

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **045369**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.11.21

(21) Номер заявки
202290636

(22) Дата подачи заявки
2020.02.19

(51) Int. Cl. **A61K 38/18** (2006.01)
C07K 1/00 (2006.01)
C07K 14/505 (2006.01)
A61P 25/00 (2006.01)
A61P 43/00 (2006.01)

(54) **РЕКОМБИНАНТНЫЙ ГИПОСИАЛИЛИРОВАННЫЙ ЭРИТРОПОЭТИН ЧЕЛОВЕКА, ЕГО СПОСОБЫ ПОЛУЧЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ ПРИ РАССТРОЙСТВАХ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ**

(31) **2019-0077**

(32) **2019.09.05**

(33) **CU**

(43) **2022.07.18**

(86) **PCT/CU2020/050001**

(87) **WO 2021/043345 2021.03.11**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ЦЕНТРО ДЕ ИНМУНОЛОГИЯ
МОЛЕКУЛАР (CU)**

(72) Изобретатель:
**Родригес Обая Тересита Де Хесус,
Амаро Гонсалес Даниэль Энрике,
Гарсия Арталехо Джуди Аймед, Соса
Тесте Илиана Мария, Сармиенто
Конде Янара, Эрнандес Де Ла Роса
Лурдес, Диас Гойре Дайли (CU),
Гименез Лопез Эстела (ES)**

(74) Представитель:
Рыбина Н.А. (RU)

(56) **WO-A1-2005063808
EP-A1-1997483**

IVONNE PEDROSO ET AL.: "Protective Activity of Erythropoietin in the Cognition of Patients with Parkinson's Disease", BEHAVIORAL

SCIENCES, vol. 8, no. 5, 1 de enero de 2018 (2018-01-01), página 51, XP55745166, ISSN: 2076-328X, DOI: 10.3390/bs8050051, todo el documento

LEIST M. ET AL.: "DERIVATIVES OF ERYTHROPOIETIN THAT ARE TISSUE PROTECTIVE BUT NOT ERYTHROPOIETIC", SCIENCE, AMERICAN ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF SCIENCE, US, vol. 305, no. 5681, 9 de Julio de 2004 (2004-07-09), paginas 239-243, XP002346906, ISSN: 0036-8075, DOI: 10.1126/SCIENCE.1098313, todo el documento

JULIO CESAR GARCIA-RODRIGUEZ ET AL.: "The Nasal Route as a Potential Pathway for Delivery of Erythropoietin in the Treatment of Acute Ischemic Stroke in Humans", THE SCIENTIFIC WORLD JOURNAL, vol. 9, 1 de enero de 2009 (2009-01-01), paginas 970-981, XP55745091, ISSN: 2356-6140, DOI: 10.1100/tsw.2009.103, todo el documento

CHUN-TING YUEN ET AL.: "Relationships between the N-glycan structures and biological activities of recombinant human erythropoietins produced using different culture conditions and purification procedures", BRITISH JOURNAL OF HAEMATOLOGY, vol. 121, no. 3, 1 May 2003 (2003-05-01), paginas 511-526, XP55024713, ISSN: 0007-1048, DOI: 10.1046/j.1365-2141.2003.04307.x, todo el documento

WO-A2-2004003176

(57) Изобретение относится к областям биотехнологии и медицины и описывает фармацевтическую композицию, содержащую в качестве активного ингредиента рекомбинантный эритропоэтин человека (rhEPO), профиль изоэлектрической точки которого составляет от 4,25 до 5,85, где микрогетерогенность фукозилированных N-гликанов образована би-, три- и тетраантенарными структурами, которые имеют моно- и бисалилированные остатки сиаловой кислоты в диапазоне 40-60% всех гликанов, трисалилированные в диапазоне 40-43% всех гликанов и тетрасалилированные в диапазоне 10-13% всех гликанов, и фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество. Этот шаблон гликозилирования придает свойства указанной композиции, что обеспечивает ее применение при расстройствах нервной системы. Способ получения rhEPO также описан в настоящем документе.

B1**045369****045369****B1**

Область техники

Настоящее изобретение относится к областям биотехнологии и медицины, в частности к получению фармацевтической композиции рекомбинантного эритропоэтина человека с паттерном гликозилирования, который придает ему свойства, которые позволяют использовать его при расстройствах нервной системы.

Уровень техники

Эритропоэтин (ЕРО) представляет собой гликопротеиновый гормон, образованный 166 аминокислотами, который имеет молекулярную массу 30,4 кДа (Lanfranco, F. and Strasburger, C. J. (2016) *Sports Endocrinology* 47: 115-27). ЕРО естественным образом продуцируется в перисинусоидальных клетках печени у эмбриона и в перинатальный период, а во взрослом возрасте главным образом в интерстициальных фибробластах почек. Этот гормон стимулирует продуцирование эритроцитов в костном мозге и играет важную роль в реакции мозга на повреждение нейронов (Siren L. et al. (2001) *Proc Natl Acad Sci USA* 98 (7): 4044-9). ЕРО представляет собой сильно гликозилированную молекулу, и ее углеводная часть составляет 40% ее молекулярной массы. Этот белок содержит четыре сложных цепочки олигосахаридов, связанных с полипептидной цепочкой, три из них соединениями N-типа и одна соединением O-типа, расположение которых было хорошо описано разными авторами Elliott, S. et al. (2004) *The Journal of Biological Chemistry*, 279(16): 16854-16862; Watson et al. (1994) *Glycobiology* 4(2): 227-237. Олигосахариды с соединением N-типа могут содержать разное число терминальных остатков сиаловой кислоты и являются важными для секреции, молекулярной стабильности, рецепторного связывания и активности *in vivo* (Egrie, J. and Browne, J. (2001) *Br. J. Cancer*, 84(1): 3-10; Goldwasser et al. (1974) *J. Biol. Chem* 249: 4202-4206).

С девяностых годов последнего столетия и до настоящего времени было накоплено большое число доказательств нейрозащитных свойств рекомбинантного ЕРО человека (rhЕРО). В 1998 г. Sakanara и коллеги в модели глобальной ишемии у песчанок показали, что после окклюзии общей сонной артерии подача rhЕРО через боковые желудочки приводила к снижению ишемического повреждения гиппокампальных нейронов в области CA1 (Sakanara, M. et al. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95: 4635-4640).

Цитопротекторное действие ЕРО на центральную нервную систему было показано Maiese и коллегами в 2004 г. и позднее Viviani и коллегами в 2005 г. (Maiese, K. et al. (2004) *Trends in Pharmacological Sciences* 25 (11): 577-83; Viviani, D. et al. (2005) *Journal of Neurochemistry* 93 (2): 257-268). Несмотря на всю информацию, накопленную в неклинических исследованиях касательно гематopoэтического ЕРО, достигнутые результаты не были воспроизведены в клинической среде из-за осложнений, связанных с его длительным использованием, которые возникают у пациентов.

У взрослых экспрессия рецептора ЕРО в нервной системе главным образом обнаруживается в нейронах, астроцитах и микроглии, тогда как астроциты продуцируют ЕРО, это гипосиалилированный ЕРО (Nagai, A. et al. (2001) *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 60 (4): 317-319).

Значительное число исследователей предпринимали попытку модификации rhЕРО для получения лекарственного средства, которое имеет такие же нейропротективные свойства, но без осложнений, вызываемых гематopoэтическим действием. ЕРО, называемый AsialoЕРО (US 2004/0122216), который получают посредством общего ферментативного десалилирования rhЕРО, имеет желаемые свойства, указанные выше, этот вид ЕРО имеет высокую аффинность к рецептору rhЕРО, но ограниченное протективное действие из-за очень короткого срока полужизни в плазме. Другой пример модификации эритропоэтина состоит в превращении лизина в гомоцитруллин путем карбамилирования белка, которое дает карбамилированный ЕРО, называемый СЕРО (Leist, M., Ghezzi, P., Grasso, G., et al. (2004) 305 (5681): 239-242). Хотя оба ЕРО не показали гематopoэтического действия, в клинических испытаниях, проводимых с СЕРО, даже если не наблюдалось никаких неблагоприятных эффектов, нейропротективная эффективность не была показана.

Патентная заявка WO 2007/009404 заявляет различные назальные составы ЕРО с низким содержанием сиаловой кислоты, позднее названные NeuroЕРО в публикации ее авторов (Garcia, JC and Sosa, I. (2009), *The Scientific World Journal*, 9: 970-981). Этот rhЕРО получается путем процесса ферментации полый волоконной мембраны и ионообменной хроматографии при очистке для отделения наиболее кислых изоформ (тех, которые имеют большее содержание сиаловой кислоты относительно тех, у которых меньшее содержание сиаловой кислоты). Указанный NeuroЕРО имеет профиль из 13 изоформ, из которых он делит 9 с гематopoэтическим rhЕРО, называемым ЕРОСІМ®.

Впервые авторы настоящего изобретения описали процесс получения в баке-смесителе (ST), объединенном со стадией очистки, проводимой посредством хроматографии, используя монолитную колонку в качестве анионообменника с четвертичным аммонийным лигандом Q, способным повышать экспрессию гипосиалилированных изоформ rhЕРО без дополнительных химических и генетических модификаций. Эти изоформы имеют профиль изоэлектрической точки в диапазоне рН от 4,25 до 5,85 и третичную структуру, связанную с гликозилированием, отличным от такового в NeuroЕРО, что дает им большую эффективность в механизмах нейрозащиты и нейровосстановления как *in vitro*, так и *in vivo*.

Краткое описание изобретения

В одном варианте осуществления объектом настоящего изобретения является фармацевтическая

композиция, содержащая в качестве действующего средства hEPO с профилем изоформ, изоэлектрическая точка которых находится в диапазоне от 4,25 до 5,85. Указанный hEPO имеет микрогетерогенность фукозилированных N-гликанов, образованных би-, три- и тетраантенарными структурами, которые имеют моно- и бисиаилированные остатки сиаловой кислоты, которые составляют 40-60% всех гликанов, трисиаилированные остатки, которые составляют 40-43%, и тетрасиаилированные остатки, которые представляют 10-13%, а также фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество.

В частности, сайт O-гликозилирования в серине 126 имеет 3 сиалоформы, которые имеют 0-2 остатка сиаловой кислоты, причем моносиалилированная структура является наиболее распространенной и составляет 78-82% всех гликанов, тогда как асиалилированные структуры составляют 6-10% всех гликанов. Сайт N-гликозилирования аспарагина 83 содержит

фукозилированные биантенарные структуры с 1 и 2 остатками сиаловой кислоты, где указанные структуры составляют 8-12% всех гликанов,

фукозилированные триантенарные структуры с 1, 2 и 3 остатками сиаловой кислоты, где эти структуры составляют 17-21% всех гликанов,

фукозилированные тетраантенарные структуры, которые имеют 1-4 остатка сиаловой кислоты, где эти структуры составляют 27-31% всех гликанов, и

фукозилированные тетраантенарные структуры с N-ацетиллактозамином 1 и 2 типа, которые имеют 1-4 остатка сиаловой кислоты, эти структуры составляют 38-42% всех гликанов.

Фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества для фармацевтической композиции, заявленной в настоящем изобретении, включают, помимо прочего, биоадгезивные полимеры, такие как гидроксипропилметилцеллюлоза, и стабилизаторы белка, такие как L-триптофан, L-лейцин, гидрохлорид L-аргинина и гидрохлорид L-гистидина.

Вышеописанная структура изоформ hEPO, которые являются частью фармацевтических композиций объекта настоящего изобретения, придает им большую эффективность в механизмах нейрозащиты и нейровосстановления как *in vitro*, так и *in vivo*.

В другом варианте осуществления объект настоящего изобретения представляет собой способ получения немодифицированного hEPO, где процесс ферментации происходит в ST в режиме перфузии в диапазоне температуры $34 \pm 2^\circ\text{C}$, с безбелковой культуральной средой и с диапазоном pH от 7,2 до 7,3, эта среда дополняется глутамином до получения конечной концентрации глутамина в диапазоне 8-12 ммоль/л. Этот способ также включает процесс очистки, который имеет хроматографический этап, на котором монолитную колонку используют как анионообменник с четвертичным аммонийным лигандом Q, причем равновесный буфер является раствором 20 ммоль/л трис в 10 ммоль/л HCl, pH которого находится в диапазоне от 7,9 до 8,10, с диапазоном проводимости 1,35-1,65 мСм/см, и который использует 50 ммоль/л буфер для элюирования на основе ацетата натрия с pH от 4,3 до 4,5 и проводимостью от 2 до 3,5 мСм/см. При помощи способа, описанного в настоящей заявке, можно получить фармацевтическую композицию с увеличенным количеством изоформ с низким содержанием сиаловой кислоты, которые имеют третичную структуру, связанную с гликозилированием, отличным от такового для NeugoEPO, что придает им большую эффективность в механизмах нейрозащиты и нейровосстановления как *in vitro*, так и *in vivo*.

Также объектом настоящего изобретения является применение фармацевтической композиции, описанной в настоящем документе, для лечения деменции, инсульта, болезни Паркинсона, атаксии, черепно-мозговой травмы, глаукомы, аутизма, гипоксии новорожденных, рассеянного склероза, бокового амиотрофического склероза и неврологического повреждения, вызываемого травмой, отравлением или облучением. В частности, описан способ лечения этой фармацевтической композицией субъекта, нуждающегося в этом, где введение указанной композиции проводят от одного до трех раз в неделю периодами от 6 до 12 месяцев в диапазоне введения от 0,1 до 4 мг в объеме 1 мл.

Подробное описание изобретения

Фармацевтические композиции

Объект настоящего изобретения hEPO отличается тем, что он имеет профиль изоэлектрической точки от 4,25 до 5,85 и вторичную и третичную структуру белка, не связанную с гликозилированием подобно hEPO, сохраняя такую же третичную структуру, связанную с гликозилированием с сайтом O-гликозилирования в серине 126 и тремя сайтами N-гликозилирования в аспарагине 24, 38 и 83. Углеводный состав hEPO, описанного в настоящем документе, отличает его от других hEPO. Микрогетерогенность фукозилированных N-гликанов состоит из би-, три- и тетраантенарных структур, которые имеют моно- и бисиаилированные остатки сиаловой кислоты в диапазоне 40-60% всех углеводов, предпочтительно в диапазоне 43-50%, трисиаилированные остатки в диапазоне 40-43% и тетрасиаилированные остатки в диапазоне 10-13% всех углеводов. В частности, сайт O-гликозилирования в серине 126 имеет 3 сиалоформы, которые имеют от 0 до 2 остатков сиаловой кислоты, моносиалилированная структура является наиболее распространенной и составляет 78-82% всех гликанов, а асиалилированные структуры составляют 6-10% всех гликанов.

Сайт N-гликозилирования аспарагина 83 содержит

фукозилированные биантенарные структуры с 1 и 2 остатками сиаловой кислоты, где указанные

структуры составляют 8-12% всех гликанов,

фукозилированные триантенарные структуры с 1, 2 и 3 остатками сиаловой кислоты, где эти структуры составляют 17-21% всех гликанов,

фукозилированные тетраантенарные структуры, которые имеют 1-4 остатка сиаловой кислоты, где эти структуры составляют 27-31% всех гликанов, и

фукозилированные тетраантенарные структуры с N-ацетиллактозамином 1 и 2 типа, которые имеют 1-4 остатка сиаловой кислоты, где эти структуры находятся в диапазоне 38-42% относительно всех гликанов.

Термины гипосиалилированный ghEPO, EPO, HS или основные изоформы используются взаимозаменяемо в настоящем изобретении для ссылки на фармацевтические композиции с характеристиками, описанными выше, также в общем называемые NeuroEPO plus.

Фармацевтические композиции объекта настоящего изобретения имеют в качестве активного ингредиента гипосиалилированные изоформы ghEPO. Эти гипосиалилированные изоформы получают путем процесса, описанного в настоящем документе, который не предполагает химической и/или генетической модификации ghEPO для получения указанных изоформ. Изоформы ghEPO, которые являются частью действующего вещества указанных фармацевтических композиций, имеют третичную структуру, связанную с гликозилированием, отличным от такового для NeuroEPO, что придает им большую эффективность в механизмах нейрозащиты и нейровосстановления как *in vitro*, так и *in vivo*. Фармацевтические композиции объекта настоящего изобретения вводят путем назального или офтальмологического путей введения, и они находятся в форме водных растворов, готовые лекарственные формы которых представляют назальные капли, назальные спреи или глазные капли. Указанные фармацевтические составы содержат гипосиалилированный ghEPO в качестве активного ингредиента и необязательно фармацевтически подходящие вспомогательные вещества и/или стабилизаторы.

Фармацевтически подходящие вспомогательные вещества и/или стабилизаторы являются нетоксичными для субъектов, которые их принимают, в используемых дозах и концентрациях и могут содержать биоадгезивные полимеры, такие как гидроксиметилцеллюлоза, гидроксипропилцеллюлоза и метилцеллюлоза; стабилизаторы белков, такие как L-триптофан, L-лейцин, гидрохлорид L-аргинина и/или гидрохлорид L-гистидина и его соли.

Терапевтическое применение и способы лечения

Настоящее изобретение обеспечивает фармацевтические композиции, пригодные для лечения расстройств нервной системы, таких как: цереброваскулярные, психиатрические и нейродегенеративные заболевания. В частности, указанные заболевания могут представлять собой: деменцию, инсульт, болезнь Паркинсона, атаксию, черепно-мозговую травму, глаукому, аутизм, гипоксию новорожденных, рассеянный склероз, боковой амиотрофический склероз и неврологическое повреждение, вызываемое травмой, отравлением или облучением. Настоящее изобретение также обеспечивает способ, включающий введение гипосиалилированного ghEPO субъекту, нуждающемуся в таком лечении, один-три раза в неделю периодами в 6-12 месяцев. Указанное введение будет проводиться интраназально (и/н), медленно, путем инстилляций лекарственного средства в слизистую. Доза введения находится в диапазоне 0,1-4 мг, предпочтительно 0,5-1 мг. Максимальный объем введения на дозу составляет 1; 0,5 мл на ноздрю для общей суточной дозы 3 мл. Указанный объем можно распределять на меньшие объемы с интервалами по времени 5-15 мин между каждым введением, предпочтительно каждые 15 мин.

Способ получения гипосиалилированных изоформ ghEPO

Способ, заявленный в настоящем изобретении, состоит из различных этапов и использует клеточные линии, описанные ниже.

Клеточные линии

Клеточные линии, которые можно использовать для выполнения способа объекта настоящего изобретения, являются такими же, как указано для получения ghEPO.

Среди линий наиболее используемыми являются: CHO, COS, ВНК, Namalwa, HeLa, Нер3В, НерG2, предпочтительно для настоящего изобретения используется линия CHO.

Процесс ферментации

Процесс ферментации настоящего изобретения проводят, используя технологию ST. Этот процесс состоит из нескольких этапов, первый содержит размораживание ампулы из рабочего банка клеток до достижения комнатной температуры (18-24°C).

Затем проводят этап размножения, на котором клетки масштабируют до концентрации клеток и жизнеспособности клеток, которая обеспечивает надлежащее инокулирование инокулятора с целью увеличения биомассы.

Как только достигалась плотность клеток $\geq 1 \times 10^6$ клеток/мл, ферментацию начинали с различными режимами работы. Эти режимы могут быть периодическим культивированием, непрерывным культивированием с удержанием биомассы или без него.

Для получения гипосиалилированных изоформ на этом этапе ферментации следует обеспечивать температуру в диапазоне $34 \pm 2^\circ\text{C}$ и pH в диапазоне $6,8 \pm 0,4$.

Клетки должны расти в безбелковой культуральной среде до получения конечной концентрации глутамин в диапазоне 8-12 ммоль/л.

Процесс очистки

Процесс очистки гипосилилированного rhEPO включает следующие хроматографические этапы.

Во-первых, проводят псевдоаффинную хроматографию в окрашенном лиганде.

Целью этого этапа является захват rhEPO и частичное удаление основных загрязняющих веществ, присутствующих в супернатанте (SN). Затем гельфильтрационную хроматографию проводят для замены буфера белка на буфер раствора введения для следующего хроматографического этапа.

Затем проводят псевдоаффинную хроматографию хелатами металлов. Этот этап направлен на захват rhEPO и полное исключение фракции загрязняющих веществ, которые не были удалены на предыдущем этапе процесса. Гельфильтрационную хроматографию проводят снова для замены буфера на буфер для раствора введения следующего хроматографического этапа.

В качестве важной стадии процесса получения проводят анионнообменную хроматографию с лигандом четвертичного аммония Q. На этом хроматографическом этапе используют монолитные колонки. Целями этой хроматографии являются отделение гипосилилированных (биологически активных) изоформ от кислотных, удержание ДНК и концентрирование продукта.

Все это гарантирует, что получаются гипосилилированные изоформы без загрязнения или смешивания с кислотными изоформами.

Наконец, гельфильтрационную хроматографию проводят снова с целью замены буфера и обеспечения элюирования белка в виде активного сырого материала.

Краткое описание фигур

Фиг. 1. Профиль изоформ:

А) Определение доли изоформ;

В) SN, образованный в культурах при оцениваемых условиях температуры и pH;

фиг. 2 - доля гипосилилированных изоформ в культурах при оцениваемых условиях температуры и pH;

фиг. 3 - доля гипосилилированных изоформ в каждой культуре при условиях, оцениваемых в полупромышленном масштабе;

фиг. 4 - относительная интенсивность менее кислотных изоформ в SN;

фиг. 5 - влияние pH и проводимости подвижной фазы на статическую поглощающую способность в четвертичном аммонийном лиганде Q изоформ rhEPO: (А) гипосилилированные (основные), (В) кислотные;

фиг. 6 - кривые проскока:

А) Хроматографическая матрица "Q SFF",

В) Монолитная колонка "СІМ QА";

фиг. 7 - влияние pH буфера для элюирования на рабочие характеристики основных и кислотных изоформ;

фиг. 8 - распределение гипосилилированных изоформ rhEPO в производственном масштабе;

фиг. 9 - изучение N-гликанов гипосилилированного rhEPO путем жидкостной хроматографии с цвиттер-ионным гидрофильным взаимодействием, совмещенной с масс-спектрометрией;

фиг. 10 - электроферограмма извлеченных ионов (EIE) гликоформ гликопептида O126 гипосилилированного rhEPO, наблюдаемая при ферментативном расщеплении с: а) трипсином и нейраминидазой и б) трипсином;

фиг. 11 - EIE наблюдаемых гликоформ гликопептида N83, полученных при ферментативном расщеплении с трипсином и нейраминидазой;

фиг. 12 - EIE наблюдаемых гликоформ гликопептида N83 гипосилилированного rhEPO, полученных при ферментации с: а) трипсином и нейраминидазой и б) трипсином;

фиг. 13 - профиль выживаемости клеток культуры астроцитов через 24 и 48 ч после повреждения клеток 8% диметилсульфоксидом (DMSO) и последующей обработкой гипосилилированным rhEPO;

фиг. 14 - график Каплана-Мейера, выживаемость в течение 7 дней наблюдения;

фиг. 15 - неврологический статус животных через 24 ч после инфаркта;

фиг. 16 - эффект применения различных изоформ rhEPO на количество ретикулоцитов в нормоцитемической мышинной модели.

Настоящее изобретение также дополнено следующими примерами и фигурами.

Однако эти примеры не подразумеваются как ограничивающие объем настоящего изобретения.

Примеры

Пример 1. Влияние pH и температуры на профиль изоформ rhEPO в лабораторном масштабе

Из клеточной линии СНО, трансфицированной геном EPO человека, получали банк семенных клеток, который приспособляли к росту в суспензии в безбелковой среде. Полное приспособление к этой культуральной среде получали через 37 поколений, представляющих 25 дней культивирования.

Для оценки рабочих характеристик клеточной линии в присутствии различных условий pH и температуры проводили план эксперимента, где объединяли обе переменные. Экспериментальные условия

показаны в табл. 1. рН культуры контролировали добавлением 0,5 моль/л гидроксида натрия.

Таблица 1. Экспериментальные условия для оценки влияния переменных рН и температуры на профиль изоформ rhEPO

Исходная концентрация клеток (клетки/мл)	0,3 x 10 ⁶
Выживаемость клеток (%)	>90
Время культивирования (дни)	7
Температура инкубации (°C)	35 37
Рабочий объем (мл)	300
рН	7,2
	7,3
	7,5

Профиль изоформ rhEPO, соответствующий образцам SN, полученным в культурах при различных оцениваемых условиях, определяли изоэлектрическим фокусированием. Использовали смесь амфолинов с диапазоном рН от 2 до 5 и от 3 до 10, внутренний эталонный материал EPOCIM® использовали как контроль.

Процент интенсивности каждой изоформы в образцах анализировали денситометрией, используя программу Gene Tools. Изоформы со значениями рН в диапазоне от 2,80 до 4,25 определяли как кислотные изоформы, а со значением рН в диапазоне от 4,25 до 6,55 - как основные изоформы (фиг. 1А).

Фиг. 1В показывает, что на профиль изоформ сильно влияла температура.

Несмотря на рН, когда образцы SN, соответствующие каждому условию, сравнивали при температуре 37°C с контролем наблюдали 7 кислотных изоформ. С другой стороны, при 35°C наблюдалась потеря кислотных изоформ, что было более выраженным при условиях с рН 7,2 и 7,3.

Фиг. 2 показывает, что при условиях рН 7,2 и 7,3 и температуре 35°C все полученные изоформы (100%) были основными изоформами.

Пример 2. Влияние рН и температуры на профиль изоформ rhEPO в полупромышленном масштабе

Влияние наилучших культуральных условий, полученных в лабораторном масштабе (температура 35°C, рН 7,2 и 7,3), оценивали в более контролируемой и подходящей среде для клеточной культуры. Из банка семенных клеток, описанного в примере 1, разрабатывали четыре цикла ферментации, используя биореактор типа ST (Infors-AGCH 4103, Боттминген) с эффективным объемом 3,5 л. Рабочие условия показаны в табл. 2. Исходная выживаемость клеток была больше чем 90% при всех оцениваемых условиях.

Таблица 2. Рабочие условия, соответствующие каждому циклу ферментирования

Параметры	Условие 1	Условие 2	Условие 3	Условие 4
Исходный Xv (клеток/мл)	0,5x10 ⁶	1,76x10 ⁶	1,08x10 ⁶	2,31x10 ⁶
Рабочая температура (°C)	37	35	35	37
рН	7,41	7,2	7,3	-
Рабочий объем (л)	1,5	3	3	3
Общее время культивирования (дни)	5	7	7	7
Поток воздуха (мл/мин)	15	15	15	15
Скорость вращения импеллера (об/мин)	150	150	150	150
Степень разбавления (vvd)	-	0,3	0,3	0,3

Образцы отбирали в конце каждой ферментации и профиль изоформ образцов SN, образованных в культурах для оцениваемых условий в биореакторе, определяли посредством техники изоэлектрического фокусирования. Как только получали эти профили, использовали программу Gene Tools и начиная с изображения, соответствующего гелю изоэлектрического фокусирования, определяли интенсивность каждой полосы, присутствующей в геле, и оценивали долю гипосилированных изоформ для каждого условия.

Как можно увидеть на фиг. 3 в условиях культивирования 2 и 3 (35°C, рН 7,2-7,3), доля гипосили-

лированных изоформ была выше, чем при условиях 1 и 4. Эти результаты подтверждают обнаружения, полученные на лабораторном уровне, а именно, что путем модификации рабочих условий до pH 7,2-7,3 и температуры 35°C, профиль изоформ rhEPO изменяется, причем большая интенсивность достигается при значениях pH от 4,25 до 5,85.

Пример 3. Путем увеличения концентрации глутамин в культуральной среде происходит содействие экспрессии основных изоформ rhEPO

Для оценки, имело ли повышение концентрации глутамин в культуральной среде влияние на увеличение гипосилилированных изоформ, оценивали рабочие характеристики клеточной линии СНО, продуцирующей rhEPO. Использовали банк семенных клеток, который подвергали действию различных концентраций глутамин в культуральной среде, и приспособление к культуральной среде проводили в течение 15 дней. Оценка начиналась с исходной концентрации клеток $0,5 \times 10^6$ клеток/мл в конечном объеме 300 мл культуральной среды, используя вращающиеся бутылки, которые выдерживали в инкубаторах при 37°C со скоростью встряхивания 600 об/мин. Конечные концентрации глутамин в культуральной среде составляли 8, 12 и 16 ммоль/л, и культуральную среду с 6 ммоль/л глутамин использовали как контроль.

Относительную интенсивность гипосилилированных изоформ в SN культур оценивали по денситометрии через семь дней обработки различными концентрациями глутамин.

Фиг. 4 показывает, что с каждым из трех оцененных вариантов большие доли гипосилилированных изоформ получали относительно контроля, таким образом подтверждая, что с повышением концентрации глутамин в культуральной среде получение гипосилилированных изоформ в SN является предпочтительным. Наибольшее значение этих изоформ наблюдали с 8 ммоль/л глутамин (87%).

Пример 4. Влияние pH и проводимости на адсорбцию кислотных и основных изоформ в сильном четвертичном аммонийном анионообменнике Q в лабораторном масштабе

С целью определения условий pH и проводимости, которые благоприятствуют наибольшей адсорбции кислотных изоформ в сильном четвертичном аммонийном анионообменнике Q оценивали следующие буферные растворы: 20 ммоль/л фосфата натрия (безводный двухосновный и одноосновный дигидрат) и 20 ммоль/л трис с 10 ммоль/л HCl. Буферные растворы изучали при различных значениях pH и проводимости, pH от 6 до 8 и проводимость от 1,5 до 5 мСм/см.

Наибольшая адсорбция кислотных изоформ для обменника наблюдалась с условиями pH 6 и проводимостью 1,5 мСм/см. С другой стороны, адсорбция гипосилилированных (основных) изоформ максимизируется при pH 8 и проводимости 1,5 мСм/см. Результаты показаны на фиг. 5.

Пример 5. Сильная анионная матрица Q, которая использует технологию монолитной колонки, имеет лучшие рабочие характеристики в отношении емкости к отдельным изоформам rhEPO по сравнению с той, что использует обычную технологию хроматографических гелей в лабораторном масштабе

Динамическую адсорбционную способность (Q) каждой технологии при изучении рассчитывали с двумя кривыми проскока, используя два из линейных расходов, рекомендуемых изготовителем каждой технологии - 100 см/ч и 600 см/ч для технологии хроматографических гелей (Q SFF) и 156 и 624 см/ч для монолитной колонки (CIM QA). Равновесный раствор, используемый для экспериментов с обычной технологией и для технологии монолитной колонки, представлял буфер трис-HCl с pH 8 и проводимостью 1,5 мСм/см согласно результатам, полученным в примере 4.

Образец rhEPO применяли к колонкам и на выходе из них образцы отбирали в различное время. Концентрацию белков (C) в каждом образце определяли спектрофотометрией. С известными значениями C в каждом из образцов рассчитывали долю неадсорбированного белка C/Co. Загрузку, которая является массой белка, внесенного в колонку, на единицу объема геля, данную в мг rhEPO/мл матрицы Q, рассчитывали для каждого времени.

На фиг. 6 значения C/Co относительно динамической адсорбционной способности представлены графически на кривых проскока, что позволяет узнать Q геля на долю неадсорбированного белка $C/C_0=0,1$ при определенных расходах. Фиг. 6А показывает кривую проскока, полученную с обычной технологией хроматографических гелей, где самый низкий расход был таковым с самой высокой динамической способностью. Фиг. 6В показывает, что монолитная колонка имеет очень похожую динамическую адсорбционную способность с двумя протестированными линейными расходами, поэтому она может работать при более высоких расходах, не испытывая вариаций в динамической адсорбционной способности матрицы.

Табл. 3 показывает значения Q, полученные с различными выполненными измерениями.

Таблица 3. Значения Q, полученные с каждым из расходов, изученных в колонках Q SFF и CIM QA

Колонка	Поток воздуха (см/ч)	Q (rhEPO/мл геля)
QSFF	100	7,82

	600	5,58
С1М QА	156	8,25
	624	7,79

При сравнении результатов исследований Q, проводимых в сильных анионообменниках в набивке фильтра и технологии монолитной колонки, наблюдали, что обе технологии имеют подобный Q при самой низкой исследованной линейной скорости. Однако при самой высокой линейной скорости монолитная колонка имеет динамическую адсорбционную способность в 1,40 раза больше, чем у традиционной оцененной хроматографической матрицы. Таким образом, можно сделать вывод, что монолитная колонка обеспечивает увеличение рабочего потока процесса без влияния на емкость обработки массы ghEPO, которую необходимо очищать.

Пример 6. Путем снижения pH оказывается содействие элюированию гипосиалилированных изоформ ghEPO в монолитной колонке в лабораторном масштабе

Проводили экспериментальные тесты, используя колонки Q SFF и С1М QА. Равновесный раствор, используемый для обеих технологий, представлял собой буфер трис-НС1 при pH 8 и проводимости 1,5 мСм/см согласно примеру 4. Рабочая линейная скорость колонки Q SFF составляла 600 см/ч, а у монолитной колонки - 624 см/ч. Продукт, используемый для экспериментов, был полученным из молекулярно-эксклюзионной хроматографической колонки "Sephadex" G-25, после проведения смены буфера на таковой для равновесного раствора, указанный выше. Для элюирования основных изоформ несколько циклов проводили при помощи монолитной анионообменной колонки, используя 50 ммоль/л натрий-ацетатного буфера с твин 20 при 0,01% со значениями pH: 4,41; 4,81; 5,06; 5,20. Извлечения, полученные при элюировании гипосиалилированных (основных) изоформ и кислотных изоформ в каждом цикле, показаны на фиг. 7. Из анализа этих результатов определили, что, когда pH раствора буфера для элюирования основных изоформ повышается, их рабочие характеристики снижаются, таким образом 50 ммоль/л натрий-ацетатного буфера при pH 4,41 выбирали для элюирования.

Пример 7. Процесс получения гипосиалилированного ghEPO на промышленном уровне является последовательным с точки зрения разделения изоформ и степени чистоты

Из банка семенных клеток, описанного в примере 1, проводили цикл ферментации, причем исходная выживаемость клеток была больше 90%. Этап ферментации проводили при температуре 35°C в безбелковой культуральной среде, которую дополняли для достижения конечной концентрации 8 ммоль/л глутаминa, pH среды поддерживали от 7,2 до 7,3.

Как только получали четыре урожая, проводили стадию очистки, где для важной стадии использовали анионообменник с четвертичным лигандом Q, используя монолитную колонку. Раствор трис-НС1 при pH 8 и проводимости 1,5 мСм/см использовали как равновесный буфер и 50 ммоль/л натрий-ацетатного буфера с pH 4,41 использовали для элюирования.

Профиль изоформ четырех партий активного сырого материала, полученных после процесса очистки, определяли посредством техники изоэлектрического фокусирования. Смесь амфолинов с диапазоном pH от 2 до 5 и от 3 до 10 использовали, и внутренний эталонный материал EPOС1М® использовали как контроль. Фиг. 8 показывает согласованность в разделении изоформ, где наблюдается профиль изоформ, сконфигурированный шестью основными изоформами, из которого только две совпадают с контролем.

Кроме того, содержание сиаловой кислоты очищенных изоформ определяли согласно процедуре для определения этой молекулы, описанной в Европейской фармакопее 8.0 (2014), а чистоту - при помощи ВЭЖХ с обращенной фазой. Табл. 4 показывает полученные результаты в отношении содержания сиаловой кислоты и чистоты.

Таблица 4. Результаты в отношении содержания сиаловой кислоты и чистоты гипосиалилированного ghEPO

Продукт	Сиаловая кислота (моль сиаловой кислоты/моль белка)	ВЭЖХ с обращенной фазой (%)
Партия 1	5,1	96,24
Партия 2	5,5	98,03
Партия 3	6,5	98,38
Партия 4	6,9	98,29

Содержание сиаловой кислоты было менее 10 моль сиаловой кислоты/молекулу белка, а чистота была больше 95% в четырех партиях, из чего можно сделать вывод, что процесс получения гипосиалилированного ghEPO гарантирует получение изоформ в диапазоне pH от 4,25 до 5,85, что отличается от наблюдаемого в NeuroEPO.

Пример 8. Третичная структура, связанная с гликозилированием гипосилилированного rhEPO, показывает характерную микрогетерогенность

Анализ гликанов

Для изучения его профиля N-гликанов гипосилилированный rhEPO подвергается процессу денатурирования и ферментативного расщепления с пептидом N-гликозидазой F (PNGase F). Как только N-гликаны высвобождались, их очищали твердофазной экстракцией, используя картриджи HyperSep Purercab SPE (Mancera-Arteu, M. et al. (2016) Anal. Chim. Acta 940: 92-103). Затем их дериватизировали согласно процедуре, описанной Gimenez и соавт. в 2015 (Gimenez, E et al. (2015) Anal. Chim. Acta, 866: 59-68).

Капиллярную жидкостную хроматографию цвиттер-ионного-гидрофильного взаимодействия, совмещенную с масс-спектрометрией, проводили, следуя методике, описанной Mancera-Arteu, M. et al. (2016) Anal. Chim. Acta, 940: 92-103.

Фиг. 9 показывает масс-спектры трех гликанов, обнаруженные в гипосилилированном rhEPO. Как можно увидеть, гликан 3Ant2SiA1Fuc является наиболее распространенным, тогда как гликан 4Ant4SiA1Fuc обнаруживается в сниженных количествах.

Табл. 5 показывает процент относительной площади гликанов согласно структуре.

Таблица 5. Процент относительной площади гликанов согласно структуре

Гликаны	Площадь (%) **
Биантенарные структуры	10,3
Триантенарные структуры	17,2
Тетраантенарные структуры	72,5

Табл. 6 показывает гликаны, обнаруживаемые с соответствующими относительными площадями, моноизопотной экспериментальной молекулярной массой (Мэксп.) и погрешностью по массе. Как можно видеть, есть значительное количество гликанов с менее сialiрированными структурами.

Таблица 6. N-Гликаны, обнаруживаемые в гипосилилированном rhEPO капиллярной жидкостной хроматографией цвиттерионного-гидрофильного взаимодействия, совмещенной с масс-спектрометрией

Гликаны		Площадь	Площадь (%) *	Площадь (%) **	Мэксп. [Да]	Погрешность
2 Ant	2Ant1SiA1Fuc	608,586	2,91	10,3	2154,8011	9,39
	2Ant2SiA1Fuc	2321,812	11,31		2445,8983	8,34
3 Ant	3Ant1SiA1Fuc	448,587	2,18	17,2	2519,9309	6,25
	3Ant2SiA1Fuc	1872,328	8,98		2811,0307	7,25
	3Ant3SiA1Fuc	2562,955	12,46		3102,1243	6,58
4Ant	4Ant1SiA1Fuc	589,168	2,94	30,1	28885,0669	8,01
	4Ant2SiA1Fuc	2122,871	10,03		3176,1571	6,09
	4Ant3SiA1Fuc	4243,325	20,74		3467,2550	5,60
	4Ant4SiA1Fuc	1575,249	7,80		3758,2975	5,11
4Ant 1LacAc	4Ant1LacNAc1SiA1Fuc	205,545	1,01	35,0	3250,1917	5,45
	4Ant1LacNAc2SiA1Fuc	1506,731	3,67		3541,2889	5,75
	4Ant1LacNAc3SiA1Fuc	807,621	7,01		3832,3847	3,44
	4Ant1LacNAc4SiA1Fuc	8539,613	3,00		4123,4849	4,12
4Ant 2Lac	4Ant2LacNAc2SiA1Fuc	185,318	0,88	3,32	3906,4126	1,11

Ac	4Ant2LacNA c3SiA1Fuc	433,265	2,06		4197,4971	5,26
	4Ant2LacNA c4SiA1Fuc	322,987	1,59		4488,5519	6,33
4Ant 3Lac Ac	4Ant3LacNA c1SiA1Fuc	68,423	0,32	4 081	3980,5185	24,3
	4Ant3LacNA c2SiA1Fuc	1092,708	0,3		4271,4698	16,70
	4Ant3LacNA c3SiA1Fuc	83,360	0,38		4562,5930	13,0
	4Ant3LacNA c4SiA1Fuc	95,315	0,43		4853,6515	16,6

* Это представляет относительную площадь относительно всех обнаруженных гликанов.

** Это представляет относительную площадь, сгруппированную антенными структурами относительно всех обнаруженных гликанов.

Как можно увидеть в табл. 6, гликаны с более сиалилированными структурами (четыре молекулы сиаловой кислоты) обнаруживаются в низком отношении. Напротив, обнаруживаются структуры с молекулой сиаловой кислоты, которые не были обнаружены в других rhEPO, таких как 3Ant1SiA1Fuc, 4Ant1SiA1Fuc, 4Ant1LacNAc1SiA1Fuc и 4Ant3LacNAc1SiA1Fuc. Гликан 4Ant3SiA1Fuc распространен в гипосиалилированном rhEPO. Также можно увидеть, что процент относительной площади антенных структур относительно всех обнаруженных гликанов отличается от другого rhEPO и что структуры с одним или двумя остатками сиаловой кислоты представляют более 50% относительной площади антенных структур.

Анализ гликопептидов

Для обнаружения всех глюкоформ, присутствующих в гликопептидах O₁₂₆ и N₈₃, rhEPO и rhEPO-CRS (эталонный продукт фармакопей) подвергали ферментативному расщеплению с трипсином и нейраминидазой (HS-TN rhEPO). Все сиалоформы в каждой обнаруженной глюкоформе изучали в анализе ферментативного расщепления с трипсином (HS-T rhEPO). Образцы анализировали масс-спектрометрией согласно процедуре, описанной Gimenez, E. et al. (2011) Rapid Commun Mass Spectrom. 25: 2307-2316.

Фиг. 10А и В показывают EIE глюкоформ гликопептида O₁₂₆, обнаруженного в дигестатах rhEPO HS-TN и HS-T, соответственно. В первом наблюдается один пик, соответствующий таковому глюкоформы O₁₂₆/0SiA, поскольку нейраминидаза дает полное десиаилирование гликопептида, так что все сиалоформы становятся одной глюкоформой. Напротив, когда ферментативно расщепляется только с трипсином, наблюдалось три сиалоформы с 0, 1 и 2 молекулами сиаловой кислоты. Табл. 7 показывает сиалоформы O₁₂₆, обнаруженные с соответствующими относительными площадями, моноизопотной экспериментальной молекулярной массой (Мэксп.) и погрешностью по массе.

Таблица 7. Гликоформы, обнаруженные в гликопептиде O₁₂₆ гипосиалилированного rhEPO и rhEPO CRS, ферментативно расщепляющихся с трипсином

rhEPO-CRS-T				
Гликопептид O126	Rt [мин]	Отн. площадь [%]	Мэксп. [Да]	Погрешность [части на миллион]
0SiA	12,1	1,61	1829,9169	15,0
1SiA	14,6	60,4	2121,0166	15,0
2SiA	18,4	38,0	2412,1175	15,0
Гипосиалилированный-T EPO гипосиалилада-T				
Гликопептид O126	Rt [мин]	Отн. площадь [%]	Мэксп. [Да]	Погрешность [части на миллион]
0SiA	14,0	8,88	1829,9173	15,2
1SiA	17,2	80,5	2121,0173	15,3
2SiA	22,1	10,7	2412,1215	17,1

Полученные результаты показывают, что наиболее распространенная сиалоформа является таковой, которая содержит одну молекулу сиаловой кислоты. Как процент относительной площади асиалилированных изоформ, так и изоформ с только одной сиаловой кислотой выше при сравнении с описанными для другого rhEPO, обнаруживая различия в доле обеих сиалоформ с CRS rhEPO.

В случае гликопептида N₈₃ при анализе ферментативного расщепления rhEPO HS-TN обнаруживали шесть пиков, соответствующих шести различным глюкоформам без сиаловой кислоты. Полученные EIE показаны на фиг. 11, а обнаруженные глюкоформы - в табл. 8. Полученные результаты показывают, что на сайте N₈₃ есть большой процент сложных десиаилилированных тетраантенарных структур.

Таблица 8. Обнаруженные гликоформы гликопептида N₈₃ EPO HS-TN

Гликопептид ₈₃	R _t [мин]	Площадь _{отп} [%]	Мэксп. [Да]	Погрешность [части на миллион]
2Ant0SiA1Fuc	15,4	17,12	4126,926	13,0
3Ant0SiA1Fuc	15,7	27,33	4492,067	13,9
4Ant0SiA1Fuc	15,9	24,30	4857,199	12,9
4Ant1LacNAc0Si	16,2	12,50	5222,333	12,3
4Ant2LacNAc0Si	16,4	6,75	5587,325	13,6
4Ant3LacNAc0Si	15,9	12,0	5952,621	14,8

Фиг. 12А показывает, что нет разделения между различными тетраантенарными структурами в дигестате HS-TN rhEPO. Напротив, когда сиалилированные гликоформы дигестата HS-T rhEPO анализируют, наблюдается явное разделение между ними, причем те, которые имеют три остатка сиаловой кислоты, имеют большую интенсивность (фиг. 12В). Эти результаты согласуются с обнаружениями из исследования гликанов.

Табл. 9 показывает все обнаруженные сиалоформы и соответствующие относительные площади, моноизотопные экспериментальные молекулярные массы (Мэксп.) и погрешность по массе.

Таблица 9. Гликоформы гликопептида N83, обнаруженные в дигестатах с трипсином и трипсином/нейраминидазой

Гликопептид N ₈₃		Этал. площадь (%)	Площадь (%) **	Мэксп. [Да]	Погрешность [части на миллион]
2 Ant	2Ant1SiA1Fuc	2,54	10,47	4417,9833	3,43
	2Ant2SiA1Fuc	7,93		4709,1311	14,3
3 Ant	3Ant1SiA1Fuc	9,17	19,56	4783,1079	1,58
	3Ant2SiA1Fuc	7,49		5074,2569	12,1
	3Ant3SiA1Fuc	2,90		5365,3564	12,2
4 Ant	4Ant1SiA1Fuc	4,82	29,13	5148,2690	7,08
	4Ant2SiA1Fuc	9,58		5439,4017	13,6
	4Ant3SiA1Fuc	9,06		5730,5066	14,5
	4Ant4SiA1Fuc	5,67		6021,4347	14,0
4 Ant 1LacAc	4Ant1LacNAc1SiA1Fuc	4,40	23,79	5513,3202	8,08
	4Ant1LacNAc2SiA1Fuc	7,67		5804,5468	14,9
	4Ant1LacNAc3SiA1Fuc	5,96		6095,5354	3,31
	4Ant1LacNAc4SiA1Fuc	5,76		6386,8708	34,4
4 Ant 2LacAc	4Ant2LacNAc2SiA1Fuc	6,42	17,05	6169,8030	34,1
	4Ant2LacNAc3SiA1Fuc	4,81		6460,6122	11,7
	4Ant2LacNAc4SiA1Fuc	5,82		6751,6217	23,9

Результаты подтверждают, что гипосиалилированный rhEPO отличается наличием меньшего количества сиалилированных структур (например, 2Ant1SiA1Fuc или 3Ant1SiA1Fuc), когда белок расщепляется только с помощью трипсина. Когда подтверждали процент относительных площадей моно- и бисиалилированных структур, результаты показали, что они составляют приблизительно 60%. Тетраантенарные структуры в гликопептиде N83 обнаруживаются в наибольшем проценте по сравнению с другими гликоформами, причем имеющие два остатка сиаловой кислоты являются теми, которые имеют наибольшую долю.

Пример 9. Гипосиалилированный rhEPO имеет восстанавливающее действие для астроцитов против цитотоксичности DMSO

Линию астроцитов PG4 культивировали в культуральной среде - модифицированной по способу Дульбекко среде Игла (DMEM) с высоким содержанием глюкозы, дополненной 3,7 г/л NaHCO₃ и 10% эмбриональной бычьей сывороткой (FBS). Клетки инкубировали в течение 24 часов при температуре 37°C в атмосфере 5% CO₂/95% воздуха. Через определенное время SN экстрагировали и клетки подвергали повреждению, вызванному 8% DMSO, и снова инкубировали в течение 24 ч. Затем SN удаляли и добавляли 2% культуральной среды DMEM с различными концентрациями гипосиалилированного rhEPO (1,25; 2,5; 5 и 10 нг/мл). В 24 и 48 ч добавляли реагент Alamar Blue, затем клетки инкубировали в течение 6 ч и считывания выполняли при 540/630 нм. Все инкубации проводили при температуре 37°C в

атмосфере 5% CO₂/95% воздуха.

На фиг. 13 можно увидеть, как при разных концентрациях 1,25; 2,5; 5 и 10 нг/мл гипосиалилированного rhEPO клетки были способны восстанавливать свою жизнеспособность, причем наилучшее условие было 1,25 нг/мл гипосиалилированного rhEPO, что показывает способность к регенерации астроцитов.

Пример 10. Гипосиалилированный rhEPO имеет лучшую нейрозащитную активность, чем NeuroEPO

Песчанок из Монголии использовали для разработки модели перманентной односторонней ишемии, следуя методике, описанной Kahn К. в 1972 г. (Kahn К. (1972) *Minneap* 22: 510-515). Затем животных рандомизировали на пять экспериментальных групп:

Группа 1: Среда 10 мкл среды

Группа 2: Обработываемые 0,142 мг/кг гипосиалилированного rhEPO

Группа 3: Обработываемые 0,0142 мг/кг гипосиалилированного rhEPO

Группа 4: Обработываемые 0,142 мг/кг NeuroEPO

Группа 5: Обработываемые 0,0142 мг/кг NeuroEPO

Каждую обработку вводили интраназальным путем три раза в сутки в течение четырех дней. Животных оценивали в течение первых 4 дней обработки, а также в течение восстановления следующие 3 дня.

Результаты показали значительно больший коэффициент выживаемости животных, обработанных гипосиалилированным rhEPO в дозах 0,142 и 0,0142 мг/кг по сравнению со средой, тогда как NeuroEPO только снижал значительно смертность в дозе 0,142 мг/кг, но не в 0,0142 мг/кг (фиг. 14).

Неврологическая оценка показала нейрозащитное действие гипосиалилированного rhEPO (NeuroEPO plus), что значительно снижало значения неврологической шкалы у животных, обработанных в используемых дозах, по сравнению с группой плацебо и с группами, которых обрабатывали NeuroEPO, в которых такой же результат, полученный с гипосиалилированным rhEPO, можно достигать только с дозой 0,142 мг/кг (фиг. 15) (Статистический тест Дункана, равные буквы $p > 0,05$; различные буквы $p > 0,05$).

Пример 11. Гипосиалилированный rhEPO не повышает количество ретикулоцитов в нормоцитемической мышинной модели

Самок мышей B6D2F1 рандомизировали на 6 экспериментальных групп по 6 животных в каждой, и они получали одну дозу лечения следующим образом: Группа 1: 0,003 мг/мл рабочего эталонного материала rhEPO в 200 мкл объеме подкожным путем (п/к). Группа 2: 0,006 мг/мл гипосиалилированного rhEPO в 200 мкл объеме п/к путем.

Группа 3: 0,5 мг/мл гипосиалилированного rhEPO в 200 мкл объеме интраназальным путем.

Группа 4: 1 мг/мл гипосиалилированного rhEPO в 200 мкл объеме интраназальным путем.

Группа 5: 2 мг/мл гипосиалилированного rhEPO в 200 мкл объеме интраназальным путем.

Группа 6: Контроль, 200 мкл вспомогательного вещества п/к путем.

Результаты подсчета ретикулоцитов показаны на фиг. 16. Как можно увидеть, не было значительной разницы между животными в контрольной группе и животными в группах, обработанных как п/к, так и интраназально гипосиалилированным rhEPO. Подсчет ретикулоцитов для животных, обработанных рабочим эталонным материалом rhEPO, был значительно выше, чем у животных в контрольной группе и в группе, обработанной гипосиалилированным rhEPO, при обоих использованных путях (Тест Дункана, равные буквы $p > 0,05$; различные буквы $p < 0,05$).

Результаты показали, что гипосиалилированный EPO не повышает подсчет ретикулоцитов даже при наибольшей дозе, установленной для этого испытания, что показывает, что он не имеет гематопоетического эффекта.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Фармацевтическая композиция, содержащая в качестве активного ингредиента рекомбинантный эритропоэтин человека (rhEPO), профиль изоэлектрической точки которого составляет от 4,25 до 5,85, где микрогетерогенность фукозилированных N-гликанов образована би-, три- и тетраантенарными структурами, которые имеют моно- и бисиалилированные остатки сиаловой кислоты в диапазоне 40-60% всех гликанов, трисиалилированные - в диапазоне 40-43% всех гликанов и тетрасиалилированные - в диапазоне 10-13% всех гликанов, и фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество.

2. Фармацевтическая композиция по п.1, отличающаяся тем, что сайт O-гликозилирования в серине 126 имеет 3 сиалоформы, которые имеют от 0 до 2 остатков сиаловой кислоты, где моносиалилированная структура является наиболее распространенной и составляет 78-82% всех гликанов, и асиалилированные структуры составляют 6-10% всех гликанов.

3. Фармацевтическая композиция по п.1, отличающаяся тем, что сайт N-гликозилирования аспарагина 83 содержит

фукозилированные биантенарные структуры с 1 и 2 остатками сиаловой кислоты, где указанные структуры составляют 8-12% всех гликанов,

фукозилированные триантенарные структуры с 1, 2 и 3 остатками сиаловой кислоты, где эти структуры составляют 17-21% всех гликанов,

фукозилированные тетраантенарные структуры с 1-4 остатками сиаловой кислоты, где указанные структуры составляют 27-31% всех гликанов, и

фукозилированные тетраантенарные структуры с N-ацетиллактозамином 1 и 2 типа, которые представляют 1-4 остатка сиаловой кислоты, где указанные структуры составляют 38-42% всех гликанов.

4. Фармацевтическая композиция по п.1, отличающаяся тем, что фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество включает биоадгезивные полимеры и стабилизаторы белков.

5. Фармацевтическая композиция по п.4, отличающаяся тем, что биоадгезивные полимеры выбраны из группы, содержащей
гидроксиметилцеллюлозу,
гидроксипропилцеллюлозу и
метилцеллюлозу.

6. Фармацевтическая композиция по п.4, отличающаяся тем, что стабилизаторы белков выбраны из группы, содержащей

L-триптофан,

L-лейцин,

гидрохлорид L-аргинина и

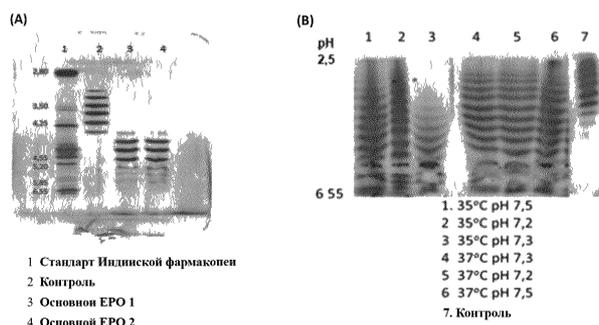
гидрохлорид L-гистидина.

7. Способ получения rhEPO, профиль изоэлектрической точки которого составляет от 4,25 до 5,85, где микрогетерогенность фукозилированных N-гликанов образована би-, три- и тетраантенарными структурами, которые имеют моно- и бисиаилированные остатки сиаловой кислоты в диапазоне 40-60% всех гликанов, трисиаилированные в диапазоне 40-43% всех гликанов и тетрасиалилированные в диапазоне 10-13% всех гликанов согласно п.1 без дополнительных химических и генетических модификаций, в котором процесс ферментации происходит в баке-смесителе, и в процессе очистки используют хроматографический этап с монолитной колонкой в качестве анионообменника с четвертичным аммонийным лигандом Q.

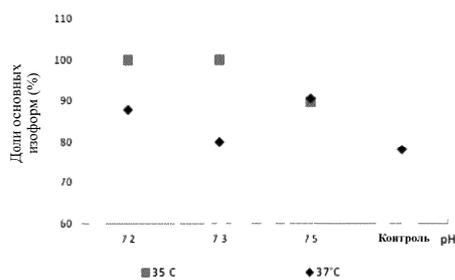
8. Способ по п.7, отличающийся тем, что процесс ферментации rhEPO проводят в баке-смесителе при температуре 35°C и в диапазоне pH 7,2-7,3, в безбелковой культуральной среде, дополненной глутамином, с получением конечной концентрации глутамината от 8 до 12 ммоль/л.

9. Способ по п.7, отличающийся тем, что в процессе очистки используют раствор 20 ммоль/л трис в 10 ммоль/л HCl с pH 8 и проводимостью 1,5 мСм/см в качестве равновесного буфера и 50 ммоль/л раствор ацетата натрия с pH 4,41 в качестве буфера для элюирования.

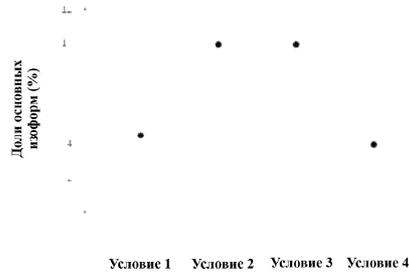
10. Применение фармацевтической композиции по любому из пп.1-6 для лечения деменции, инсульта, болезни Паркинсона, атаксии, черепно-мозговой травмы, глаукомы, аутизма, гипоксии новорожденных, рассеянного склероза, бокового амиотрофического склероза и неврологического повреждения, вызываемого травмой, интоксикацией или облучением.



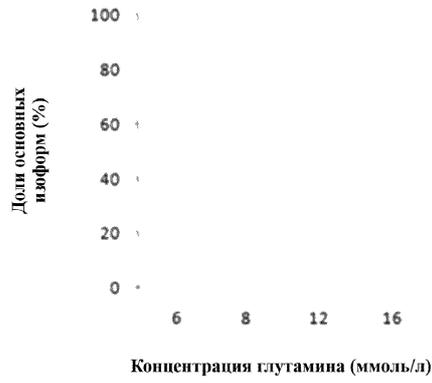
Фиг. 1



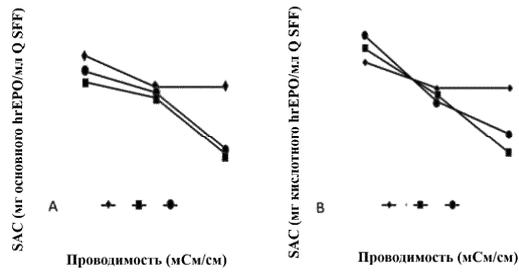
Фиг. 2



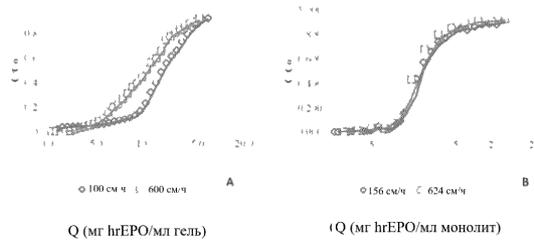
Фиг. 3



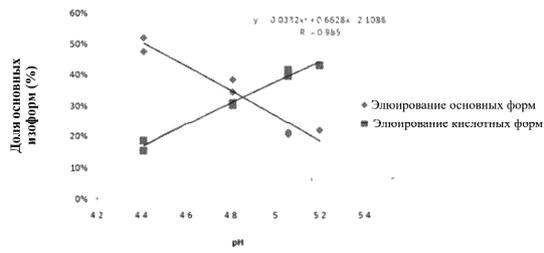
Фиг. 4



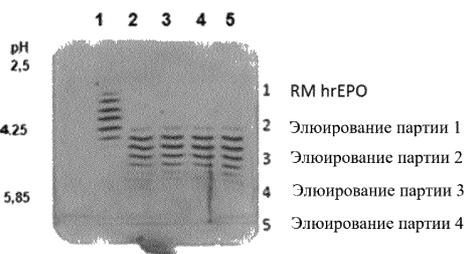
Фиг. 5



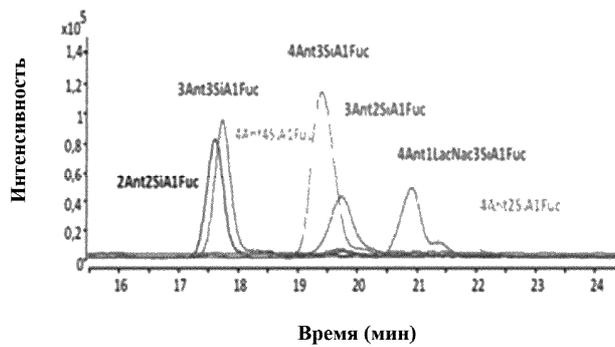
Фиг. 6



Фиг. 7

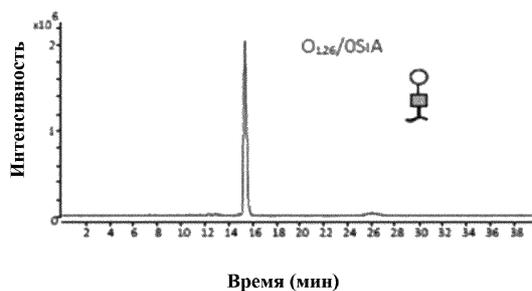


Фиг. 8



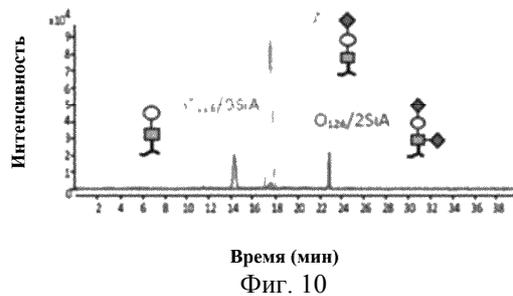
Фиг. 9

А)

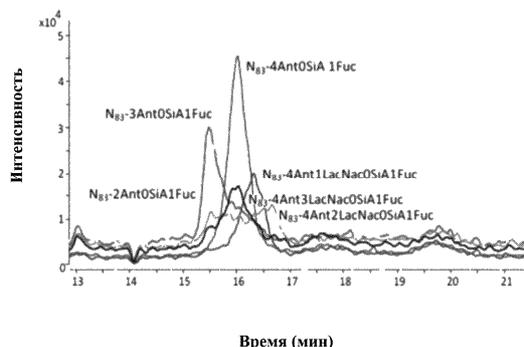


Время (мин)

В)

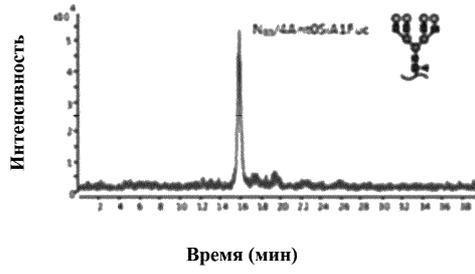


Время (мин)
Фиг. 10

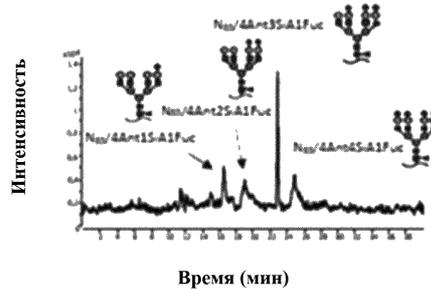


Время (мин)
Фиг. 11

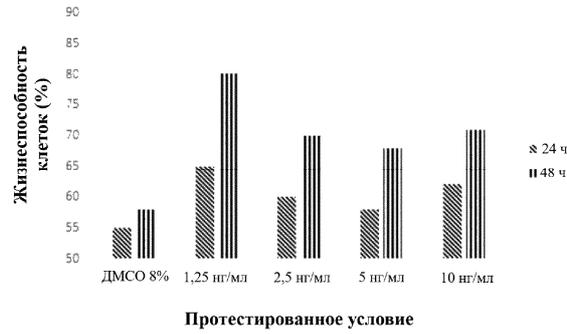
A)



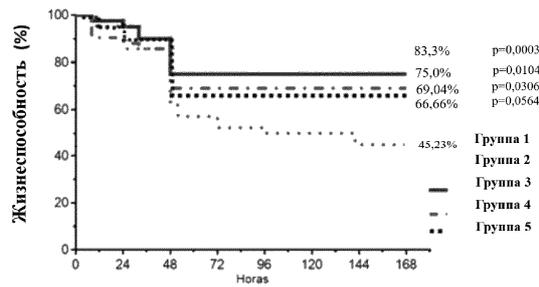
B)



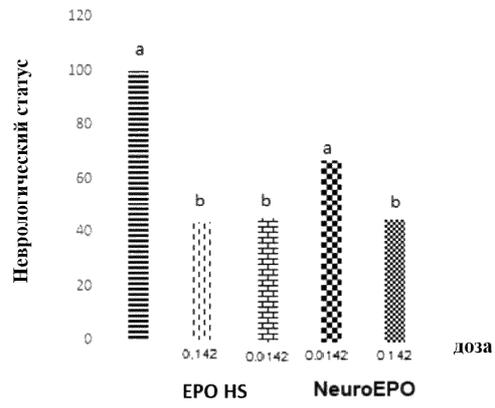
Фиг. 12



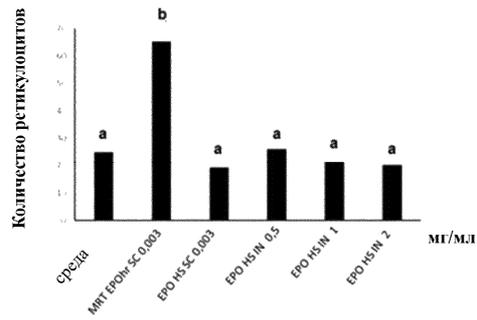
Фиг. 13



Фиг. 14



Фиг. 15



Фиг. 16