mAbs humanos, mostrou similaridade em relação à distribuição publicada na literatura para estas três moléculas de IgG2, enquanto que a distribuição do produto de referência Repatha[®], adquirido no mercado brasileiro, mostrou-se mais enriquecido em glicoformas G0 e com tempo de retenção compatível com alta manose (Man5). Adicionalmente, a glicoforma mais abundante para ambos os mAbs é a mesma, tratando-se de uma espécie complexa biantenária fucosilada (G0F). Esta glicoforma (com uma fucose no núcleo e ausência de galactose terminal nas antenas) é a principal encontrada em moléculas de IgG2, com abundância relativa aproximada de 60% (GOETZE et al., 2011). Para o mAb biossimilar, espécies de N-glicanos potencialmente imunogênicas em humanos, como por exemplo, contendo ácido N-glicolilneuramínico (NGNA) ou galactose- α1,3galactose (a -gal), não foram observadas (JONES, 2017). Por outro lado, no mAb de referência foi detectada a presença de glicanos que possivelmente poderiam conter α-gal, em abundância de $1,2\% \pm 0,2\%$, embora na monografia de aprovação do Repatha[®] (EMA, 2015) afirma-se que espécies a1,3-galactosiladas não haviam sido detectadas. Análises adicionais utilizando digestão sucessiva com exoglicosidases associada a HILIC-HPLC e espectrometria de massas precisarão ser feitas para permitir uma caracterização definitiva do perfil de N-glicosilação de ambos os mAbs, além da confirmação do sítio de glicosilação.



Figura 33. Abundância relativa dos glicanos mais prevalentes em IgGs humanas. Os dados referentes as três IgG2 (mAbs 1, 2 e 3) foram obtidos do trabalho de GOETZE et al. (2011).

Na literatura, existem poucas informações sobre o perfil de N-glicosilação de mAbs do tipo IgG2 aprovados para uso terapêutico, sendo estas baseadas principalmente em descrições sucintas genéricas encontradas em documentos regulatórios, como apresentado na Tabela 9. Entretanto, para mAbs de outras subclasses, diferenças no perfil de N-glicosilação já foram relatadas para produtos biossimilares em relação aos seus produtos de referência, como o adalimumabe (LEE et al., 2019) e o rituximabe (NUPUR et al., 2017). Nestes estudos, as diferenças no conteúdo de espécies de N-glicanos não tiveram efeito na atividade biológica, eficácia ou segurança dos mAbs. Além disso, existem vários outros estudos na literatura sobre a avaliação da comparabilidade de biossimilares do infliximabe. Por exemplo, FANG et al. (2016) realizaram um estudo de comparabilidade utilizando um infliximabe biossimilar (Inflectra[®]) e três diferentes lotes de Remicade[®] (referência). Dois N-glicanos exclusivos no Remicade[®] foram detectados, além de diferenças em relação ao conteúdo de espécies de baixa abundância potencialmente imunogênicas, como glicanos terminados em NGNA e α -gal. Os resultados desse grupo também demonstraram pequenas diferenças em relação às estruturas de ordem superior e ao conteúdo de HCP dos mAbs. LEE et al. (2017) também relataram diferenças de CQAs, como perfil de N-gliccosilação e atividade

biológica, para dois produtos biossimilares (Flixabi[®] / Renflexis[®] e Remsima[®] / Inflectra[®]) em relação ao Remicade[®] (referência). Eles observaram diferenças na abundância relativa de espécies de N-glicanos galactosilados, afucosilados, carregados e de alta manose, além de detectarem diferenças na ligação do receptor Fc gama e na resposta ADCC. Outro estudo reportou diferenças significativas entre o Remicade[®] e os biossimilares Remsima[®] e Inflectra[®] em relação à abundância relativa de oito espécies de N-glicanos, detectadas por CE-ESI-MS e LC-MS/MS (GIORGETTI et al., 2018). Já no trabalho de HONG et al. (2016), além de pequenas diferenças entre os produtos biossimilares (Flixabi[®] e Renflexis[®]) e o de referência (Remicade[®]) em relação aos glicanos carregados (contendo ácido N-acetilneuramínico), também foi observada uma variabilidade do perfil de N-glicosilação de diferentes lotes do mAb de referência. Um total de 80 lotes de Remicade[®], produzidos tanto nos Estados Unidos quanto na União Europeia, foram avaliados apresentando desvios padrão de 2-20% para diferentes tipos de glicanos. Nenhuma das diferenças observadas nos estudos supracitados envolvendo o infliximabe tive significância clínica ou impactaram na aprovação dos biossimilares.

A afinidade e especificidade de ligação ao antígeno de um biossimilar e de seu produto de referência devem ser comparáveis. Para mAbs biossimilares cuja função efetora é necessária, a ligação aos receptores de Fc e a atividade ADCC devem ser cuidadosamente caracterizadas. Por outro lado, se as funções efetoras não forem necessárias no modo de ação, como ocorre no caso do Repatha[®], diferenças na N-glicosilação ou na ligação aos receptores Fc provavelmente não terão um impacto significativo na potência e na segurança do mAb (VIDARSSON et al., 2014; ISHII-WATABE E KUWABARA, 2018). Isto é confirmado pela informação constante na monografia de aprovação do Repatha[®] na União Europeia (EMA, 2015), de que a desglicosilação do mAb não afeta a sua potência. Neste contexto, fica ainda mais claro que as diferenças no perfil de N-glicosilação observadas neste estudo são bastante razoáveis aceitáveis e muito provavelmente pouco relevantes em termos clínicos.

Tabela 9. Informações disponíveis em documentos regulatórios para mAbs do tipo IgG2 aprovados.

Produto	Informações reportadas	Referências
Repatha® (evolocumabe)	O sítio de glicosilação (HC Asn291) encontra-se quase que totalmente ocupado. A desglicosilação não afeta a potência do evolocumabe. Nenhum glicano do tipo O ou glicanos imunogênicos, contendo o ácido N-glicolilneuramínico (NGNA) ou espécies α -(1-3) galactosiladas foram detectados. As estruturas estimadas dos glicanos são: biantenárias fucosiladas; biantenárias fucosiladas galactosiladas (G0F, G1F, G2F); alta manose.	EMA, 2015; PMDA, 2015
Prolia® (desonumabe)	O denosumabe possui um sítio único de glicosilação (HC Asn 299) contendo estruturas de glicanos biantenárias fucosiladas, galactosiladas e sialiladas.	EMA, 2010
Vectibix® (panitumumabe)	O panitumumabe possui um sítio único de glicosilação em cada uma de suas cadeias pesadas, contendo estruturas de glicanos predominantemente biantenárias galactosiladas ou não. Espécies fucosiladas também foram observadas. Nenhum glicano do tipo O foi detectado.	EMA, 2007
Ajovy® (fremanezumabe)	O fremanezumabe possui um sítio único de glicosilação (HC Asn 298). O padrão de glicosilação encontrado é "similar ao observado para mAbs".	EMA, 2019

4.4.6. Ligação à PCSK9

A cinética de ligação *in vitro* das amostras de mAb à proteína alvo PCSK9 foi caracterizada pela técnica de BLI, usando o equipamento Octet (Pall). Os sensorgramas representativos para as curvas de associação e dissociação estão apresentados na Figura 34A, para o mAb de referência, e na Figura 34B, para o mAb biossimilar. Ambos os mAbs mostraram ter alta afinidade pela PCSK9, com $K_D < 3$ nM. Não foram observadas diferenças significativas para nenhum dos parâmetros cinéticos. Esses valores (na faixa de nanomolar) estão de acordo com outros estudos que compararam a afinidade *in vitro* de vários mAbs anti-PCSK9 usando plataformas diferentes, incluindo o equipamento Octet (YANG et al., 2016). No entanto, uma afinidade de ligação de 16 pM foi reportada para o Repatha[®] (EMA, 2015). Essa diferença entre os dados relatados e os observados no presente trabalho para o produto de referência provavelmente está relacionada a problemas de limite de detecção ($K_D < nM$) associados à tecnologia de BLI. O modo de ação do produto Repatha[®] se baseia na simples neutralização da PCSK9 em solução, não envolvendo funções efetoras associadas à sua porção Fc (EMA, 2015), como já esperado para moléculas do tipo IgG2 humanas (VIDARSSON et al., 2014).



Figura 34. Análise de ligação a PCSK9 *in vitro*. Curvas representativas de associação e dissociação determinadas por BLI em 3 concentrações de PCSK9 (25-100 nM) para: (A) mAb de referência; (B) mAb biossimilar. Os parâmetros cinéticos K_D (constante de dissociação de equilíbrio), k_{on} (constante de taxa de associação) e k_{dis} (constante de taxa de dissociação) estão apresentados em forma de tabela. O desvio padrão foi calculado a partir de seis medições independentes.

4.4.7. Estruturas secundária e terciária

As técnicas espectroscópicas de CD, fluorescência e Raman foram empregadas para fornecer informações sobre as estruturas secundária e terciária dos mAbs estudados. Proteínas enoveladas possuem padrões específicos de estrutura secundária, como alfa-hélices, folhas-beta, voltas, estruturas randômicas, que apresentam espectros de dicroísmo circular característicos. Neste contexto, a espectroscopia de CD é amplamente utilizada para analisar alterações de estrutura secundária de proteínas em diferentes condições de pH e temperatura, através da medição da diferença de absorção da luz circularmente polarizada à direita e à esquerda nas amostras (GREENFIELD, 2006).

Como mostrado na Figura 35A, os mAbs de referência e biossimilar compartilham espectros de CD bastante similares a 10 °C (temperatura inicial do experimento em que os mAbs estariam em sua forma enovelada) na região de UV-distante (200 - 260 nm). Um pico mínimo em

torno de 217 nm foi observado para todos os valores de pH, sendo uma assinatura característica para a estrutura predominante de folhas-beta nas IgGs (CHENG et al., 2012). Para investigar o efeito da temperatura na estrutura secundária dos mAbs, curvas de desnaturação térmica foram plotadas monitorando a elipticidade molar residual média (MRME) a 217 nm em função da temperatura. No geral, as curvas térmicas se sobrepuseram para os dois mAbs (Figura 35B). As variações de MRME mostraram-se dependentes do pH, apresentando um evento de desnaturação térmica principal. Além disso, para os valores de pH variando entre 4,5 e 7,5, uma precipitação dos mAbs foi observada com o aumento de temperatura, caracterizada pelo aumento do sinal de CD a 217 nm no final das curvas. Os valores calculados da T_m para o mAb de referência e o biossimilar foram muito similares, conforme mostrado na Tabela 10. A estabilidade geral de estrutura secundária foi ligeiramente maior no pH 7,5 (~69 °C), comparável nos valores de pH 6,5; 5,5; 4,5 (~66 °C) e inferior em pH 3,5 (~53 °C). O conteúdo de estrutura secundária foi predito de forma "grosseira" pelo servidor online BeStSel (MICSONAI et al., 2015) usando os dados dos espectros de CD a 10 °C nos diferentes valores de pH. Como observado na Figura 36, ambos os mAbs apresentaram uma distribuição de padrões de estrutura secundária bastante similar. Nenhuma diferença foi observada dentre os valores de pH testados.



Figura 35. Espectros de dicroísmo circular na região do UV distante. (A) Comparação de espectros de CD dos mAbs de referências e biossimilar em diferentes pHs a 10 °C. Os valores de ESD (diferença de erro espectral) estão reportados. (B) Comparação das curvas de desenovelamento térmico mostrando os efeitos da temperatura e do pH na elipticidade molar residual média (MRME) do sinal de CD a 217 nm. As barras de erro representam o desvio padrão de duplicatas analíticas.



Figura 36. Comparação do conteúdo de estrutura secundária dos mAbs. A deconvolução dos dados foi feita com o auxílio do servidor online BeStSel utilizando as informações dos espectros de CD dos mAbs a 10 °C. Não foi observada nenhuma diferença entre os valores de pH estudados.

A espectroscopia de Raman foi usada como método complementar ao CD, fornecendo informações sobre as estruturas secundária e terciária dos mAbs a partir de seus estados vibracionais. A espectroscopia de Raman é capaz de fornecer uma impressão digital das proteínas na faixa de 2000 a 400 cm⁻¹, gerando espectros com informações vibracionais sobre ~30 bandas relacionadas tanto ao esqueleto polipeptídico das proteínas, quanto as cadeias laterais dos 20 diferentes resíduos de aminoácidos (WEN, 2007). Usando a espectroscopia Raman, as bandas de Amida I (1600 - 1700 cm⁻¹), triptofano (1520 - 1580 cm⁻¹) e tirosina (780 - 920 cm⁻¹) foram analisadas. As vibrações relacionadas ao esqueleto polipeptídico dos mAbs foram monitoradas através da banda Amida I (1600 - 1700 cm-1), que é uma banda indicadora de mudanças conformacionais nas ligações peptídicas (O=C-N-H). Em proteínas ricas em folhas-beta, como os mAbs, a banda de Amida I aparece geralmente em torno de 1670 cm⁻¹ (WEN, 2007). Já os picos referentes aos resíduos de aminoácidos aromáticos (triptofano e tirosina) informam sobre o perfil de enovelamento tridimensional dos mAbs. A comparação dos espectros normalizados de Raman dos mAbs de referência e biossimilar em diferentes valores de pH pode ser observada na Figura 37. No geral, os mAbs exibiram espectros similares para todas as três regiões. Pequenas diferenças relacionadas aos máximos da banda de Amida I e de tirosina foram detectadas em pH 7,5.



	IVIAXITIO D	anua ue Annua	r (cm -)	POSIÇÃO U	a banua ue irp (CIII -)	Posição da Dalida de Tyr (cili -)			
рΗ	Referência	Biossimilar	Valor de p	Referência	Biossimilar	Valor de p	Referência	Biossimilar	Valor de p	
3,5	1669,80 ± 0,56	1669,42 ± 0,20	0,3304	1551,41 ± 0,26	1551,54 ± 0,10	0,4642	855,72 ± 0,13	855,57 ± 0,20	0,3373	
4,5	1669,69 ± 0,43	1669,80 ± 0,56	0,8006	1552,27 ± 0,28	1552,18 ± 0,24	0,6942	855,89 ± 0,17	856,17 ± 0,19	0,1299	
5,5	1670,19 ± 1,15	1670,03 ± 0,43	0,8325	1551,80 ± 0,44	1551,93 ± 0,36	0,7163	855,50 ± 0,07	855,70 ± 0,31	0,3370	
6,5	1669,92 ± 0,67	1669,53 ± 0,00	0,3704	1552,58 ± 0,18	1552,33 ± 0,43	0,4055	855,53 ± 0,21	855,52 ± 0,14	0,9486	
7,5	1670,42 ± 0,24	1669,42 ± 0,20	0,0052*	1551,86 ± 0,31	1551,96 ± 0,31	0,7129	857,31 ± 0,14	855,21 ± 0,18	0,0001*	

Figura 37. Análise por espectroscopia de Raman. Espectros comparativos de Raman para: (A) banda de Amida I; (B) banda de triptofano; (C) bandas da região da tirosina dos mAbs de referência e biossimilar em diferentes valores de pH. As barras de erro e o desvio padrão referem-se a triplicatas analíticas. As posições de cada pico estão listadas para cada condição investigada. Os asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas (p <0,05).

Dentre as técnicas espectroscópicas de baixa resolução, a espectroscopia de fluorescência é largamente utilizada para caracterizar a estrutura terciária de proteínas e acompanhar mudanças conformacionais discretas no microambiente dos resíduos de aminoácidos aromáticos (triptofano, tirosina e fenilalanina), que possuem grupamentos fluorescentes naturais. Mudanças na emissão de fluorescência fornecem informações sobre a acessibilidade do solvente e sobre a hidrofobicidade do meio ao redor destes resíduos. O resíduo de triptofano (Trp) é o mais relevante nestes estudos, gerando o maior sinal e atuando como sonda para a análise da estrutura terciária das proteínas (LAKOWICZ et al., 1999). A espectroscopia de fluorescência (intrínseca e extrínseca) foi utilizada para avaliar a estrutura terciária global das amostras de mAb e para monitorar sua estabilidade conformacional em função da temperatura sob diferentes condições de pH. O evolocumabe contém 18 resíduos de Trp (2,6% de sua composição de aminoácidos). Como mostrado na Figura 38A, os mAbs de referência e biossimilar apresentaram espectros de emissão altamente semelhantes a 10 ºC. Uma intensidade máxima de fluorescência a ~335 nm foi observada em todos os valores de pH, indicando um ambiente relativamente hidrofóbico para os resíduos Trp. As curvas de desnaturamento térmico foram plotadas monitorando o centro espectral de massa versus a temperatura. Esse método foi escolhido devido à sua maior sensibilidade para a detecção de alterações conformacionais sutis (WEI et al., 2018). Curvas de desnaturação térmica semelhantes foram observadas para ambos os mAbs em todos os valores de pH (Figura 38B). Uma grande transição térmica foi observada em todas as condições para ambos os mAbs, com um aumento na posição do centro de massa espectral ao longo da rampa de temperatura. Os valores de T_m para o mAb de referência e para o biossimilar foram similares em geral, com valores mais altos detectados para o mAb biossimilar em pH 4,5 e 5,5, conforme resumido na Tabela 10. Observou-se que a estabilidade da estrutura terciária dos mAbs era mais alta em pH 7,5; 6,5 e 5,5 (~66 - 68 °C), ligeiramente mais baixa em pH 4,5 (~62 - 64 °C) e muito mais baixa em pH 3,5 (~51 - 52 °C), conforme o esperado.

A espectroscopia de fluorescência extrínseca foi usada como método complementar para monitorar alterações na estrutura terciária dos mAbs. O *SYPRO Orange* é um corante fluorescente usado para sondar alterações na acessibilidade de regiões hidrofóbicas das proteínas, uma vez que se torna fortemente fluorescente ao interagir com ambientes menos polares (CHENG et al., 2012). Para investigar o efeito da temperatura na hidrofobicidade superficial dos mAbs, as curvas de desnaturação térmica foram plotadas monitorando a intensidade do pico de emissão de

fluorescência de SYPRO Orange em função da temperatura (Figura 38C). As curvas apresentaram tendências consistentes para os dois mAbs. Inicialmente, a intensidade do SYPRO Orange se manteve praticamente constante, até que a temperatura atingisse a temperatura inicial de transição (Tonset), onde a intensidade aumenta acentuadamente, indicando maior acessibilidade do corante às superfícies apolares dos mAbs devido a sua desnaturação. Foi observada uma diminuição na intensidade de fluorescência para todos os valores de pH em temperaturas superiores a temperatura de compensação (Toffset). Isso pode ser explicado pela agregação de proteínas que causa a liberação do corante das regiões hidrofóbicas expostas anteriormente e/ou pelo aumento do efeito de quenching (supressão de fluorescência) a temperaturas mais elevadas (CHENG et al., 2012). Os valores de T_m determinados por essa técnica também foram semelhantes para os mAbs de referência e biossimilar (Tabela 10). Em pH 3,5, duas transições térmicas foram detectadas em torno de 34 - 36 °C e 51 °C, sugerindo que os mAbs são termicamente mais instáveis nesse valor de pH. Em valores mais altos de pH, uma única transição foi observada a ~56 - 59 °C (pH 4,5), ~66 °C (pH 5,5), ~67 - 68 °C (pH 6,5), ~66 - 67 °C (pH 7,5), mostrando que a estabilidade dos mAbs é pH dependente. Em resumo, esses resultados indicam que as estruturas de ordem superior dos mAbs são bastante semelhantes, mesmo em uma ampla faixa de condições de temperatura e pH.



Figura 38. Análise por espectroscopia de fluorescência. (A) Comparação dos espectros de fluorescência intrínseca de Trp a 10 °C para os mAbs de referência e biossimilar em diferentes valores de pH. (B) Comparação das curvas de desenovelamento térmico mostrando o efeito da temperatura e do pH no centro espectral de massa dos espectros de fluorescência intrínseca de Trp. (C) Comparação das curvas de desenovelamento térmico mostrando o efeito da temperatura e do pH no centro espectral de massa dos espectros de temperatura e do pH na intensidade de fluorescência extrínseca do corante *SYPRO Orange*. As barras de erro representam o desvio padrão de duplicatas analíticas.

4.4.8. Propensão à agregação e conformação global

O comportamento de agregação das amostras de mAb foi estudado por DLS. O diâmetro hidrodinâmico de cada amostra de mAb foi sondado em função da temperatura (10 - 80 °C) para avaliar sua estabilidade conformacional e coloidal, conforme mostrado na Figura 39A. No geral, o comportamento de agregação dos mAbs induzido pelo aumento de temperatura apresentou tendências semelhantes. Em pH 3,5, observou-se um aumento do tamanho dos mAbs de 9 a 18 nm, sugerindo microagregação das amostras em condições muito ácidas, conforme relatado anteriormente para outra IgG2 (CHENG et al., 2012). Em todos os outros valores de pH, o diâmetro hidrodinâmico manteve-se semelhante (10 - 13 nm) até a temperatura atingir 70 - 74 °C, o que resultou em um aumento significativo de tamanho devido à agregação. Os valores de T_{onset} (temperatura inicial de transição) para os dois mAbs foram semelhantes (Tabela 10). Uma segunda análise de DLS foi realizada a 25 °C usando cinco réplicas de cada mAb a 0,7 mg/mL em PBS. Os diâmetros hidrodinâmicos observados para os mAbs de referência e biossimilar foram de 9,58 \pm 0,33 nm e 10,46 \pm 0,94 nm, respectivamente, não sendo estatisticamente diferentes (p = 0,2001). As moléculas de mAb monomérico geralmente apresentam um tamanho de 9 - 12 nm (ARORA et al., 2015), o que é condizente com os dados reportados.

Alterações induzidas pela temperatura na conformação geral dos mAbs também foram analisadas por DSC de 10 - 110 °C. Este método mede mudanças na capacidade térmica de uma amostra resultantes da ruptura de forças que estabilizam a estrutura da proteína nativa. Os valores de T_m são indicativos do grau de estabilidade conformacional (JOHNSON, 2013). A sobreposição dos termogramas de DSC para os mAbs de referência e biossimilar pode ser observada na Figura 39B. Duas transições endotérmicas principais foram identificadas, provavelmente associadas a desnaturação dos domínios CH2 e Fab/CH3 das amostras de mAb, conforme relatado anteriormente para moléculas de IgG2 (ITO E TSUMOTO, 2013). As temperaturas iniciais de transição (T_{onset}) também foram calculadas para todas as condições de pH. Os valores de T_m e T_{onset} resultantes para ambos os mAbs foram semelhantes, com algumas diferenças mínimas, conforme relatados matematicamente para três transições. Em pH 3,5, as seguintes T_m foram calculadas: 36 - 37 °C; 54 °C e 59 °C. Já em pH 4,5, foram aproximadamente 59 °C; 66 °C e 74 °C, sugerindo que os mAbs são termicamente mais lábeis em ambientes mais ácidos. Em valores mais altos de pH (5,5, 6,5 e

7,5), duas transições foram observadas a ~68 - 69 °C e ~77 °C. No geral, os mAbs apresentaram propensão à agregação e estabilidade conformacional semelhantes.



Figura 39. Análises de propensão à agregação e de estabilidade conformacional global. (A) Espalhamento de luz dinâmico (DLS). Avaliação do efeito do pH e da temperatura no diâmetro hidrodinâmico dos mAbs de referência e biossimilar. As barras de erro representam o desvio padrão de duplicatas analíticas. (B) Calorimetria de varredura diferencial (DSC). Termogramas representativos mostrando o efeito do pH e da temperatura na estabilidade conformacional dos mAbs.

		T _m 1 (°C)			T _m 2 (°C)			T _m 3 (°C)			Tonset (°C)	
Método analítico/pH	Referência	Biossimilar	Valor de p	Referência	Biossimilar	Valor de p	Referência	Biossimilar	Valor de p	Referência	Biossimilar	Valor de p
CD												
pH 3,5	$52{,}63\pm0{,}89$	$53{,}82\pm1{,}16$	0,3688	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
pH 4,5	$67,01 \pm 1,10$	$66,51 \pm 0,11$	0,5879	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
pH 5,5	$66,23 \pm 0,35$	$66{,}80\pm0{,}81$	0,4574	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
pH 6,5	$66,86 \pm 0,37$	$67,\!12\pm0,\!35$	0,5453	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
pH 7,5	$69,13 \pm 0,00$	$69,00 \pm 0,72$	0,8283	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
FL intrínsica												
pH 3,5	$51{,}58\pm0{,}30$	$52,42 \pm 0,11$	0,0653	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
pH 4,5	$62,\!60 \pm 0,\!39$	$64,12 \pm 0,20$	0,0391*	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
pH 5,5	$66,47 \pm 0,19$	$68,56 \pm 0,20$	0,0086*	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
pH 6,5	$67,87 \pm 0,21$	$67,79 \pm 0,11$	0,6803	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
pH 7,5	$67,38 \pm 0,09$	$67,79 \pm 0,11$	0,0552	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
FL extrínsica												
pH 3,5	$34,87 \pm 1,29$	$36,81 \pm 0,00$	0,1673	$51,44 \pm 1,60$	$51,44 \pm 1,52$	1,0000	NA	NA	NA	NA	NA	NA
pH 4,5	$59,48 \pm 4,64$	$56,84 \pm 1,52$	0,5844	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
pH 5,5	$66,17 \pm 0,07$	$66,17 \pm 0,07$	1,0000	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
pH 6,5	$67,41 \pm 2,61$	$68,03 \pm 2,52$	0,8315	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
pH 7,5	$67,49 \pm 2,56$	$66,72 \pm 1,32$	0,7417	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
DSC												
pH 3,5	$36,63 \pm 0,47$	$37,45 \pm 0,08$	0,1355	$54,17 \pm 0,59$	$54,27 \pm 0,04$	0,8333	$59,13 \pm 0,21$	$59,33 \pm 0,08$	0,3352	$24,85 \pm 0,58$	$26,69 \pm 0,06$	0,0467*
pH 4,5	$59,16 \pm 0,08$	$59,04 \pm 0,01$	0,1699	$66,68 \pm 0,02$	$66,62 \pm 0,03$	0,1429	$74,26 \pm 0,05$	$74,08 \pm 0,01$	0,0379*	$51,44 \pm 2,23$	$51,90 \pm 0,28$	0,7995
pH 5,5	$68,57 \pm 0,02$	$68,\!67 \pm 0,\!01$	0,0241*	$77,74 \pm 0,04$	$77,57 \pm 0,02$	0,0329*	NA	NA	NA	$59,99 \pm 0,39$	$61,14 \pm 0,29$	0,0789
pH 6,5	$69,45 \pm 0,12$	$69,56 \pm 0,01$	0,3255	$77,84 \pm 0,01$	$77,81 \pm 0,01$	0,0955	NA	NA	NA	$61,58 \pm 0,25$	$61,\!44 \pm 0,\!07$	0,5254
pH 7,5	$69,26 \pm 0,01$	$69,50 \pm 0,01$	0,0017	$77,58 \pm 0,03$	$77,56 \pm 0,06$	0,7143	NA	NA	NA	$61,\!80\pm0,\!30$	$61,75 \pm 0,14$	0,8507
DLS												
pH 3,5	$78,\!83\pm0,\!88$	$79,62 \pm 0,09$	0,3339	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
pH 4,5	$73,95 \pm 0,86$	$73,\!10\pm0,\!33$	0,3218	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
pH 5,5	$73,\!83 \pm 1,\!05$	$72,16 \pm 1,93$	0,3949	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
pH 6,5	$70,66 \pm 0,39$	$70,16 \pm 2,73$	0,8216	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
pH 7,5	$74,57 \pm 2,41$	$74{,}47\pm0{,}00$	0,9585	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA

Tabela 10. Resumo das temperaturas de transição (Tm) dos mAbs calculadas por ensaios biofísicos.

* Os asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas (p <0,05). NA: não aplicável, FL: espectroscopia de fluorescência.

4.4.9. Perfil de estabilidade (pH versus temperatura)

Os perfis de estabilidade dos mAbs anti-PCSK9 foram avaliados em tampão citrato-fosfato em uma ampla faixa de pH (pH 3,5 - 7,5) e de temperaturas. As proteínas perdem sua conformação nativa acima de determinadas temperaturas e, a temperatura na qual 50% das moléculas estão desenoveladas é definida como T_m (temperatura de desenovelamento). A T_m foi determinada usando os vários métodos biofísicos listados na Tabela 10. Neste estudo, foi observada uma forte dependência do pH na estabilidade dos mAbs e, como esperado, as amostras se mostraram menos estáveis em condições acídicas. As espectroscopias de CD e de fluorescência intrínseca sondaram alterações na estrutura secundária e terciária que apresentaram valores de T_m similares (> 50 °C). Os métodos de fluorescência extrínseca e DSC detectaram transições de temperatura mais baixas (~35 °C) em valores de pH ácido, indicando a presença de estados parcialmente desenovelados com regiões hidrofóbicas expostas e alterações estruturais nos domínios dos mAbs. A técnica de DLS demonstrou que ocorreu uma agregação significativa dos mAbs em temperaturas > 70 °C, vários graus acima das outras mudanças estruturais observadas.

Além do cálculo dos valores da T_m e da comparação gráfica direta, também foi empregada uma ferramenta de visualização conhecida como diagrama empírico de fases (EPD), para resumir a similaridade dos mAb a partir dos vários métodos biofísicos empregados. O EPD combina um conjunto de dados multidimensionais de diferentes tipos de métodos analíticos em uma imagem colorida em função de variáveis como temperatura, pH, força iônica, entre outras. Os dados são combinados em forma de matriz e convertidos em um mapa colorido, permitindo uma melhor interpretação visual dos conjuntos de dados complexos em zonas de comportamento estrutural distintas (KIM et al., 2012; MADDUX et al., 2011). A Figura 40 mostra os EPDs dos mAbs de referência (Figura 40A) e biossimilar (Figura 40B). Os conjuntos de dados individuais das técnicas usadas para geração dos EPDs podem ser observados nas Figuras 35B, 36B, 36C, 39A e 39B. No EPD, cores semelhantes representam regiões com características estruturais semelhantes, enquanto as alterações de cores refletem alterações estruturais. Quatro estados (ou regiões) estruturalmente distintos foram identificados para ambos os mAbs. A região I indica uma região estável onde os mAbs estão em seu estado nativo; a região II refere-se a um estado estruturalmente alterado, mas não agregado; a região III é uma região estruturalmente alterada e altamente agregada; e a região IV é uma fase em que os mAbs estão em um estado completamente desnaturado. Um trabalho

anterior utilizando uma molécula modelo de IgG2 também descreveu as mesmas regiões acima mencionadas, indicando semelhanças no perfil de estabilidade entre as IgG2 (CHENG et al., 2012).

Os EPDs têm sido utilizados com sucesso para investigar a estabilidade de uma variedade de macromoléculas (proteínas, peptídeos, vacinas, plasmídeos) e o desenvolvimento de estratégias de formulação racional com base nessa abordagem estão resumidos em outros lugares (MADDUX et al., 2011). Entretanto, apenas alguns estudos exploraram essa abordagem para avaliação de biossimilaridade (HICKEY et al., 2018; ALSENAIDY et al., 2014b). A exploração do potencial dos métodos biofísicos em diferentes condições de estresse, como por exemplo, de temperatura e pH, contribui para uma caracterização estrutural e funcional comparativa mais abrangente.



Figura 40. Visualização dos dados de estabilidade em diferentes temperaturas e pHs. Diagramas de empíricos de fase do (A) mAb de referência e do (B) mAb biossimilar. Quatro estados estruturais distintos foram observados: (I) região de conformação nativa; (II) região estruturalmente alterada; (III) região estruturalmente alterada e altamente agregada; (IV) região de fronteira entre I e III.

4.4.10. Resumo dos resultados de caracterização

No geral, ambos os mAbs mostraram-se semelhantes em termos de pureza; sequência primária; estruturas secundária e terciária; heterogeneidade de cargas e tamanho; solubilidade aparente e estabilidade biofísica sob condições variadas de temperatura e pH. Considerando o modo de ação do evolocumabe e os resultados de ligação *in vitro* para as amostras de mAb anti-PCSK9, é improvável que as diferenças de N-glicosilação observadas tenham um impacto clínico relevante. No entanto, como quaisquer diferenças comparativas identificadas são consideradas em termos de biossimilaridade, investigações adicionais por meio de estudos *in vitro* e *in vivo* devem ser realizadas para garantir a segurança, eficácia e propriedades de PK/PD do mAb biossimilar produzido. A identificação precoce dessas diferenças é claramente crítica. Neste trabalho, estas puderam ser identificados rapidamente, ainda durante a etapa de desenvolvimento em escala de laboratório, fornecendo subsídios para trabalhos futuros.

De acordo com o FDA, uma abordagem de três níveis deve ser empregada para avaliar estatisticamente a biossimilaridade analítica com base na identificação e classificação de atributos críticos de qualidade (CQAs). Resumidamente, CQAs com alto impacto na atividade biológica, segurança ou imunogenicidade são atribuídos a uma análise de nível I (avaliação estatística por teste de equivalência), já os CQAs de impacto moderado são atribuídos a uma análise de nível II (avaliação estatística por faixa de qualidade) e, finalmente, os CQAs de baixo impacto, quando aos quais é impossível realizar análises estatísticas relevantes, são atribuídos a uma análise de nível III (dados brutos ou apresentação gráfica dos resultados) (KIRCHHOFF et al., 2017; FDA, 2015; CHOW et al., 2016). Com base neste princípio, a Tabela 11 resume os principais CQAs identificados no presente estudo.

Apesar da falta de informações sobre o processo de fabricação do produto de referência e da utilização de uma linhagem parental de células CHO possivelmente diferente, de um meio de cultivo diferente, de condições de cultivo não otimizadas em batelada e de uma única etapa de purificação, foi possível produzir em escala laboratorial um mAb semelhante ao evolocumabe. Os resultados promissores obtidos podem guiar uma futura otimização das etapas de *upstream* e *downstream* para a produção de mAbs biossimilares.

Categoria	Atributo crítico de qualidade	Método analítico	Nível (conforme FDA)	Resultados obtidos		
Estrutura primária	Sequência de aminoácidos	LC-MS/MS	Ι	Possivelmente idêntica ao PR		
				(~70% de cobertura)		
	Estrutura secundária	CD, Raman				
Estruturas de ordem	Estrutura terciária	FL, Raman	II/III	Similar ao PR		
superior	Conformação global	DSC				
	Propensão à agregação	DLS				
Heterogeneidade de	Perfil de cargas	cIEF	II	Similar ao PR, com algumas diferenças de abundância		
cargas	pI			Similar ao PR		
Glicosilação	Perfil de N-glicanos	HILIC-HPLC	Π	Diferenças detectadas, mas possivelmente com pouca relevância clínica		
Solubilidada	Solubilidade aparente	Precipitação	п	Similar of DD		
Solubilidade	%PEGmidpt	com PEG	11	Similar ao PK		
	HMMS			Menores níveis que no PR		
Variantes de tamanho	Monômeros	SEC-HPLC, SDS-PAGE	II	Similar ao PR		
	LMMS			Baixos níveis (ausentes no PR)		
Funções	Identidade/Pureza	Western blot	II			
imunoquímicas	Ligação <i>in vitro</i> ao antígeno	BLI	Ι	Similar ao PR		

Tabela 11. Resumo dos principais atributos críticos de qualidade (CQAs) avaliados no estudo de comparabilidade do mAb biossimilar anti-PCSK9 produzido e do produto de referência Repatha[®]. PR: produto de referência

4.5. Estudos de formulação e estabilidade

Os produtos biológicos terapêuticos são susceptíveis à degradação em diferentes etapas do processo produtivo, degradação esta que pode ser causada por diversos tipos de estresse (temperatura, pH, osmolalidade, proteases, exposição à luz, agitação, contato com superfícies e materiais). Portanto, o desenvolvimento de formulações adequadas, que estabilizem esses produtos, é essencial (CHANELLER, 2015; WANG, 2015). No presente trabalho, estudos foram realizados para avaliar a estabilidade térmica e coloidal (propensão à agregação) dos mAbs anti-PCSK9 em diferentes formulações/excipientes, de modo a auxiliar no desenvolvimento futuro de uma formulação adequada para o candidato a biossimilar desenvolvido. Estes estudos foram

realizados em três etapas: (1) seleção comparativa de excipientes; (2) estudo comparativo de degradação acelerada, utilizando 0,1 mg/mL dos mAbs; e (3) estudo de estabilidade do mAb de referência (Repatha[®]) a 140 mg/mL em diferentes formulações.

4.5.1. Seleção de excipientes

Uma grande variedade de excipientes pode ser utilizada na estabilização de proteínas, como: açúcares, sais, polímeros, surfactantes, aminoácidos, dentre outros. Eles auxiliam na prevenção da agregação, na redução de adsorção em superfícies ou na modulação da osmolalidade ou viscosidade das soluções (OHTAKE et al., 2011). O produto Repatha[®], por exemplo, é formulado a 140 mg/mL em solução aquosa contento acetato (agente tamponante), prolina (agente de tonicidade e modulador de viscosidade), polisorbato 80 (surfactante) e hidróxido de sódio (agente de ajuste de pH) (EMA, 2015).

Para o desenvolvimento eficiente de formulações, a definição de um pH ótimo para estabilização da proteína terapêutica é fundamental. De acordo com os dados dos ensaios biofísicos realizados e de sua combinação via EPDs, observou-se que a faixa de pH entre 5,5 - 7,5 garante uma conformação estável para ambos os mAbs. A maioria dos mAbs terapêuticos disponíveis comercialmente (~75%) são formulados na faixa de pH de 5,0 - 6,5 (NEMA, 2011), sendo que o mAb de referência usado neste estudo, por exemplo, é formulado em pH 5,0. Considerando estas informações, dois tampões foram selecionados para o ensaio de seleção de excipientes: tampão citrato de sódio/ácido cítrico 100 mM, pH 6,0 e tampão acetato de sódio/ácido acético 100 mM, pH 5,0. Devido a limitações de massa disponível do mAb biossimilar, apenas o tampão citrato foi avaliado. Trinta diferentes excipientes (dentre aminoácidos, osmólitos/carboidratos, sais, surfactantes, polióis, polímeros, ciclodextrinas, agentes quelantes, agentes caotrópicos) foram selecionados (Tabela 6), considerando a literatura para formulação de mAbs (KANG et al., 2016) e a experiência prévia do Macromolecule and Vaccine Stabilization Center (Universidade do Kansas, EUA). A influência dos excipientes na estabilidade térmica dos mAbs foi analisada por espectroscopia de fluorescência intrínseca dos resíduos de triptofano utilizando placas de 384 poços. O uso de técnicas de *screening* de alta capacidade permite que uma grande quantidade de dados seja coletada rapidamente com menores gastos de amostras e consumíveis, sendo cada vez mais utilizadas para explorar diferentes condições nos estágios iniciais de desenvolvimento de formulações (GOLDBERG et al., 2017). Através de curvas de desnaturação térmica, foi possível calcular a T_m de cada amostra, permitindo o ranqueamento dos diferentes excipientes em relação

à condição controle (apenas tampões), como observado nas Tabelas 12, 13 e 14, a seguir. É amplamente aceito que a T_m seja utilizada como indicador da estabilidade conformacional de proteínas (HE et al., 2009). Sendo assim, a mudança na T_m foi usada para indicar se um excipiente em particular teria um efeito estabilizador (positivo), desestabilizador (negativo) ou indiferente na estabilidade térmica dos mAbs.

Tabela 12. Classificação de excipientes para o mAb de referência em tampão acetato pH 5,0 utilizandoespectroscopia de fluorescência. O desvio padrão foi calculado a partir de quatro replicatas analíticas. Os asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas (p < 0.05) em relação à condição controle com o tampão acetato ($T_m = 65.9 \pm 0.2$). Este ensaio foi realizado com 0.3 mg/mL de mAb.

	Excipientes	Categoria	T _m (°C)	Valor de p
2	sorbitol 10% (m/v)	osmólito/carboidrato	68,0 ± 0,5	0,0054*
	manitol 10% (m/v)	osmólito/carboidrato	67,7 ± 0,4	0,0056*
Efeito positivo	sacarose 10 % (m/v)	osmólito/carboidrato	67,3 ± 0,2	0,0008*
Efeito positivo Indiferente Efeito negativo	β-Alanina 100 mM	aminoácido	66,8 ± 0,1	0,0018*
	glicina 100 mM	aminoácido	66,6 ± 0,1	0,0101*
	L-serina 100 mM	aminoácido	66,4 ± 0,4	0,2294
	glicerol 10% (v/v)	osmólito/poliol	66,1 ± 0,0	0,245
Indiforanta	L-prolina 100 mM	aminoácido	65,9±0,4	0,9661
munerente	trealose 10% (m/v)	osmólito/carboidrato	65,7 ± 0,2	0,6112
	polisorbato 80 0,05% (v/v)	surfactante	65,6 ± 0,2	0,2478
u	ureia 100 mM	agente caotrópico	65,5 ± 0,1	0,085
	polisorbato 20 0,05% (v/v)	surfactante	65,4 ± 0,2	0,0831*
	EDTA 1 mM	agente quelante	65,3 ± 0,1	0,0277*
	PEG 200 1% (m/v)	polímero	$65,3 \pm 0,1$	0,0141*
	Poloxamer 188 0,05%	surfactante	65,3 ± 0,1	0,0214*
	etilenoglicol 1% (v/v)	poliol	65,3 ± 0,0	0,0079*
	acetato de amônio 150 mM	sal	65,2 ± 0,1	<0,0001*
	L-arginina 50 mM, L-glutamato 50 mM	aminoácido	65,1 ± 0,0	0,0022*
	Brij 35 0,05% (v/v)	surfactante	64,8 ± 0,1	0,0009*
	metionina 100 mM	aminoácido	64,7 ± 0,0	0,0003*
Efeito negativo	α-ciclodextrina 10% (m/v)	ciclodextrina	63,9 ± 0,2	0,0003*
	cloreto de césio 150 mM	sal	63,8 ± 0,1	0,0064*
	cloreto de sódio 150 mM	sal	63,8 ± 0,1	<0,0001*
	cloreto de potássio 150 mM	sal	63,4 ± 0,1	<0,0001*
	sulfato de amônio 150 mM	sal	63,3 ± 0,2	<0,0001*
	cloreto de amônio 150 mM	sal	63,3 ± 0,2	<0,0001*
	cloreto de lítio 150 mM	sal	63,2 ± 0,1	<0,0001*
	L-arginina 125 mM	aminoácido	63,0 ± 0,3	<0,0001*
	L-histidina 100 mM	aminoácido	60,1 ± 0,1	<0,0001*
	γ-ciclodextrina 10% (m/v)	ciclodextrina	52,5 ± 1,1	<0,0001*

Tabela 13. Classificação de excipientes para o mAb de referência em tampão citrato pH 6,0 utilizandoespectroscopia de fluorescência. O desvio padrão foi calculado a partir de quatro replicatas analíticas. Os asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas (p < 0,05) em relação à condição controle com o tampão citrato $(T_m = 65, 4 \pm 0, 2)$. Este ensaio foi realizado com 0,3 mg/mL de mAb.

	Excipientes	Categoria	T _m (°C)	Valor de p
	manitol 10% (m/v)	osmólito/carboidrato	66,7 ± 0,0	<0,0001*
	sorbitol 10% (m/v)	osmólito/carboidrato	66,5 ± 0,1	<0,0001*
	trealose 10% (m/v)	osmólito/carboidrato	66,4 ± 0,0	<0,0001*
Efeito	sacarose 10 % (m/v)	osmólito/carboidrato	66,3 ± 0,1	0,0002*
positivo	glicina 100 mM	aminoácido	66,3 ± 0,1	0,0001*
	β-Alanina 100 mM	aminoácido	65,9 ± 0,1	0,0019*
	L-serina 100 mM	aminoácido	65,9 ± 0,1	0,0029*
	L-prolina 100 mM	aminoácido	65,8 ± 0,3	0,0479*
	PEG 200 1% (m/v)	polímero	66,8 ± 2,4	0,2839
Efeito Efeito etilion egativo Efeito Efeito etilion e	L-arginina 50 mM, L-glutamato 50 mM	aminoácido	65,5 ± 0,1	0,2465
	γ-ciclodextrina 10% (m/v)	ciclodextrina	65,4 ± 0,2	0,8392
	cloreto de potássio 150 mM	sal	65,4 ± 0,1	0,7893
Indiferente	cloreto de amônio 150 mM	Categoria I_m (C)osmólito/carboidrato $66,7 \pm 0,0$ osmólito/carboidrato $66,5 \pm 0,1$ osmólito/carboidrato $66,3 \pm 0,1$ aminoácido $66,3 \pm 0,1$ aminoácido $65,9 \pm 0,1$ aminoácido $65,9 \pm 0,1$ aminoácido $65,9 \pm 0,1$ aminoácido $65,8 \pm 0,3$ polímero $66,8 \pm 2,4$ camato 50 mMaminoácidosal $65,4 \pm 0,2$ mMsalsal $65,3 \pm 0,1$ nMsalsal $65,1 \pm 0,2$ agente caotrópico $64,9 \pm 0,1$ nMsalsal $65,0 \pm 0,2$ surfactante $64,7 \pm 0,1$ /v)surfactanteosurfactante $64,7 \pm 0,1$ /v)surfactante64,5 \pm 0,0poliol $64,5 \pm 0,0$ sal $64,2 \pm 0,1$ agente quelante $64,3 \pm 0,3$ Asalagente quelante $64,2 \pm 0,1$	0,6299	
ExcipientesCamanitol 10% (m/v)ossorbitol 10% (m/v)ossorbitol 10% (m/v)ostrealose 10% (m/v)ospositivoglicina 100 mMglicina 100 mManL-serina 100 mManL-prolina 100 mManL-prolina 100 mManL-prolina 100 mManv-ciclodextrina 10% (m/v)pcL-arginina 50 mM, L-glutamato 50 mM anv-ciclodextrina 10% (m/v)ciccloreto de potássio 150 mMsametionina 100 mManα-ciclodextrina 10% (m/v)ciccloreto de amônio 150 mMsametionina 100 mManα-ciclodextrina 10% (m/v)cicacetato de amônio 150 mMsaBrij 35 0,05% (v/v)susulfato de amônio 150 mMsapolisorbato 20 0,05% (v/v)susulfato de amônio 150 mMsapolisorbato 80 0,05% (v/v)suglicerol 1% (v/v)pccloreto de lítio 150 mMsaPoloxamer 188 0,05% (v/v)suglicerol 10% (v/v)saL-histidina 100 mMan	aminoácido	65,3 ± 0,1	0,3269	
	α-ciclodextrina 10% (m/v)	ciclodextrina	65,2 ± 0,1	0,2232
	acetato de amônio 150 mM	sal	65,1 ± 0,2	0,0887
	ureia 100 mM	agente caotrópico	64,9 ± 0,1	0,0051
	cloreto de césio 150 mM	sal	65,0 ± 0,2	0,0301*
	Brij 35 0,05% (v/v)	surfactante	64,9 ± 0,1	0,0079*
	sulfato de amônio 150 mM	sal	64,7 ± 0,1	0,0007*
	polisorbato 20 0,05% (v/v)	surfactante	64,7 ± 0,1	0,0009*
	polisorbato 80 0,05% (v/v)	surfactante	64,7 ± 0,1	0,0009*
Ff - it -	L-arginina 125 mM	aminoácido	64,7 ± 0,0	0,0004*
Efeito	etilenoglicol 1% (v/v)	poliol	64,6 ± 0,1	0,0004*
negativo	cloreto de lítio 150 mM	sal	64,5 ± 0,0	0,0001*
	Poloxamer 188 0,05% (v/v)	surfactante	64,5 ± 0,0	<0,0001*
	glicerol 10% (v/v)	osmólito/poliol	64,4 ± 0,1	0,0001*
	EDTA 1 mM	agente quelante	64,3 ± 0,3	0,0005*
	cloreto de sódio 150 mM	sal	64,2 ± 0,1	<0,0001*
	L-histidina 100 mM	aminoácido	63,7 ± 0,1	<0,0001*

Tabela 14. Classificação de excipientes para o mAb biossimilar em tampão citrato pH 6,0 utilizando
espectroscopia de fluorescência. O desvio padrão foi calculado a partir de quatro replicatas analíticas. Os asteriscos
indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0.05$) em relação à condição controle com o tampão citrato
$(T_m = 64,7 \pm 0,1)$. Este ensaio foi realizado com 0,3 mg/mL de mAb.

	Excipientes	Categoria	T _m (°C)	Valor de p
	manitol 10% (m/v)	osmólito/carboidrato	67,1 ± 0,1	<0,0001*
	sorbitol 10% (m/v)	osmólito/carboidrato	67,0 ± 0,1	<0,0001*
	sacarose 10% (m/v)	osmólito/carboidrato	66,5 ± 0,5	0,0101*
Efeito	glicina 100 mM	aminoácido	65,6 ± 0,1	0,001*
positivo	L-serina 100 mM	aminoácido	65,5 ± 0,1	0,0012*
	L-prolina 100 mM	aminoácido	65,4 ± 0,2	0,0115*
	β-Alanina 100 mM	aminoácido	65,3 ± 0,1	0,0038*
	glicerol 10% (v/v)	osmólito/poliol	65,3 ± 0,1	0,0027*
	L-arginina 50 mM, L-glutamato 50 mM	aminoácido	65,1 ± 0,1	0,0826
	acetato de amônio 150 mM	sal	$65,1 \pm 0,1$	0,0915
	trealose 10% (m/v)	osmólito	$64,8 \pm 0,1$	0,4247
	cloreto de sódio 150 mM	sal	64,8 ± 0,0	0,4914
Indiferente	cloreto de césio 150 mM	sal	64,7 ± 0,0	0,4216
manerente	sulfato de amônio 150 mM	sal	64,6 ± 0,1	0,1964
	cloreto de potássio 150 mM	sal	64,6 ± 0,1	0,2219
	EDTA 1 mM	agente quelante	64,6 ± 0,0	0,1011
	Poloxamer 188 0,05% (v/v)	surfactante	64,5 ± 0,1	0,1057
	polisorbato 80 0,05% (v/v)	surfactante	64,5 ± 0,0	0,0543
	etilenoglicol 1% (v/v)	poliol	64,5 ± 0,0	0,0400*
	PEG 200 1% (m/v)	polímero	64,4 ± 0,1	0,0470*
	cloreto de amônio 150 mM	sal	64,4 ± 0,0	0,0140*
	cloreto de lítio 150 mM	sal	64,3 ± 0,1	0,0107*
	polisorbato 20 0,05% (v/v)	surfactante	64,3 ± 0,0	0,0035*
Efeito	metionina 100 mM	aminoácido	64,2 ± 0,1	0,0024*
negativo	Brij 35 0,05% (v/v)	surfactante	64,1 ± 0,1	0,0016*
	ureia 100 mM	agente caotrópico	64,0 ± 0,1	0,0009*
	α-ciclodextrina 10% (m/v)	ciclodextrina	63,1 ± 0,3	0,0008*
	L-histidina 100 mM	aminoácido	62,5 ± 0,3	0,0002*
	L-arginina 125 mM	aminoácido	62,4 ± 0,1	<0,0001*
	γ-ciclodextrina 10% (m/v)	ciclodextrina	53,4 ± 1,0	<0,0001*

O processo de desenovelamento térmico de uma proteína é normalmente endotérmico e, geralmente quanto maior a T_m , maior a resistência térmica da proteína. A T_m do mAb de referência (65,4 e 65,9 °C) nos dois tampões (citrato e acetato, respectivamente) mostrou-se ligeiramente maior que a do mAb biossimilar em tampão citrato (64,7 °C). Considerando ambos os mAbs em tampão citrato ou acetato, de forma geral os excipientes estabilizadores englobaram: (1) osmólitos/carboidratos (sorbitol, manitol, sacarose, trealose); e (2) aminoácidos (alanina, glicina,

serina, prolina). A adição destes excipientes acarretou um aumento de até 2 $^{\circ}$ C no valor da T_m em relação à condição controle (apenas tampão). O efeito de estabilização térmica de osmólitos/carboidratos e aminoácidos em mAbs também já foi descrito em outros trabalhos (WEI et al., 2018; GOLDBERG et al., 2017).

Dentre os excipientes desestabilizadores ou indiferentes para a estabilidade térmica dos mAbs estavam: (1) sais (cloreto de sódio, cloreto de potássio, cloreto de amônio, acetato de amônio, sulfato de amônio, cloreto de lítio, cloreto de césio); (2) surfactantes (polisorbato 20, polisorbato 80, Brij 35, Polaxamer 188); (3) outros aminoácidos (metionina, histidina, arginina, arginina/glutamato); (4) polióis (etilenoglicol); (5) polímeros (PEG 200); (6) agentes quelantes (EDTA); (7) agentes caotrópicos (ureia); e (8) clicodextrinas (α -ciclodextrina, γ -ciclodextrina). Além dos excipientes, o pH da formulação desempenha um papel crucial na estabilidade das proteínas, influenciando diferentes vias de degradação química, como isomerização, deamidação, fragmentação por hidrólise, bem como agregação devido a interações eletrostáticas (WANG et al., 2007). Sendo assim, as diferenças de T_m e de classificação de excipientes observadas para o mAb de referência em diferentes tampões eram esperadas. Com base nestes resultados concluiu-se que o desenvolvimento de formulações contento carboidratos e aminoácidos seria benéfico para a estabilização térmica dos mAbs. Os osmólitos são pequenas moléculas orgânicas acumuladas por células de diferentes organismos em resposta ao estresse ambiental. Carboidratos como a sacarose, trelaose e sorbitol são ósmolitos amplamente utilizados como estabilizadores de produtos biológicos. Estas moléculas auxiliam na manutenção do equilíbrio de formas nativas de proteínas, prevenindo a sua desnaturação, principalmente via hidratação preferencial em formulações líquidas (WLODARCZYK et al., 2018; KAMERZELL et al., 2011). Já os aminoácidos podem estabilizar as proteínas por diversos mecanismos incluindo hidratação preferencial, ligação direta, capacidade de tamponamento, ou propriedades antioxidantes. Os principais aminoácidos usados para estabilizar proteínas terapêuticas incluem histidina, arginina e glicina (ARAKAWA et al., 2007).

4.5.2. Estudo de estabilidade por degradação acelerada

Durante os estágios iniciais de desenvolvimento de formulações para produtos biológicos, a realização de estudos de estabilidade por degradação acelerada é muito comum, permitindo uma avaliação abrangente de diversos parâmetros como agentes tamponantes, faixas de pH, força iônica, excipientes e outros, na estabilidade das proteínas (CAPELLE et al., 2007). Estes estudos são geralmente realizados em condições não favoráveis, como em elevadas temperaturas e/ou pH extremo, para induzir uma rápida degradação da proteína de interesse. As informações obtidas nestes ensaios são extremamente importantes para caracterizar as principais vias de degradação físico-química dos produtos e auxiliar no desenvolvimento de formulações adequadas (NOWAK et al., 2017). Com o objetivo de avaliar condições de formulação diferentes daquelas empregadas no mAb de referência Repatha[®], um estudo comparativo de degradação acelerada utilizando 0,1 mg/mL de mAb a 40 °C por 2 meses foi realizado, de acordo com a Tabela 7, previamente apresentada da sessão 3.6.2. Neste estudo, 14 diferentes formulações foram comparadas em dois tampões distintos: (1) citrato 50 mM, pH 5,5 e (2) L-histidina 50 mM, pH 6,0, que são amplamente utilizados na formulação de mAbs (KANG et al., 2016). Considerando os efeitos benéficos dos osmólitos/açúcares e de alguns aminoácidos na estabilidade térmica dos mAbs, previamente confirmados pelo screening de excipientes, os seguintes excipientes estabilizadores foram selecionados para este estudo: sacarose, manitol, glicina e prolina. Os osmólitos, como a sacarose e o manitol, são amplamente utilizados em formulações liofilizadas de mAbs (~80%) e em aproximadamente 20% dos mAbs em formulações líquidas (KANG et al., 2016). Já a glicina, por exemplo, é usada em cerca de 20% das formulações de mAbs comerciais. Como aproximadamente 72% dos mAbs comerciais são formulados com o surfactante polisorbato 80, este também foi incluído no ensaio (KANG et al., 2016), apesar de ter mostrado efeito nulo ou negativo na etapa de screening de excipientes. Os surfactantes não-iônicos são comumente usados para inibir a agregação de proteínas devido ao estresse por agitação e para impedir sua adsorção em superfícies hidrofóbicas. O princípio da estabilização propiciada por surfactantes baseia-se principalmente em sua capacidade de competir com as regiões hidrofóbicas das proteínas pela interação com outras superfícies, como a interface ar-água, impedindo, assim, a desnaturação proteica (MOLLMANN et al., 2005). Por fim, o sal cloreto de sódio, usado em cerca de 50% das formulações comerciais de mAbs, também foi selecionado. Os sais podem aumentar a estabilidade das proteínas em solução através do aumento da tensão superficial e do potencial químico do sistema. Já foi reportado que o cloreto de sódio, por exemplo, inibe a auto associação de mAbs em altas concentrações e pode atuar como modulador de viscosidade (OHTAKE et al., 2011; KAMERZEL et al., 2009; KANG et al., 2016).

O acompanhamento da estabilidade dos mAbs foi realizado pelas técnicas de alto rendimento de espectroscopia de fluorescência intrínseca dos resíduos de triptofano e de SEC- HPLC. Na Figura 41, os valores da T_m para o mAb de referência e para o biossimilar foram similares entre si e, em geral, similares às condições controle 1 e 2 (65 - 67 °C), enquanto que para as condições 3 e 4 (contento os açúcares sacarose e manitol a 10% como excipientes) valores mais altos de T_m foram detectados (68 - 70 °C). Os açúcares são bastante conhecidos por conferir proteção contra a desnaturação térmica e por aumentar a T_m de diversas proteínas como: ovoalbumina, lisozima e mAbs (BACK et al., 1979; WEI et al., 2018). A magnitude do aumento da T_m depende da natureza da proteína, do tipo de açúcar usado e das condições físico-químicas do meio, como o pH (BACK et al., 1979).



Figura 41. Estudo comparativo de degradação acelerada em diferentes formulações por espectroscopia de fluorêscencia. Comparação das T_m obtidas a partir de curvas de desenovelamento térmico mostrando o efeito da temperatura na intensidade de fluorescência intrínseca de Trp dos mAbs em diferentes formulações ao longo do tempo. Os mAbs (a 0,1 mg/mL) foram mantidos a 40 °C por 2 meses. O desvio padrão foi calculado a partir de quatro replicatas analíticas.

A seleção de excipientes/formulações baseada na estabilidade coloidal dos mAbs (referente a desnaturação induzida por agregação) deve resultar em taxas de agregação mais baixas nas condições de armazenamento pretendidas para o produto acabado (BAYNES et al., 2004). Sendo assim, o acompanhamento da estabilidade coloidal dos mAbs foi feito através da quantificação da perda de monômeros ao longo do tempo usando SEC-HPLC, como observado na Figura 42. Esta abordagem é bastante utilizada para acompanhar a estabilidade coloidal de proteínas ao longo do tempo, permitindo também uma avaliação indireta da formação de agregados insolúveis (BARNARD et al., 2011; BOND et al., 2010; MANIKWAR et al., 2013).



Figura 42. Estudo comparativo de degradação acelerada em diferentes formulações por SEC-HPLC. Monitoramento da estabilidade coloidal dos mAbs através da diminuição da área dos picos de monômeros, normalizada pela área no tempo de incubação zero para: (A) o mAb de referência e (B) o mAb biossimilar. Os dados estão apresentados como média e desvio padrão de duplicas analíticas. Os mAbs (a 0,1 mg/mL) foram mantidos a 40 °C por 2 meses.

Como já comentado anteriormente, a agregação pode causar imunogenicidade e diminuição ou perda de eficácia do produto biológico, sendo um fator crítico para o desenvolvimento de produtos tanto inovadores como biossimilares (AMBROGELLY et al., 2018). No geral, o mAb de referência mostrou uma maior estabilidade coloidal nas diferentes formulações testadas. Este fato pode estar associado as diferenças de N-glicosilação previamente detectadas entre os mAbs, que afetam sua estabilidade coloidal. Ao longo de 2 meses de incubação a 40 °C, observou-se uma perda considerável de formas monoméricas para ambos os mAbs em algumas formulações, chegando até 15% para o mAb de referência e 30% para o mAb biossimilar. No trabalho de GOLDBERG et al. (2017), por exemplo, 12 diferentes mAbs (IgGs das subclasses 1, 2 e 4) a 50 mg/mL também foram mantidos a 40 °C durante 6 semanas em diferentes formulações. Entretanto, somente uma perda inferior a 3% de monômero foi observada para todas as condições. Apesar da maior estabilidade dos mAbs em comparação a outros biofármacos, como, por exemplo, fatores sanguíneos ou enzimas terapêuticas, fica nítida a importância dos excipientes na manutenção da estabilidade coloidal dos mAbs estudados. Dentre todas as condições testadas, a formulação 8 (sacarose 10% m/v, polisorbato 80 0,01% v/v em tampão citrato pH 5,5) permitiu a mais eficiente manutenção da estabilidade coloidal de ambos os mAbs, com uma perda de apenas 2% do conteúdo de monômeros em ambos.

É importante ressaltar que a estabilidade conformacional (enovelamento proteico) e coloidal (propensão à agregação) das proteínas pode ser afetada de forma independente por diferentes excipientes, por isso um balanço entre estes dois tipos de estabilidade deve ser alcançado para o desenvolvimento racional de formulações eficientes. A combinação de várias classes de excipientes em uma formulação pode combinar efeitos estabilizadores e desestabilizadores, afetando a estabilidade proteica de forma randômica. Por exemplo, surfactantes, ao se ligarem a regiões hidrofóbicas da proteína, podem induzir uma desnaturação parcial, resultando em uma menor estabilidade térmica, mas ao mesmo tempo podem evitar a formação de agregados ao longo do tempo (ALEKSEYCHYK et al., 2014; BAYNES et al., 2004). Já a presença de sais pode diminuir a propensão à agregação e a viscosidade em formulações com alta concentração de mAbs, tanto quanto diminuir a estabilidade conformacional, resultando em um decréscimo da T_m (GUO et al., 2012; AROSIO et al., 2012).

4.5.2. Estudo de degradação acelerada do produto Repatha® a altas concentrações

A administração subcutânea de pequenos volumes de soluções altamente concentradas de mAbs terapêuticos (> 100 mg/mL) tem se tornado bastante comum. A elevada concentração proteica dessas formulações pode afetar o seu comportamento biofísico, causando o aumento de viscosidade, opalescência, agregação/imunogenicidade e até mesmo a indução de separação de fases (WHITAKER et al., 2017; WANG, 2015). Apesar das diferenças de estabilidade de soluções proteicas muito concentradas, a maioria dos estudos de desenvolvimento de formulações, mesmo para produtos a serem administrados na forma concentrada, ainda se baseia em experimentos com a proteína terapêutica a baixas concentrações (< 1 mg/mL) em diferentes formulações. Isso pode levar a inferências equivocadas sobre os efeitos de diferentes excipientes e prejudicar a seleção de formulações adequadas do ponto de vista clínico e comercial (WEI et al., 2018). Por esta razão, visando caracterizar a estabilidade do evolocumabe sob condições, clinicamente relevantes, ou seja, a 140 mg/mL, um ensaio de degradação acelerada a 40 °C foi realizado por 4 meses, em quatro diferentes formulações (A: controle - formulação comercial do evolocumabe; B: formulação comercial acrescida de sacarose - acetato 50 mM, prolina 100 mM, polisorbato 80 0,05% v/v, sacarose 10% m/v, pH 5,0; C: citrato de sódio 50 mM, sacarose 10% m/v, polisorbato 80 0,05% v/v, pH 5,5; D: L-histidina 50 mM, sacarose 10% m/v, polisorbato 80 0,05% v/v, pH 6,0). Devido à grande quantidade de mAb requerida para este estudo, o mesmo foi feito apenas com o produto de referência, previamente ultrafiltrado para estar no tampão de estudo. A cada tempo (0, 1, 4, 8, 12 e 16 semanas) de incubação, um volume de 12 µL foi retirado de cada condição e as amostras foram diluídas a 1 mg/mL, em seus respectivos tampões, somente para fins analíticos.

Inicialmente, 5 µg das amostras de mAb em quatro formulações (A - D) foram analisadas por SDS-PAGE em condições redutoras e não redutoras (Figura 43). Ambos os mAbs apresentaram elevada pureza e estabilidade coloidal nos tempos 0, 1 semana e 4 semanas. Para as amostras reduzidas, as duas bandas típicas correspondentes às cadeias pesadas (~50 kDa) e leves (~25 kDa) dos mAbs foram observadas. Já para as amostras não reduzidas, três bandas principais (entre as bandas de 110 e 160 kDa do marcador de proteína) foram observadas, refletindo as diferentes isoformas de ligação dissulfeto apresentadas por moléculas de IgG2 (LIU E MAY, 2012; WYPYCH et al., 2008). Além disso, bandas mais sutis referentes a baixas concentrações de cadeias leve livres (~30 kDa) e a possíveis dímeros dos mAbs (~260 kDa) também foram detectadas, como já descrito pelo fabricante do produto de referência (EMA, 2015). Nenhuma diferença visual foi observada no perfil eletroforético das amostras nas diferentes formulações ao longo do tempo.



Figura 43. Análise de degradação acelerada do mAb de referência (Repatha[®], Amgen) em diferentes formulações a 140 mg/mL por SDS-PAGE. 1: padrão de massa molecular; 2 – 5: mAb de referência reduzido nas formulações A, B, C e D, respectivamente; 6 – 9: mAb de referência não reduzido nas formulações A, B, C e D, respectivamente; 0 – 9: mAb de referência não reduzido nas formulações A, B, C e D, respectivamente: 0 material de compositiva de compositiva

Após o período de 8 semanas de incubação a 40 °C, iniciou-se o processo de degradação do mAb, por agregação e fragmentação em todas as condições. Acredita-se que a agregação de proteínas se inicia a partir de sua desnaturação e exposição de regiões hidrofóbicas (CHENNAMSETTY et al., 2009). Este processo pode ser ocasionado por diversos fatores isolados ou combinados como: elevadas temperaturas, pH extremo, agitação, exposição a luz, processo de congelamento-descongelamento. Já a fragmentação não-enzimática de mAb em torno da região de dobradiça, nos limites domínio-domínio ou CDRs é bastante comum e geralmente, não é considerada crítica como a agregação (AMBROGELLY et al., 2018).

O acompanhamento da estabilidade conformacional dos mAbs foi realizado utilizando a espectroscopia de fluorescência intrínseca dos resíduos de triptofano e a DSC. Na Figura 44, podem-se observar curvas de desnaturação térmica representativas das quatro formulações testadas, as quais, se mostraram bastante similares entre si. Uma transição térmica principal foi observada em todas as formulações testadas, com valores de T_m muito similares à condição controle (formulação A - formulação comercial do evolocumabe), entre 67 - 69 °C. Não foi observada nenhuma mudança significativa no perfil das curvas ou no valor da T_m ao longo do tempo para as diferentes condições testadas, sugerindo a estabilidade dos mAbs nas formulações escolhidas. A Figura 45 mostra a sobreposição dos termogramas representativos de DSC dos mAbs em todas as formulações testadas. Duas transições endotérmicas principais foram identificadas, associadas a desnaturação dos domínios CH2 e Fab/CH3 dos mAb, conforme já relatado para moléculas de IgG2 (ITO E TSUMOTO, 2013). Os valores de T_m resultantes para todas as condições foram bastante similares com a T_m1 variando entre 69 - 70 °C e T_m2 ~79 °C. Neste caso, também não foi observada nenhuma mudança significativa no perfil dos termogramas ou nos valores de T_m ao longo do tempo para as diferentes com a X_m1 variando entre 69 - 70 °C e T_m2 ~79 °C.



В

	Formulação A		Formulação B		Formula	ição C	Formulação D	
Tempo (semanas)	T _m	Valor de p						
0	69,08 ± 0,50	NA	69,26 ± 0,32	0,5169	68,79 ± 0,28	0,2906	68,88 ± 0,09	0,4044
1	68,48 ± 0,53	NA	69,76 ± 1,31	0,0774	67,96 ± 0,20	0,0742	66,12 ± 2,22	0,0495
4	69,23 ± 0,45	NA	68,97 ± 0,33	0,3279	67,87 ± 0,55	0,0027*	67,90 ± 0,86	0,0155*
8	68,77 ± 0,38	NA	69,03 ± 0,41	0,3287	67,70 ± 0,76	0,0226*	67,44 ± 1,95	0,1728
12	68,57 ± 0,14	NA	68,70 ± 0,10	0,1296	68,04 ± 0,11	0,0002*	68,61 ± 1,34	0,9487
16	69,01 ± 0,10	NA	69,21 ± 0,14	0,0316*	67,34 ± 0,06	0,0001*	68,65 ± 0,77	0,3302

Figura 44. Análise de degradação acelerada do mAb de referência (Repatha®, Amgen) a 140 mg/mL em diferentes formulações por espectroscopia de fluorescência. (A) Curvas de desnaturamento térmico representativas mostrando o efeito de cada formulação na estabilidade conformacional dos mAbs (tempo 0). (B) T_m nas diferentes formulações para os diferentes tempos de incubação. Os dados estão apresentados como média e desvio padrão de cinco replicatas analíticas. Os asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas (p <0,05). Os mAbs foram mantidos a 40 °C por 16 semanas.


Figura 45. Análise de degradação acelerada do mAb de referência (Repatha®, Amgen) a 140 mg/mL em diferentes formulações por DSC. (A) Termogramas representativos mostrando o efeito de cada formulação na estabilidade conformacional dos mAbs (tempo 0). (B) T_m 1 nas diferentes formulações para os diferentes tempos de incubação. (C) T_m 2 nas diferentes formulações para os diferentes tempos de incubação. Os dados estão apresentados como média e desvio padrão de duplicas analíticas. Os asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas (p <0,05). Devido a problemas técnicos os dados referentes ao tempo de incubação de 8 semanas não foram apresentados. Os mAbs foram mantidos a 40 °C por 16 semanas.

Por fim, o acompanhamento da estabilidade coloidal dos mAbs também foi realizado utilizando SEC-HPLC, para quantificação da perda do conteúdo de monômeros ao longo do tempo (Figura 46). Pela primeira vez, foi possível detectar diferenças em relação aos efeitos estabilizadores das formulações escolhidas sobre o mAb de referência.



Figura 46. Análise de degradação acelerada do mAb de referência (Repatha®, Amgen) a 140 mg/mL em diferentes formulações por SEC-HPLC. Monitoramento da estabilidade coloidal dos mAbs através da diminuição da área dos picos de monômeros, normalizada pela área no tempo de incubação zero. Os dados estão apresentados como média e desvio padrão de duplicas analíticas. Os asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas (p <0,05). Devido a problemas técnicos os dados referentes ao tempo de incubação de 8 semanas não foram apresentados. Os mAbs foram mantidos a 40 °C por 16 semanas.

Na formulação A (comercial), a estabilidade coloidal do mAb de referência a 140 mg/mL manteve-se bastante preservada até 4 semanas, decaindo significativamente em 12 e 16 semanas, com perda de monômeros de até 49%. Já na formulação B, observou-se uma queda gradual do conteúdo de monômeros ao longo do tempo, atingindo ao final de 16 semanas uma perda global de 45%. Já para as formulações C e D, uma perda de monômeros de 19% e 21% foi observada, respectivamente, ao longo dos 4 meses de ensaio. Isso indica que os tampões citrato e L-histidina garantiram uma maior estabilidade coloidal do mAb de referência, podendo ser usados como alternativas ao acetato na formulação de um futuro mAb biossimilar.

5. CONCLUSÕES E SUGESTÕES

5.1. Conclusões

As conclusões obtidas a partir do presente trabalho são as seguintes:

• Todas as variantes de construção estudadas, transfectadas utilizando o plasmídeo pCI-neo circular ou linearizado, permitiram a expressão transiente do mAb anti-PCSK9 por células da linhagem CHO-K1, confirmando que a sequência primária do anticorpo de referência, os peptídeos sinal, os elementos IRES, e a organização das sequências das cadeias leve e pesada e dos marcadores de seleção foram selecionados adequadamente.

• Considerando as etapas subsequentes para geração de populações estáveis produtoras do evolocumabe biossimilar, observou-se que as estratégias de linearização, pré-transfecção dos vetores, assim como de co-transfecção com dois vetores (cada um contendo um gene marcador de seleção: Neo ou Hygro) seguida de seleção dupla com os antibióticos G418 e higromicina B, não resultaram na obtenção de populações estáveis expressando o mAb.

• A construção contendo o peptídeo sinal 1 e o gene da neomicina fosfotransferase (L1-LC-IRES_{EMCV}-H7-HC-IRESat-NEO), trasnfectada na forma circular, mostrou-se a mais promissora, gerando uma população estável com elevado crescimento celular e boa produção do anticorpo (~ 0,9 mg/L). O mAb purificado do sobrenadante desta cultura celular apresentou elevada pureza e afinidade pela proteína-alvo (PCSK9), sendo utilizado posteriormente para os ensaios de caracterização e formulação.

• As diversas técnicas de caracterização de proteínas adotadas neste trabalho (SDS-PAGE; *Western blot*; SEC-HPLC; mapeamento peptídico e análise de proteína intacta por espectrometria de massas; focalização isoelétrica; precipitação com PEG; HILIC-HPLC; espectroscopias de fluorescência, CD, Raman e FTIR; DSC; DLS; EPD; cinética de ligação à PCSK9 por BLI) geraram informações importantes sobre as características do biofármaco produzido e confirmaram a similaridade do mesmo com o seu produto de referência (Repatha[®], Amgen).

• Uma análise preliminar dos glicanos liberados do produto de referência e do mAb biossimilar indicaram que o glicano mais prevalente é coincidente em ambos os mAbs, porém que há variações em relação à distribuição de outras glicoformas. Contudo, as diferenças detectadas provavelmente são pouco significativas, pois: (i) não foram detectadas diferenças em termos de afinidade e perfil

cinético de ligação à PCSK9 entre os mAbs; (ii) o evolocumabe é uma IgG2 cujo alvo é solúvel e cuja função efetora não é relevante, estando reportado na monografia de aprovação do Repatha[®] pela EMA sua atividade biológica não é dependente da N-glicosilação.

 Através de ensaios comparativos preliminares de formulação, foi possível identificar potenciais excipientes estabilizadores (sacarose, glicina, prolina, polisorbato 80, citrato) que garantiram uma maior estabilidade conformacional e coloidal dos mAbs em estudos de degradação acelerada, indicando alternativas à formulação usada no produto de referência.

• Os resultados obtidos neste estudo fornecem subsídios importantes para a implementação de uma plataforma eficiente que pode ser utilizada para a produção e caracterização de diferentes anticorpos monoclonais em células da linhagem CHO. Desta forma, o presente trabalho contribui para o desenvolvimento de tecnologias nacionais para a obtenção de mAbs recombinantes, tanto inovadores quanto biossimilares.

5.2. Sugestões

Com base no presente trabalho, são feitas as seguintes sugestões para trabalhos futuros:

 Investigar outros vetores e estratégias para expressão, partindo do cassete de expressão utilizado neste trabalho, com o objetivo de obter níveis mais elevados de produção de mAbs em células CHO do que os alcançados no presente estudo. Sugere-se o emprego de abordagens como a integração sítio-dirigida e o uso de transposons.

• Realizar o isolamento e *screening* de clones, preferencialmente empregando técnicas como, citometria de fluxo acoplada a *sorter* (FACS) ou sistemas como o *ClonePix*®., que permitem a avaliação rápida de centenas de clones, para obtenção dos que apresentem produtividade específica significativamente mais elevada. O isolamento de clones poderia ser precedido de sucessivas rodadas de enriquecimento, por meio de FACS, das populações estáveis geradas, para que um excelente clone possa ser isolado e identificado mais facilmente.

• Produzir o anticorpo utilizando biorreatores instrumentados, possivelmente operados em modo perfusão, visando ao desenvolvimento de um processo de alta produtividade volumétrica e que forneça grandes quantidades de produto por lote, com elevada homogeneidade.

• Desenvolver um processo completo de purificação que complemente a etapa de cromatografia de afinidade com proteína A, utilizada no presente trabalho, com outras etapas

cromatográficas e não cromatográficas, que permitam eliminar contaminantes críticos associados ao produto (formas degradadas, agregados) ou associados ao processo (DNA e proteínas da célula hospedeira), assim como demonstrar capacidade de remoção viral, conforme requerido pelas agências regulatórias para produtos de uso humano. O processo completo de purificação, ou ao menos parte dele, poderia combinar etapas em um processo sequencial integrado como desenvolvido anteriormente no LECC/COPPE/UFRJ para o Fator VIII recombinante (HUGHSON et al., 2017).

• Disponibilizar uma quantidade maior de mAb biossimilar para realizar outros ensaios de caracterização *in vitro* e *in vivo* do mesmo, por meio de técnicas como: mapeamento peptídico para determinação de 100% da sequência primária de aminoácidos; caracterização a fundo da glicosilação e de outras modificações pós-tradução (como pontes dissulfeto e deamidação, dentre outras); ensaios em animais para verificação da atividade biológica *in vivo* e avaliação de aspectos relacionados à segurança do produto biossimilar.

• Disponibilizar uma quantidade maior de mAb biossimilar para realizar estudos de formulação e estabilidade à concentração clinicamente relevante de 140 mg/mL (concentração final do produto comercial).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A.K., LICHTMAN, A.H. PILLAI, S. Cellular & Molecular Immunology. 7. Ed, Filadélfia: Elsevier, 2012.

ABIFADEL, M. et al. Mutations in PCSK9 cause autosomal dominant hypercholesterolemia. Nature Genetics, v.34, p.154, 2003.

AGBOGBO, F. K. et al. Current perspectives on biosimilars. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, v. 46, p. 1297-1311, 2019.

AGUEDO-ARISA, J. M. Avaliação do padrão de glicosilação de um anticorpo monoclonal produzido por células CHO. Rio de Janeiro (RJ): Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2017.

AHMADI, S. et al. Monoclonal antibodies expression improvement in CHO cells by PiggyBac transposition regarding vectors ratios and design. PloS One, v. 12, p. e0179902, 2017.

AKBARZADEH-SHARBAF, S. et al. Expression enhancement in trastuzumab therapeutic monoclonal antibody production using genomic amplification with methotrexate. Avicenna Journal of Medical Biotechnology, v. 5, p. 87-95, 2013.

ALEKSEYCHYK, L.; SU, C.; BECKER, G. W.; TREUHEIT, M. J.; RAZINKOV, V. I. High-throughput screening and stability optimization of anti-streptavidin IgG1 and IgG2 formulations. Journal of Biomolecular Screening, v. 19, p. 1290-1301, 2014.

ALSENAIDY M.A. et al. Protein comparability assessments and potential applicability of high throughput biophysical methods and data visualization tools to compare physical stability profiles. Frontiers in Pharmacology, v. 5, p. 39, 2014a.

ALSENAIDY, M. A. et al. Physical stability comparisons of IgG1-Fc variants: effects of N-glycosylation site occupancy and Asp/Gln residues at site Asn 297. Journal of Pharmaceutical Sciences, v. 103, p. 1613-27, 2014b.

AMBROGELLY, A.; GOZO, S.; KATIYAR, A.; DELLATORE, S.; KUNE, Y. et al. Analytical comparability study of recombinant monoclonal antibody therapeutics. MAbs, v.10, p. 513-538, 2018.

ARAKAWA, T. et al. Suppression of protein interactions by arginine: a proposed mechanism of the arginine effects, Biophysical Chemistry, v. 127, p. 1-8, 2007.

ARORA, J. et al. Hydrogen exchange mass spectrometry reveals protein interfaces and distant dynamic coupling effects during the reversible self-association of an IgG1 monoclonal antibody. MAbs, v. 7, p. 525-539, 2015.

AROSIO, P. et al. On the role of salt type and concentration on the stability behavior of a monoclonal antibody solution. Biophysical Chemistry, v. 168–169, p. 19–27, 2012.

ARTELT, P. et al. The prokaryotic neomycin-resistance-encoding gene acts as a transcriptional silencer in eukaryotic cells. Gene, v. 99, p. 249-254, 1991.

ASSIS, R. M.; PINTO, V. Strengths and weaknesses of the Brazilian regulation on biosimilars: A critical view of the regulatory requirements for biosimilars in Brazil. Therapeutic Advances in Musculoskeletal Disease, v. 10, p. 253-259, 2018.

AUGUSTO, E. F. P.; BARRAL, M. F. Modelos de Crescimento e Formação de Produto no Cultivo de Células Animais. In: MORAES, A. M.; AUGUSTO, E. F. P.; CASTILHO, L. R. (eds), Tecnologia do Cultivo de Células Animais - de Biofármacos a Terapia Gênica, 1. ed, Capítulo 8, São Paulo: Roca, 2008.

BACK, J. F.; OAKENFULL, D.; SMITH, M. B. Increased thermal stability of proteins in the presence of sugars and polyols. Biochemistry, v. 18, p. 5191-5196, 1979.

BALASUBRAMANIAN, S et al. Comparison of three transposons for the generation of highly productive recombinant CHO cell pools and cell lines. Biotechnology and Bioengineering, v.113, p.1234-1243, 2016.

BALASUBRAMANIAN, S. et al. Transposon mediated co-integration and co-expression of transgenes in CHO-DG44 cells. BMC proceedings, v. 5, p. 38 (Sup8), 2011.

BANDARANAYAKE, A. D.; ALMO, S. C. Recent advances in mammalian protein production. FEBS Letters, v. 588, p. 253-260, 2014.

BARNARD, J. G.; SINGH, S.; RANDOLPH, T. W.; CARPENTER, J. F. Subvisible particle counting provides a sensitive method of detecting and quantifying aggregation of monoclonal antibody caused by freeze-thawing: Insights into the roles of particles in the protein aggregation pathway. Journal of Pharmaceutical Sciences, v. 100, p.492-503, 2011.

BAUMANN, M. et al. Preselection of recombinant gene integration sites enabling high transcription rates in CHO cells using alternate start codons and recombinase mediated cassette exchange, Biotechnology and Bioengineering, v. 114, p. 2616-2627, 2017.

BAYAT, H. et al. Evaluation of different vector design strategies for the expression of recombinant monoclonal antibody in CHO cells. Journal of Preparative Biochemistry & Biotechnology, v. 48, p. 160-164, 2018.

BAYNES, B. M.; Trout, B. L. Rational design of solution additives for the prevention of protein aggregation. Biophysical Journal, v. 87, p. 1631-1639, 2004.

BERKOWITZ, S. A. et al. Analytical tools for characterizing biopharmaceuticals and the implications for biosimilars. Nature Reviews Drug Discovery, v. 11, p. 527-540, 2012.

BEYER, B. et al. How similar is biosimilar? A comparison of infliximab therapeutics in regard to charge variant profile and antigen binding affinity. Biotechnology Journal, v. 1800340, p. 1-9, 2018.

BOND, M. D. et al. Evaluation of a dual-wavelength size exclusion HPLC method with improved sensitivity to detect protein aggregates and its use to better characterize degradation pathways of an IgG1 monoclonal antibody. Journal of Pharmaceutical Sciences, v. 99, p. 2582-2597, 2010.

BORMAN, A. et al. Comparison of picornaviral IRES-driven internal initiation of translation in cultured cells of different origins. Nucleic Acids Research, v. 25, p. 925, 1997.

BUTLER, M. Animal cell cultures: recent achievements and perspectives in the production of biopharmaceuticals. Applied Microbiology and Biotechnology, v. 68, p. 283-291, 2005.

BUTLER, M. Modificações pós-tradução em proteínas recombinantes. In: MORAES, A. M.; AUGUSTO, E. F. P.; CASTILHO, L. R. (eds), Tecnologia do Cultivo de Células Animais - de Biofármacos a Terapia Gênica, 1. ed, Capítulo 6, São Paulo: Roca, 2008.

CABRERA, G. et al. Influence of culture conditions on the N-glycosylation of a monoclonal antibody specific for recombinant hepatitis B surface antigen. Biotechnology and Applied Biochemistry, v. 41, p. 67-76, 2005.

CAPELLE, M. A. H.; GURNY, R.; ARVINTE, T. High throughput screening of protein formulation stability: practical considerations. European Journal of Pharmaceutical Sciences, v. 65, p. 131-148, 2007.

CARDIÔMETRO, 2019. Mortes por doenças cardiovasculares no Brasil. Sociedade Brasileira de Cardiologia. Disponível em: http://www.cardiometro.com.br/anteriores.asp/. Acessado em dezembro de 2019.

CARTON, J. M. et al. Codon engineering for improved antibody expression in mammalian cells. Protein Expression and Purification, v. 55, p.279-286, 2007.

CARVALHO, R. J.; CASTILHO, L. R. Tools enabling continuous and integrated upstream and downstream processes in the manufacturing of biologicals. In: Ganapathy Subramanian. (Org.). Continuous Biomanufacturing: Innovative Technologies and Methods. 1ed.Weinheim: by Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA., 2017.

CARVER, J. P.; RICHARDS, R. E. A general two-site solution for the chemical exchange produced dependence of T2 upon the carr-Purcell pulse separation. Journal of Magnetic Resonance (1969), v. 6, n. 1, p. 89–105, 1972.

CASTILHO, L. R. Biopharmaceutical products: an introduction. In: THOMAZ-SOCCOL, V., PANDEY, A., RESENDE, R. R. (eds). Current Developments in Biotechnology and Bioengineering Human and Animal Health Applications. Amsterdam: Elsevier, 2017.

CASTILHO, L. R.; ANSPACH, F. B.; DECKWER, W. An integrated process for mammalian cell perfusion cultivation and product purification using a dynamic filter. Biotechnology Progress, v.18, p. 4-8, 2002.

CASTILHO, L. R.; MEDRONHO, R. Cell retention devices for suspended-cell perfusion cultures. Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology, v. 74, p. 129-170, 2002.

CHAI, Y. et al. Human rhinovirus internal ribosome entry site element enhances transgene expression in transfected CHO-S cells. Scientific Reports, v. 8, p. 6661, 2018.

CHALLENER, C. A., 2015. Excipient selection for protein stabilization. Pharmaceutical Technology, v. 2015, p. s35–s39. Disponível em: http://www.pharmtech.com/excipient-selection-protein-stabilization. Acessado em dezembro de 2019.

CHEN, L. et al. Highly efficient selection of the stable clones expressing antibody-IL-2 fusion protein by a dicistronic expression vector containing a mutant neo gene. Journal of Immunological Methods, v. 295, p. 49-56, 2004).

CHENG, W et al. Comparison of high-throughput biophysical methods to identify stabilizing excipients for a model IgG2 monoclonal antibody: conformational stability and kinetic aggregation measurements. Journal of Pharmaceutical Sciences, v. 101, p. 1701–20, 2012.

CHENNAMSETTY, N.; VOYNOV, V.; KAYSER, V.; HELK, B.; TROUT, B. L. Design of therapeutic proteins with enhanced stability. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 106, p. 11937-42, 2009.

CHICO, E; RODRÍGUEZ, G.; FIGUEREDO, A. Biorreatores para células animais. In: MORAES, A. M.; AUGUSTO, E. F. P.; CASTILHO, L. R. (eds), Tecnologia do Cultivo de Células Animais - de Biofármacos a Terapia Gênica, 1. ed, Capítulo 9, São Paulo: Roca, 2008.

CHO, I. H. et al. Evaluation of the structural, physicochemical, and biological characteristics of SB4, a biosimilar of etanercept. MAbs, v. 208, p. 1136-55, 2016.

CHOW, S.; SONG, F.; BAI, H. Analytical similarity assessment in biosimilar studies. American Association of Pharmaceutical Scientists Journal, v. 18, p. 670–7, 2016.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. Fundamentos de cromatografia. Campinas: Unicamp, p. 456, 2006.

COST, G. J. et al. BAK and BAX deletion using zinc-finger nucleases yields apoptosis-resistant CHO cells. Biotechnology Journal, v.105, p. 330–340, 2010.

DE LEOZ et al. NIST interlaboratory study on glycosylation analysis of monoclonal antibodies: comparison of results from diverse analytical methods. Molecular & cellular proteomics, v. 19, p. 11-30, 2020.

DINH, N. N.; WINN, B. C.; ARTHUR, K. K.; GABRIELSON, J. P. Quantitative spectral comparison by weighted spectral difference for protein higher order structure confirmation. Analytical Biochemistry, v. 464, p. 60-2, 2014.

EAS - EUROPEAN ATHEROSCLEROSIS SOCIETY, 2014. New EAS consensus panel statement on homozygous FH. Disponível em: http://www.eas-society.org/02-2014---consensus-on-homozygous-fh.aspx.. Acessado em dezembro de 2019.

ECHEVARRIA-LIMA, J. et al. Protein profile of blood monocytes is altered in htlv-1 infected patients: implications for ham/tsp disease. Scientific reports, v. 8, p. 14354, 2018.

EGEA, P. F.; STROUD, R. M.; WALTER, P. Targeting proteins to membranes: structure of the signal recognition particle. Current Opinion in Structural Biology, v. 15, p. 213-220, 2005.

EMA, 2007. Scientific discussion – Panitumumab. Disponível em: < https://www.ema.europa.eu/en/ documents/scientific-discussion/vectibix-epar-scientific-discussion_en.pdf>. Acessado em dezembro de 2019.

EMA, 2010. Committee for medicinal products for human use (CHMP) - Assessment report Prolia. Disponível em: https://www.ema.europa.eu/en/documents/assessment-report/prolia-epar-public-assessment-report_en.pdf>. Acessado em dezembro de 2019.

EMA, 2015. Committee for medicinal products for human use (CHMP) - Assessment report Repatha. Disponível em: https://www.ema.europa.eu/en/documents/assessment-report/repatha-epar-public-assessment-report_en.pdf. Acessado em dezembro de 2019.

EMA, 2019. Committee for medicinal products for human use (CHMP) - Assessment report Ajovy. Disponível em: https://www.ema.europa.eu/en/documents/assessment-report/ajovy-epar-public-assessment-report_en.pdf>. Accessado em dezembro de 2019.

FALA, L. Repatha (Evolocumab): Second PCSK9 inhibitor approved by the FDA for patients with familial hypercholesterolemia. American Health & Drug Benefits, v. 9, p. 136-9, 2016.

FAN, L. et al. Improving the efficiency of CHO cell line generation using glutamine synthetase gene knockout cells. Biotechnology and Bioengineering, v.109, p. 1007–1015., 2012.

FANG, J et al. Advanced assessment of the physicochemical characteristics of Remicade® and Inflectra® by sensitive LC/MS techniques. MAbs, v.8, p. 1021-34, 2016.

FARHAT, F. et al. The concept of biosimilars: from characterization to evolution – a narrative review. The Oncologist, v. 22, p. 1-7, 2017.

FARNIER, M. PCSK9: from discovery to therapeutic applications. Archives of Cardiovascular Disease, v. 107, p. 58-66, 2014.

FDA, 2015a. FDA Briefing Document - Endocrinologic and Metabolic Drugs Advisory Committee (EMDAC). Disponível em: http://www.natap.org/2017/HIV/20150610_EMDAC_01_FDA_Backgrounder.pdf/>. Acessado em dezembro de 2019.

FDA, 2015b. US Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration. Guidance for industry - scientific considerations in demonstrating biosimilarity to a reference product. Disponível em: < https://www.fda.gov/media/82647/download>. Acessado em dezembro de 2019.

FERREIRA, C. E. S.; FONSECA, F. A. H.; MANGUEIRA, C. L. P. A PCSK9 e sua relevância clínica com os novos alvos terapêuticos contra a dislipidemia. Einstein (São Paulo), v. 10, p. 526-527, 2012.

FH FOUNDATION, 2015. Homozygous familial hypercholesterolemia. Disponível em: https://thefhfoundation.org/familial-hypercholesterolemia/homozygous-familial-hypercholesterolemia. Acessado em dezembro de 2019.

FISCHER, S. et al. miRNA engineering of CHO cells facilitates production of difficult-to-express proteins and increases success in cell line development. Biotechnology and Bioengineering, v. 114, p. 1495–1510, 2017.

GAMMELL, P. et al. Initial identification of low temperature and culture stage induction of miRNA expression in suspension CHO-K1 cells. Biotechnology Journal. 130(3), 213–218, 2007.

GAUGHAN, C.L. The present state of the art in expression, production and characterization of monoclonal antibodies. Molecular Diversity, p. 1-16, 2015.

GE HEALTHCARE (2004b) Ion Exchange Chromatography & Chromatofocusing Principles and Methods. Disponível em: https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Sigma-Aldrich/General_Information/1/ge-ion-exchange-chromatography.pdf>. Accessado em dezembro de 2019.

GE HEALTHCARE HANDBOOK (2004a) Affinity Chromatography Principles and Methods. Disponível em:<https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/promo_NOT_INDEXED/General_In formation/1/ge-affinity-chromatography.pdf>. Acessado em dezembro de 2019.

GESKE, B. J.; WRIGHT, R. S.; KOPECKY, S. L., 2015. PCSK9 Inhibitors: how they work and who should get them. Medscape News. Disponível em: < https://www.medscape.com/viewarticle/854762>. Acessado em dezembro de 2019.

GIORGETTI, J. et al. Monoclonal antibody N-glycosylation profiling using capillary electrophoresis – mass spectrometry: assessment and method validation. Talanta, v. 178, p. 530-537, 2018.

GOETZE, A. M. et al. High-mannose glycans on the Fc region of therapeutic IgG antibodies increase serum clearance in humans. Glycobiology, v. 21, p. 949-959, 2011.

GOLDBERG, D. S. et al. Utility of high throughput screening techniques to predict stability of monoclonal antibody formulations during early stage development. Journal of Pharmaceutical Sciences, v. 106, p. 1971-1977, 2017.

GONZALEZ, R.; ANDREWS, B. A.; ASENJO, J. A. Kinetic model of BiP and PDI mediated protein folding and assembly. Journal of Theoretical Biology, v. 214, p. 529-537, 2002.

GRAILLE, M. et al. Crystal structure of a Staphylococcus aureus protein A domain complexed with the Fab fragment of a human IgM antibody: structural basis for recognition of B-cell receptors and superantigen activity. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 97, p. 5399-5404, 2000.

GREENFIELD, N. J. Using circular dichroism collected as a function of temperature to determine the thermodynamics of protein unfolding and binding interactions. Nature protocols, v. 1, p. 2527-2535, 2006.

GUIOCHONA, G.; BEAVERB L. A. Separation science is the key to successful biopharmaceuticals. Journal of Chromatography A, v. 1218, p. 8836-8858, 2011.

GUO, Z. et al. Structure-activity relationship for hydrophobic salts as viscosity-lowering excipients for concentrated solutions of monoclonal antibodies. Pharmaceutical Research, v. 29, p. 3102-3109, 2012.

HAGE, D. S. et al. Pharmaceutical and biomedical applications of affinity chromatography: recent trends and developments. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, v. 69, p. 93-105, 2012.

HAGEL, L., JAGSCHIES, G., SOFER, G. Handbook of Process Chromatography: Development, Manufacturing, Validation and Economics, 2. ed, ReinoUnido: Academic Press, 2008.

HAHN, R. Methods for characterization of biochromatography media. Journal of Separation Science, v. 35, p. 3001–32, 2012.

HANKE, A. T.; OTTENS, M. Purifying biopharmaceuticals: knowledge based chromatographic process development. Trends in Biotechnology, v. 32, p. 210–220, 2014.

HARRAGHY, N. et al. Identification of a potent MAR element from the mouse genome and assessment of its activity in stable and transient transfections. Biotechnology Journal, v. 154, p. 11-20, 2011.

HARYADI, R. et al. Optimization of heavy chain and light chain signal peptides for high level expression of therapeutic antibodies in CHO cells. PLoS One, v. 10, p. 116-878, 2015.

HE, F. et al. High throughput thermostability screening of monoclonal antibody formulations. Journal of Pharmaceutical Sciences, v. 9, p. 1707–1720, 2009.

HELLEN, C. U.; SARNOW, P. Internal ribosome entry sites in eukaryotic mRNA molecules. Genes & Development, v. 15, p.1593–1612, 2001.

HENNECKE, M. et al. Composition and arrangement of genes define the strength of IRES-driven translation in bicistronic mRNAs. Nucleic Acids Research, v. 29, p. 3327, 2001.

HICKEY, J. M. et al. Analytical comparability assessments of 5 recombinant CRM 197 proteins from different manufacturers and expression systems Journal of Pharmaceutical Sciences, v. 107, p. 1806-19, 2018.

HIGEL, F.; SEID, A.; SÖRGEL, F.; FRIESS, W. N-glycosylation heterogeneity and the influence on structure, function and pharmacokinetics of monoclonal antibodies and Fc fusion proteins. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, v. 100, p. 94-100, 2016.

HO, S. C. L. et al. Comparison of internal ribosome entry site (IRES) and Furin-2A (F2A) for monoclonal antibody expression level and quality in CHO cells. PloS one, v. 8, p. e63247, 2013a.

HO, S. C. L. et al. Control of IgG LC:HC ratio in stably transfected CHO cells and study of the impact on expression, aggregation, glycosylation and conformational stability. Journal of Biotechnology, v.165, p.157-166, 2013b.

HO, S. C. L. et al. IRES-mediated tricistronic vectors for enhancing generation of high monoclonal antibody expressing CHO cell lines. Journal of Biotechnology, v. 157, p. 130-139, 2012.

HONG, J. et al. Physicochemical and biological characterization of SB2, a biosimilar of Remicade® (infliximab). MAbs. v. 9, p. 364-382, 2016.

HORTON, J. D.; COHEN, J. C.; HOBBS, H. H. Molecular biology of PCSK9: its role in LDL metabolism. Trends in Biochemical Sciences, v. 32, p. 71-77, 2007.

HOSSLER, P.; KHATTAK, S. F.; LI, Z. J. Optimal and consistent protein glycosylation in mammalian cell culture. Glycobiology, v. 19, p. 936-49, 2009.

HUGHSON, M.; CRUZ, T.; CARVALHO, R.; CASTILHO, L. Development of a 3-step straight-through purification strategy combining membrane adsorbers and resins. Biotechnology Progress, v.33, p. 931–40, 2017.

HUNT, B.; GODDARD, C.; MIDDELBERG A. P.; O'NEIL, B. K. Economical analysis of immunoadsorption systems. Biochemical Engineering Journal, v. 9, p. 135-145, 2001.

HUNTER, M., YUAN, P., VAVILALA, D.; FOX, M. Optimization of protein expression in mammalian cells. Current Protocols in Protein Science, v. 95, p. 77, 2019.

ICH, 1999. Specifications: Test Procedures and Acceptance Critreia for Biotechnological/Biological Products Q6B. Disponível em: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500002824.pdf>. Accessado em dezembro de 2019.

IMGT, 2019. The international ImMunoGeneTics information system. Evolocumab. Disponível em: http://www.imgt.org/3Dstructure-DB/cgi/details.cgi?pdbcode=9643.. Acessado em dezembro de 2019.

INNISS, M. C. et al. A novel Bxb1 integrase RMCE system for high fidelity site-specific integration of mAb expression cassette in CHO Cells. Biotechnology and Bioengineering, v. 114, p.1837-1846, 2017.

ISHII-WATABE, A.; KUWABARA, T. Biosimilarity assessment of biosimilar therapeutic monoclonal antibodies. Drug Metabolism and Pharmacokinetics, v. 34, p. 64-70, 2019.

ITO T, TSUMOTO K. Effects of subclass change on the structural stability of chimeric, humanized, and human antibodies under thermal stress. Protein Science, v. 22, p. 1542-1551, 2013.

JEFFERIS, R. Glycosylation as a strategy to improve antibody-based therapeutics. Nature Reviews Drug discovery, v. 8, p. 226-34, 2009.

JIANG, Z.; HUANG, Y.; SHARFSTEIN, S. T. Regulation of recombinant monoclonal antibody production in Chinese hamster ovary cells: a comparative study of gene copy number, mRNA level, and protein expression. Biotechnology Progress, v. 22, p. 313–318, 2016.

JOHNSON, C. M. Differential scanning calorimetry as a tool for protein folding and stability. Archives of Biochemistry and Biophysics, v. 531, p. 100-109, 2013.

JONES, A. N-Glycan Analysis of Biotherapeutic Proteins. BioPharm International, v. 30, p. 20–25, 2017. Disponível em: https://www.biopharminternational.com/n-glycan-analysis-biotherapeutic-proteins. Acessado em dezembro de 2019.

JORGENSEN, L. et al. Recent trends in stabilizing peptides and proteins in pharmaceutical formulation – considerations in the choice of excipients. Expert Opinion on Drug Delivery, v. 6, p. 1219-30, 2009.

JOSHI, V.; SHIVACH, T.; YADAV, N.; RATHORE, A. S. Circular dichroism spectroscopy as a tool for monitoring aggregation in monoclonal antibody therapeutics. Analytical Chemistry, v. 86, p.11606–13, 2014.

KÁLMÁN-SZEKERES, Z.; OLAJOS, M.; GANZLER, K. Analytical aspects of biosimilarity issues of protein drugs. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, v. 69, p. 185-195, 2012.

KALWY, S.; RANCE, J.; YOUNG R. Toward more efficient protein expression. Molecular Biotechnology, v. 34, p. 151-156, 2006.

KAMERZELL, T. J.; ESFANDIARY, R.; JOSHI, S. B.; MIDDAUGH, C. R.; VOLKIN, D. B. Proteinexcipient interactions: mechanisms and biophysical characterization applied to protein formulation development. Advanced Drug Delivery Reviews, v. 63, p. 1118–1159, 2011.

KANG, J.; LIN, X.; PENERA, J, 2016. Rapid formulation development for monoclonal antibodies. Bioprocess International. Disponível em: https://bioprocessintl.com/manufacturing/ formulation/rapid-formulation-development-for-monoclonal-antibodies/>. Acessado em dezembro de 2019.

KIM, J. H. et al. Improved data visualization techniques for analyzing macromolecule structural changes. Protein Science, v. 21, p. 1540-1553, 2012.

KIRCHHOFF, C. F. et al. Biosimilars: key regulatory considerations and similarity assessment tools. Biotechnology and Bioengineering, v.114, p.2696-2705, 2017.

KÖHLER, G.; MILSTEIN, C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature, v. 256, p. 495–497, 1975.

KUNERT, R.; REINHART, D. Advances in recombinant antibody manufacturing. Applied Microbiology and Biotechnology, v. 100, p. 3451-3461, 2016.

LAI, T.; YUANSHENG, Y.; NG, S. Advances in Mammalian Cell Line Development Technologies for Recombinant Protein Production. Pharmaceuticals, v. 6, p. 579-603, 2013.

LAKOWICZ, J. R. Principles of fluorescence spectroscopy. New York, Plenum Press, pg. 698, 1983.

LAMBERT, G. et al. The PCSK9 decade. The Journal of Lipid Research, v. 53, p. 2515-2524, 2012.

LEE, C. et al. Glycosylation profile and biological activity of Remicade® compared with Flixabi® and Remsima®. MAbs, v. 9, p. 968-977, 2017.

LEE, K. H. et al. Analytical similarity assessment of rituximab biosimilar CT-P10 to reference medicinal product. MAbs. v.10, p. 380-396, 2018.

LEE, N. et al. Evaluation of similar quality attribute characteristics in SB5 and reference product of adalimumab. MAbs. v. 11, p. 129-44, 2019.

LI, J. et al. A comparative study of different vector designs for the mammalian expression of recombinant IgG antibodies. Journal of Immunological Methods, v. 318, p. 113-124, 2007.

LIMA, T. M. Avaliação técnico-econômica da produção de um anticorpo monoclonal biossimilar ao Evolocumabe no Brasil. Trabalho de Conclusão de Curso em Engenharia de Bioprocessos; Escola de Química, UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, 2016.

LIN, X. L. et al. Role of PCSK9 in lipid metabolism and atherosclerosis. Biomedicine & Pharmacotherapy, v. 104, p. 36-44, 2018.

LIU, H. F.; MA, J.; WINTER, C.; BAYER, R. Recovery and purification process development for monoclonal antibody production. MAbs, v. 2, p. 480-499, 2010.

LIU, H.; MAY, K. Disulfide bond structures of IgG molecules: structural variations, chemical modifications and possible impacts to stability and biological function. MAbs, v. 4, p. 17-23, 2012.

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, p. 1866–1884, 2015.

LOO, T.; PATCHETT, M. L.; NORRIS, G. E.; LOTT, J. S. Using Secretion to Solve a Solubility Problem: High-Yield Expression in Escherichia coli and Purification of the Bacterial Glycoamidase PNGase F. Protein Expression and Purification, v. 98, p. 90–8, 2002.

LÓPEZ-MEZA, J. et al. Using simple models to describe the kinetics of growth, glucose consumption, and monoclonal antibody formation in naive and infliximab producer CHO cells. Cytotechnology, v. 68, p. 1287-1300, 2016.

LUO, Q. et al. Chemical modifications in therapeutic protein aggregates generated under different stress conditions. Journal of Biological Chemistry, v. 286, p. 25134-44, 2011.

MCLENACHAN, S.; SARSERO, J. P.; IOANNOU, P. A. Flow-cytometric analysis of mouse embryonic stem cell lipofection using small and large DNA constructs. Genomics, v. 89, p. 708-720, 2007.

MADDUX, N. R. et al. Multidimensional methods for the formulation of biopharmaceuticals and vaccines. Journal of Pharmaceutical Sciences, v. 100, p. 4171-4197, 2011.

MANIKWAR, P. et al. Correlating excipient effects on conformational and storage stability of an IgG1 monoclonal antibody with local dynamics as measured by hydrogen/deuterium-exchange mass spectrometry. Journal of Pharmaceutical Sciences, v. 102, p. 2136-2151, 2013.

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

MATASCI, M. et al. Recombinant therapeutic protein production in cultivated mammalian cells: current status and future prospects. Drug Discovery Today Technology, v. 5, p. e37–42, 2008.

MATASCI, M. et al. The PiggyBac transposon enhances the frequency of CHO stable cell line generation and yields recombinant lines with superior productivity and stability. Biotechnology Journal, v. 108, p. 2141-2150, 2011.

MCNERNEY, T. et al. PDADMAC flocculation of Chinese hamster ovary cells: enabling a centrifuge-less harvest process for monoclonal antibodies. MAbs, v. 7, p. 413-428, 2015.

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.

MELLADO, M. C. M.; CASTILHO, L. R. Proteínas Recombinantes Terapêuticas. In: MORAES, A. M.; AUGUSTO, E. F. P.; CASTILHO, L. R. (eds), Tecnologia do Cultivo de Células Animais - de Biofármacos a Terapia Gênica, 1. ed, Capítulo 16, São Paulo: Roca, 2008.

MICSONAI, A. et al. Accurate secondary structure prediction and fold recognition for circular dichroism spectroscopy. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 3095, p. 103, 2015.

MIDDAUGH, C. R., HAIRE, N. Determination of the Apparent Protein Solutions* Thermodynamic Activities. Journal of Biological Chemistry, v. 254, p. 367-70, 1979.

MOLLMANN, S. H. et al. Displacement of adsorbed insulin by Tween 80 monitored using total internal reflection fluorescence and ellipsometry, Pharmaceutical Research, v. 22, p. 1931-1941, 2005.

MORDOR INTELLIGENCE, 2018. Biopharmaceuticals market - growth, trends, and forecast (2019 - 2024). Disponível em: < https://www.mordorintelligence.com/industry-reports/global-biopharmaceuticals-market-industry>. Acessado em dezembro de 2019.

MORE A. S. et al. Correlating the impact of well-defined oligosaccharide structures on physical stability profiles of IgG1-Fc glycoforms. Journal of Pharmaceutical Sciences, v. 105, p. 588-601, 2016.

MULLICK, A. et al. The cumate gene-switch: a system for regulated expression in mammalian cells. BMC Biotechnology, v. 6, p. 43, 2006.

MURPHY, K., TRAVERS, P., WALPORT, M. Imunobiologia de Janeway. 7. ed, Porto Alegre: Artmed, 2010.

NAGAI, K. et al. Structure, function and evolution of the signal recognition particle. The EMBO Journal, v. 22, p. 3479-3485, 2003.

NBN BRASIL, 2017. Fábricas e novas tecnologias podem ajudar a reduzir importação de biofármacos. Disponível em: https://nbnbrasil.com.br/fabricas-e-novas-tecnologias-podem-ajudar-a-reduzirimportacao-de-biofarmacos/. >Acessado em dezembro de 2019.

NEHLSEN, K. et al. Recombinant protein expression by targeting pre-selected chromosomal loci. BMC Biotechnology, v. 9, p. 100, 2009.

NEMA, S., 2011. Key Formulation Challenges of protein (mAb) drug. Pfizer. Disponível em: http://users.unimi.it/gazzalab/wordpress/wp-content/uploads/2011/12/9-Key-formulation-challenges-of-protein-drugs.pdf. Accessado em dezembro de 2019.

NEVILLE, J. J. et al. Ubiquitous Chromatin-opening Elements (UCOEs): Applications in biomanufacturing and gene therapy. Biotechnology Advances, v. 35, p. 557-564, 2017.

NOH, S. M.; SHIN, S.; LEE, G. M. Comprehensive characterization of glutamine synthetase-mediated selection for the establishment of recombinant CHO cells producing monoclonal antibodies. Scientific Reports, v. 8, p. 5361, 2018.

NORDESTGAARD, B. G. et al. Familial hypercholesterolaemia is underdiagnosed and undertreated in the general population: guidance for clinicians to prevent coronary heart disease: Consensus Statement of the European Atherosclerosis Society. European Heart Journal, v. 34, p. 3478-90, 2013.

NOWAK, C. et al. Forced degradation of recombinant monoclonal antibodies: A practical guide. MAbs. v. 9, p. 1217-30, 2017.

NUPUR, N.; CHHABRA, N.; DASH, R.; RATHORE, A. S. Assessment of structural and functional similarity of biosimilar products: Rituximab as a case study. MAbs, v.10, p. 143-158, 2018.

OHTAKE, S.; KITA, Y.; ARAKAWA, T. Interactions of formulation excipients with proteins in solution and in the dried state. Advanced Drug Delivery Reviews, v. 63, p.1053-1073, 2011.

PMDA, 2015. Pharmaceuticals and Medical Devices Agency. Report on the Deliberation Result – Repatha. Disponível em: https://www.pmda.go.jp/files/000217925.pdf>. Accessado em dezembro de 2019.

POULAIN, A. et al. Rapid protein production from stable CHO cell pools using plasmid vector and the cumate gene-switch. Journal of Biotechnology, v. 255, p. 16-27, 2017.

PUCK, T.T., CIECIURA, S.J., ROBINSON, A. Genetics of somatic mammalian cells. III. Long-term cultivation of euploid cells from human and animal subjects. Journal of Experimental Medicine, v. 108, pp. 945-956, 1958.

QIAO, J. H. et al. Novel tag-andexchange (RMCE) strategies generate master cell clones with predictable and stable transgene expression properties. Journal of Molecular Biology, v. 390, p. 579-594, 2009).

QUILICI, L. S. et al. A minimal cytomegalovirus intron A variant can improve transgene expression in different mammalian cell lines. Biotechnology Letters, v. 35, p. 21-27, 2012.

RAAB, N. et al. CRISPR/Cas9-mediated knockout of microRNA-744 improves antibody titer of CHO production cell lines. Biotechnology Journal, v. 14, p. 1800477, 2019.

RAHIMPOUR, A. et al. Stable expression of anti-cd52 monoclonal antibody using a bicistronic vector system. Biology and Medicine (Aligarh), v. 8, p. 341, 2016.

RATHORE, N.; RAJAN, R. S. Current Perspectives on Stability of Protein Drug Products during Formulation, Fill and Finish Operations. Biotechnology Progress, v. 24, p. 504-514, 2008.

RATHORE, S. A. Follow-on protein products: scientific issues, developments and challenges. Trends in Biotechnology, v. 27, p.698-705, 2009.

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

RITA COSTA, A., ELISA RODRIGUES, M., HENRIQUES, M., AZEREDO, J., OLIVEIRA, R., 2010. Guidelines to cell engineering for monoclonal antibody production. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, v. 74, p. 127-138.

ROCHA-PISAÑA, M. R. et al. Evaluation of changes in promoters, use of UCOES and chain order to improve the antibody production in CHO cells. Protein Expression and Purification, v.132, p.108-115, 2017.

SABATINE, M. S. et al. Efficacy and safety of evolocumab in reducing lipids and cardiovascular events. The New England Journal of Medicine, v. 372, p.1500, 2015.

SANTOS, R. et al. I Diretriz Brasileira de Hipercolesterolemia Familiar (HF). Arquivos brasileiros de cardiologia, v. 99, p. 1–28, 2012.

SCHROEDER, H. W.; CAVACINI, L. Structure and function of immunoglobulins. Journal of Allergy and Clinical Immunology, v. 125, p. S41-S52, 2010.

SHUKLA, A. A. et al. Downstream processing of monoclonal antibodies-Application of platform approaches. Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences, v. 848, p. 28-39, 2007.

STOCK, J. EAS Consensus Panel statement on homozygous FH. Atherosclerosis, v. 242, p. 323-326, 2015.

STUCHBURY, G., MÜNCH, G. Optimizing the generation of stable neuronal cell lines via pre-transfection restriction enzyme digestion of plasmid DNA. Cytotechnology, v. 62, p. 189-194, 2010.

TAMASHIRO, W.M., AUGUSTO, E.F.P. Monoclonal antibodies. In: CASTILHO, L.R., MORAES, A.M., AUGUSTO, E.F.P. e BUTLER, M. Animal Cell Technology: From Biopharmaceuticals to Gene Therapy, 1. ed., Capítulo 17. New York: Taylor&Francis, 2008.

THE ANTIBODY SOCIETY, 2019. Therapeutic monoclonal antibodies approved or in review in the European Union or United States. Disponível em: https://www.antibodysociety.org/resources/approved-antibodies/>. Accessado em dezembro de 2019.

THERMOFISHER, 2019. Immunoglobulin Structure and Classes. Disponível em: https://www.thermofisher.com/br/en/home/life-science/antibodies/antibodies-learning-center/antibodies-resource-library/antibody-methods/immunoglobulin-structure-classes.html>. Acessado em dezembro de 2019.

TOPRANI, V. M. et al. A micro e polyethylene glycol precipitation assay as a relative solubility screening tool for monoclonal antibody design and formulation development. Journal of Pharmaceutical Sciences, v. 105; p. 2319-27, 2016.

VELAYUDHAN J et al. Demonstration of functional similarity of proposed biosimilar ABP 501 to adalimumab. BioDrugs, v. 30, p. 339-51, 2016.

VIDARSSON, G.; DEKKERS, G.; RISPENS, T. IgG subclasses and allotypes: from structure to effector functions. Frontiers in Immunology, v. 5, p. 520, 2014.

VISSER, J. et al. Physicochemical and functional comparability between the proposed biosimilar rituximab GP2013 and originator rituximab. BioDrugs, v. 27, p. 495-507, 2013.

VORONINA, E. V. et al. Design of a stable cell line producing a recombinant monoclonal anti-TNF α antibody based on a CHO cell line. SpringerPlus, v. 5, p.1584, 2016.

WADA, R.; MATSUI, M.; KAWASAKI, N. Influence of N-glycosylation on effector functions and thermal stability of glycoengineered IgG1 monoclonal antibody with homogeneous glycoforms. MAbs, v. 11, p. 350–372, 2019.

WALSH, G. Biopharmaceutical benchmarks 2018. Nature Biotechnology, v. 36, p. 1136–45, 2018.

WALSH, G. Biopharmaceuticals and biotechnology medicines: an issue of nomenclature. European Journal of Pharmaceutical Sciences, v. 15, p. 135-138, 2002.

WALTHER, J. et al. The business impact of an integrated continuous biomanufacturing platform for recombinant protein production. Biotechnology Journal, v. 213, p. 3–12, 2015.

WANG, W. Advanced protein formulations. Protein science, v. 24, p. 1031-1039, 2015.

WANG, W. et al. Antibody structure, instability, and formulation. Journal of pharmaceutical sciences, v. 96, p. 1-26, 2007.

WARIKOO, V. et al. Integrated continuous production of recombinant therapeutic proteins. Biotechnology and Bioengineering, v. 109, p.3018-3029, 2012.

WEI, Y.; LARSON, N. R.; ANGALAKURTHI, S. K.; MIDDAUGH, C. R. Improved fluorescence methods for high-throughput protein formulation screening. SLAS Technology, v. 23, p. 516–528, 2018.

WEN, Z. Q. Raman Spectroscopy of Protein Pharmaceuticals. Journal of Pharmaceutical Sciences, v. 96, p. 2861-2878, 2007.

WHITAKER, N. et al. A formulation development approach to identify and select stable ultra-highconcentration monoclonal antibody formulations with reduced viscosities. Journal of Pharmaceutical Sciences, v. 106, p. 3230 – 3241, 2017.

WHO, 2013. WHO Drug Information - International Conference of Drug Regulatory Authorities. Disponível em: http://apps.who.int/medicinedocs/documents/s21014en/s21014en.pdf. Acessado em dezembro de 2019.

WHO, 2015. World Health Organization. The top 10 causes of death. Disponível em: http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/>. Acessado em dezembro de 2019.

WHO, 2016. Expert committee on biological standardization. Guidelines on evaluation of monoclonal antibodies as similar biotherapeutic products (SBPs). Disponível em: https://www.who.int/biologicals/expert_committee/expert_committee/mAb_SBP_GL-ECBS_review_adoption-2016.10.26-11.7post_ECBS-Clean_Version.pdf.> Acessado em dezembro de 2019.

WIRTH, M. Isolation of recombinant cell clones exhibiting high-level expression of the introduced gene. In Hauser H, Wager R (eds) Mammalian cell biotechnology in protein production. Walter de Gruyter, Berlin, pp 128, 1997.

WLODARCZYK, S. R. et al. Influence and effect of osmolytes in biopharmaceutical formulations. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, v. 131, p. 92-98, 2018.

WUHRER, M. et al. Glycosylation profiling of immunoglobulin G (IgG) subclasses from human serum. Proteomics, v. 7, p. 4070-4081, 2007.

WURM, F. Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells. Nature Biotechnology, v. 22, p. 1393-8, 2004.

WYPYCH, J. et al. Human IgG2 antibodies display disulfide-mediated structural isoforms. Journal of Biological Chemistry, v. 283, p. 16194-16205, 2008.

XU, X. et al. The genomic sequence of the Chinese hamster ovary (CHO)-K1 cell line. Nature Biotechnology, v. 29, p. 735–741, 2011.

XU, Y. et al. Physicochemical and functional assessments demonstrating analytical similarity between rituximab biosimilar HLX01 and the MabThera®. MAbs, v. 11, p. 606-620, 2019.

YAMANE-OHNUKI, N. et al. Establishment of FUT8 knockout Chinese hamster ovary cells: an ideal host cell line for producing completely defucosylated antibodies with enhanced antibody-dependent cellular cytotoxicity. Biotechnology Journal, v. 87, p. 614–622, 2004.

YANG, D. et al. Comparison of biosensor platforms in the evaluation of high affinity antibody-antigen binding kinetics. Analytical Biochemistry, v. 508, p. 78–96, 2016.

YANG, Y. et al. Efficient development of a stable cell pool for antibody production using a single plasmid. Journal of Biochemistry, v. 163, p. 391-398, 2018.

YEO, J. H. M. et al. Optimized selection marker and CHO host cell combinations for generating high monoclonal antibody producing cell lines. Biotechnology Journal, v. 12, p. 1700175, 2017.

YOUNG, J. A.; GABRIELSON, J. P. Higher order structure methods for similarity assessment. In: Gutka HJ, Yang H, Kakar S, editors. Biosimilars Regulatory, Clinical, and Biopharmaceutical Development. AAPS Advan. Springer; 2018. p. 321–36.

YUSUF, S. et al. Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): case-control study. The Lancet, v. 364, p. 937-952, 2004.

ZAGARI, F. et al. Lactate metabolism shift in CHO cell culture: the role of mitochondrial oxidative activity. New Biotechnology, v. 30, p. 238-245, 2013.

ZHANG, L.; LUO, S.; ZHANG, B. Glycan analysis of therapeutic glycoproteins. MAbs, v. 8, p. 205-15, 2016.

ZHANG, X.; WEN, Y.; YANG, S.T. Modes of Culture/Animal Cells. Comprehensive Biotechnology, p. 285-302, 2011.

ZHAO, C. et al. Matrix attachment region combinations increase transgene expression in transfected Chinese hamster ovary cells. Scientific Reports, v. 7, p. 42805, 2017.

ZHOU, Y. et al. Enhancing full-length antibody production by signal peptide engineering. Microbial cell factories, v. 15, p. 47, 2016.