



(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ

(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN) (11)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ



1-0048936

(51)^{2020.01} A61K 38/18; C07K 14/505; C07K 1/00; (13) B
A61P 25/00; A61P 43/00

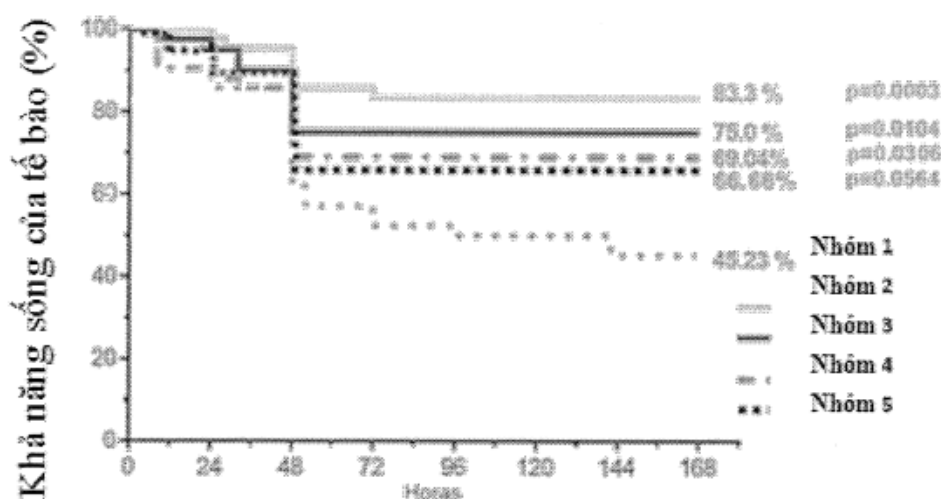
-
- | | |
|---|--------------------------------|
| (21) 1-2022-02140 | (22) 19/02/2020 |
| (86) PCT/CU2020/050001 19/02/2020 | (87) WO 2021/043345 11/03/2021 |
| (30) 2019-0077 05/09/2019 CU | |
| (45) 25/07/2025 448 | (43) 25/08/2022 413A |
| (73) CENTRO DE INMUNOLOGIA MOLECULAR (CU)
Calle 216 esq. 15, Atabey, Playa, La Habana 11600, Cuba | |
| (72) RODRÍGUEZ OBAYA, Teresita de Jesus (CU); AMARO GONZÁLEZ, Daniel
Enrique (CU); GARCÍA ARTALEJO, Judey Aymed (CU); SOSA TESTÉ, Iliana
Maria (CU); SARMIENTO CONDE, Yanara (CU); HERNÁNDEZ DE LA ROSA,
Lourdes (CU); DÍAZ GOIRE, Dayli (CU); GIMÉNEZ LÓPEZ, Estela (ES). | |
| (74) Công ty Luật TNHH Phạm và Liên danh (PHAM & ASSOCIATES) | |
-

(54) DƯỢC PHẨM CHỨA HOẠT CHẤT ERYTHROPOIETIN TÁI TỔ HỢP CỦA
NGƯỜI (RHEPO) VÀ PHƯƠNG PHÁP THU NHẬN RHEPO

(21) 1-2022-02140

(57) Sáng chế đề cập đến lĩnh vực Công nghệ sinh học và Y học và đề xuất được phẩm erythropoietin tái tổ hợp của người, được đặc trưng bởi độ không đồng nhất vi mô của N-glycan fucosyl hóa được tạo thành bởi các cấu trúc hai, ba và bốn anten chứa gốc axit sialic đã mono và bi-sialyl hóa, có mặt với lượng nằm trong khoảng từ 40-60% glycan tổng số, cấu trúc trisialyl hóa có mặt với lượng nằm trong khoảng từ 40-43% glycan tổng số và cấu trúc tetrasialyl hóa có mặt với lượng nằm trong khoảng từ 10-13% glycan tổng số. Dạng glycosyl hóa này mang lại các đặc tính cho được phẩm này, cho phép sử dụng nó trong các bệnh thuộc hệ thần kinh. Sáng chế còn đề cập đến phương pháp thu nhận được phẩm này.

Hình 14



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến lĩnh vực Công nghệ sinh học và Y học, cụ thể là đề cập đến phương pháp thu nhận được phẩm erythropoietin tái tổ hợp của người có kiểu glycosyl hóa mang lại các đặc tính cho phép sử dụng được phẩm này trong các rối loạn của hệ thần kinh.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Erythropoietin (EPO) là hormon glycoprotein được tạo thành bởi 166 axit amin có khối lượng phân tử là 30,4 kDa (Lanfranco, F và Strasburger, C. J. (2016) *Sports Endocrinology* 47: 115-27). EPO được tổng hợp tự nhiên trong các tế bào hình sao của gan trong giai đoạn bào thai và giai đoạn sắp sinh và chủ yếu ở nguyên bào sợi kẽ của thận ở giai đoạn trưởng thành. Hormon này kích thích sản xuất các tế bào hồng cầu trong tủy xương và đóng vai trò quan trọng trong phản ứng của não đối với tổn thương tế bào thần kinh (Sirén L. và đồng tác giả (2001) *Proc Natl Acad Sci USA* 98 (7): 4044-9).

EPO là phân tử glycosyl hóa cao và phần hydratcacbon của nó chiếm 40% khối lượng phân tử. Protein này chứa bốn chuỗi oligosaccarit phức được liên kết với chuỗi polypeptit, ba chuỗi trong số đó nhờ các liên kết kiểu N và một chuỗi nhờ liên kết kiểu O, vị trí của nó đã được nhiều tác giả mô tả kỹ: Elliott, S. và đồng tác giả (2004) *The Journal of Biological Chemistry*, 279(16): 16854-16862; Watson và đồng tác giả (1994) *Glycobiology* 4(2): 227-237. Các oligosaccarit có liên kết kiểu N có thể chứa các gốc ở tận cùng của axit sialic với lượng khác nhau và rất quan trọng đối với sự bài tiết, ổn định phân tử, liên kết thụ thể và hoạt động *in vivo* (Egrie, J. và Browne, J. (2001) *Br. J. Cancer*, 84(1): 3-10; Goldwasser và đồng tác giả (1974) *J. Biol. Chem* 249: 4202-4206).

Trong suốt những năm 90 của thế kỷ trước cho đến nay, đã tích lũy rất nhiều bằng chứng về các đặc tính bảo vệ thần kinh của EPO tái tổ hợp của người (rhEPO). Năm 1998, Sakanara và đồng tác giả đã chứng minh rằng sau khi tác động

mạch cảnh chung trong mô hình thiếu máu cục bộ toàn bộ ở chuột nhảy, rhEPO được cung cấp thông qua não thất bên làm giảm tổn thương do thiếu máu cục bộ trên hồi hải mã ở vùng CA1 (Sakanara, M. và đồng tác giả (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95: 4635-4640).

Tác dụng bảo vệ tế bào của EPO trên hệ thần kinh trung ương đã được Maiese và đồng tác giả chứng minh vào năm 2004 và sau đó được chứng minh bởi Viviani và đồng tác giả vào năm 2005. (Maiese, K. và đồng tác giả (2004) *Trends in Pharmacological Sciences* 25 (11): 577-83; Viviani, D. và đồng tác giả (2005) *Journal of Neurochemistry* 93 (2): 257-268). Mặc dù tất cả thông tin đã được tích lũy trong các nghiên cứu phi lâm sàng về EPO tạo máu nhưng vẫn chưa có kết quả về mặt lâm sàng do các phản ứng có hại liên quan đến việc sử dụng kéo dài ở bệnh nhân.

Ở người lớn, sự biểu hiện của thụ thể EPO trong hệ thần kinh được tìm thấy chủ yếu ở tế bào thần kinh, tế bào hình sao và tiểu thần kinh đệm, trong khi tế bào hình sao tạo ra EPO, đây là EPO đã hyposialyl hóa (Nagai, A. và đồng tác giả (2001) *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 60 (4): 317-319).

Nhiều nhà nghiên cứu đã thực hiện biến đổi rhEPO để tạo ra thuốc cũng có đặc tính bảo vệ thần kinh nhưng không có phản ứng có hại gây ra bởi hoạt động tạo máu. EPO này được gọi là EPO Asialo (US 2004/0122216), thu được bằng phương pháp desialyl hóa rhEPO bằng enzym tổng số, có đặc tính mong muốn được đề cập trên đây, loại EPO này có ái lực cao với thụ thể rhEPO nhưng có tác dụng bảo vệ hạn chế do chu kỳ bán hủy của huyết tương là cực kỳ ngắn. Ví dụ khác về sự biến đổi erythropoietin là sự biến đổi lysin thành homoxitrulin bằng cách carbamyl hóa protein này tạo ra EPO carbamyl hóa, được gọi là CEPO (Leist, M., Ghezzi, P., Grasso, G., và đồng tác giả (2004) 305 (5681): 239-242). Mặc dù cả hai EPO đều không có tác dụng tạo máu nhưng trong các thử nghiệm lâm sàng được thực hiện với CEPO, ngay cả khi không quan sát thấy tác dụng phụ nào thì cũng không chứng minh được hiệu quả bảo vệ thần kinh.

Công bố đơn WO 2007/009404 yêu cầu bảo hộ các chế phẩm EPO dùng qua mũi chứa axit sialic với hàm lượng thấp, sau đây được gọi là NeuroEPO trong một

đơn yêu cầu cấp patent của các tác giả này (García, JC and Sosa, I. (2009), The Scientific World Journal , 9: 970-981.) RhEPO này thu được bằng phương pháp lên men màng sợi rỗng và sắc ký trao đổi ion khi tinh chế để tách chất đồng phân có tính axit nhất (các chất có hàm lượng axit sialic cao hơn từ các chất có hàm lượng axit sialic thấp hơn). NeuroEPO đã nêu có cấu hình gồm 13 chất đồng phân, trong đó 9 chất đồng phân có rhEPO tạo máu giống nhau, được gọi là EPOCIM®.

Lần đầu tiên, các tác giả của sáng chế mô tả phương pháp sản xuất trong bể khuấy (ST) kết hợp với bước tinh chế được thực hiện bằng các phương pháp sắc ký bằng cách sử dụng cột đơn khối làm cột trao đổi anion với phối tử amoni bậc bốn Q, có khả năng làm tăng sự biểu hiện của chất đồng phân rhEPO đã hyposialyl hóa mà không cần biến đổi thêm về mặt hóa học và di truyền. Các chất đồng phân này có trị số điểm đẳng điện ở độ pH nằm trong khoảng từ 4,25 đến 5,85 và cấu trúc bậc ba liên quan đến glycosyl hóa khác với cấu trúc của NeuroEPO mang lại cho chúng tác dụng trong các cơ chế bảo vệ thần kinh và phục hồi thần kinh ở cả *in vitro* và *in vivo*.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Theo một phương án, mục đích của sáng chế là đề xuất dược phẩm, đặc trưng ở chỗ dược phẩm này chứa hoạt chất rhEPO có cấu hình chất đồng phân có điểm đẳng điện nằm trong khoảng từ 4,25 đến 5,85. RhEPO này có tính không đồng nhất vi mô của N-glycan fucosyl hóa được tạo thành bởi các cấu trúc hai, ba và bốn anten, có gốc axit sialic mono và bi sialyl hóa có mặt với lượng nằm trong khoảng từ 40-60% glycan tổng số, cấu trúc trisialyl hóa có mặt với lượng nằm trong khoảng từ 40-43% và cấu trúc tetrasialyl hóa có mặt với lượng nằm trong khoảng từ 10-13% cũng như tá dược được dụng.

Cụ thể là, vị trí O-glycosyl hóa trong serin 126 có 3 sialoform chứa từ 0 đến 2 gốc axit sialic, cấu trúc monosialyl hóa là nhiều nhất và có mặt với lượng nằm trong khoảng từ 78-82% glycan tổng số trong khi đó cấu trúc sialyl hóa này có mặt với lượng nằm trong khoảng từ 6-10% glycan tổng số.

Vị trí N-glycosyl hóa của asparagin 83 chứa:

- cấu trúc hai anten fucosyl hóa chứa từ 1 đến 2 gốc axit sialic, trong đó cấu trúc đã nêu có mặt với lượng nằm trong khoảng từ 8-12% glycan tổng số,
- cấu trúc ba anten fucosyl hóa có từ 1, 2 đến 3 gốc axit sialic, trong đó cấu trúc này có mặt với lượng nằm trong khoảng từ 17-21% glycan tổng số,
- cấu trúc bốn anten fucosyl hóa có từ 1 đến 4 gốc axit sialic, trong đó cấu trúc này có mặt với lượng nằm trong khoảng từ 27-31% glycan tổng số và
- cấu trúc bốn anten fucosyl hóa chứa N-acetylactosamin tít 1 và 2 có từ 1 đến 4 gốc axit sialic, các cấu trúc này có mặt với lượng nằm trong khoảng từ 38-42% glycan tổng số.

Tá được được dùng dùng cho được phẩm được yêu cầu bảo hộ theo sáng chế bao gồm nhưng không giới hạn ở polyme bám dính sinh học như hydroxypropyl methylxenluloza, và chất làm ổn định protein như L-tryptophan, L-leuxin, L-arginin hydroclorua và L-histidin hydroclorua.

Cấu trúc của chất đồng phân rhEPO được mô tả trên đây là một phần đối tượng được phẩm theo sáng chế mang lại cho chúng hiệu quả cao hơn trong các cơ chế bảo vệ thần kinh và phục hồi thần kinh ở cả *in vitro* và *in vivo*.

Theo một phương án khác, mục đích của sáng chế là đề cập đến phương pháp thu nhận rhEPO chưa biến đổi, trong đó quy trình lên men diễn ra trong ST với chế độ phun ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ $34 \pm 2^{\circ}\text{C}$, với môi trường nuôi cấy không chứa protein và độ pH nằm trong khoảng từ 7,2 đến 7,3, môi trường này được bổ sung glutamin cho tới khi đạt được nồng độ cuối cùng nằm trong khoảng từ 8-12mmol/l. Phương pháp này còn bao gồm quy trình tinh chế với bước sắc ký trong đó cột đơn khối được sử dụng làm cột trao đổi anion bằng phối tử amoni bậc bốn Q, dung dịch đệm cân bằng là Tris 20mmol/l, HCl 10mmol/l có độ pH nằm trong khoảng từ 7,9 đến 8,10, có độ dẫn điện nằm trong khoảng từ 1,35-1,65mS/cm và phương pháp này sử dụng đệm rửa giải natri axetat 50mmol/l có độ pH nằm trong khoảng từ 4,3 đến 4,5 và độ dẫn điện nằm trong khoảng từ 2 đến 3,5mS/cm.

Bằng phương pháp được mô tả theo sáng chế, được phẩm có số lượng gia tăng chất đồng phân hàm lượng axit sialic thấp có cấu trúc bậc ba liên quan đến glycosyl

hóa khác với cấu trúc của NeuroEPO, mang lại cho chúng hiệu quả cao hơn trong các cơ chế bảo vệ thần kinh và phục hồi thần kinh ở cả *in vitro* và *in vivo*.

Mục đích khác của sáng chế là sử dụng dược phẩm như được mô tả trong bản mô tả này để điều trị chứng mất trí, đột quỵ, bệnh Parkinson, mất điều hòa, chấn thương sọ não, bệnh tăng nhãn áp, bệnh tự kỷ, bệnh giảm oxy-huyết ở trẻ sơ sinh, bệnh đa xơ cứng, bệnh xơ cứng teo cơ và tổn thương thần kinh do chấn thương, nhiễm độc hoặc bức xạ. Cụ thể là, phương pháp điều trị bằng dược phẩm này cho đối tượng cần điều trị đã được mô tả, trong đó dược phẩm đã nêu được dùng từ một đến ba lần mỗi tuần trong khoảng thời gian từ 6 đến 12 tháng với lượng sử dụng nằm trong khoảng từ 0,1mg đến 4mg trong thể tích 1ml.

Mô tả chi tiết sáng chế

Dược phẩm

Đối tượng rhEPO theo sáng chế, đặc trưng ở chỗ nó có trị số điểm đẳng điện nằm trong khoảng từ 4,25 đến 5,85 và cấu trúc protein bậc hai và bậc ba không liên quan đến glycosyl hóa tương tự như rhEPO, duy trì cấu trúc bậc ba tương tự liên quan đến glycosyl hóa có vị trí O-glycosyl hóa trong Serin 126 và ba vị trí N-glycosyl hóa trong Asparagin 24, 38 và 83. Thành phần hydratcacbon của rhEPO như được mô tả trong bản mô tả này khác với thành phần hydratcacbon từ rhEPO khác. Tính không đồng nhất vi mô của N-glycan fucosyl hóa bao gồm các cấu trúc hai, ba và bốn anten có gốc axit sialic mono và bi sialyl hóa nằm trong khoảng từ 40-60% hydratcacbon tổng số, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 43- 50%, cấu trúc trisialyl hóa nằm trong khoảng từ 40-43% và cấu trúc tetrasialyl hóa nằm trong khoảng từ 10-13% hydratcacbon tổng số.

Cụ thể là, vị trí O-glycosyl hóa trong serin 126 có 3 sialoform chứa từ 0 đến 2 gốc axit sialic, cấu trúc monosialyl hóa là nhiều nhất và có mặt với lượng nằm trong khoảng từ 78-82% glycan tổng số và cấu trúc không sialyl hóa có mặt với lượng nằm trong khoảng từ 6-10% glycan tổng số.

Vị trí N-glycosyl hóa của asparagin 83 chứa:

- cấu trúc hai anten fucosyl hóa chứa từ 1 đến 2 gốc axit sialic, trong đó cấu trúc này có mặt với lượng nằm trong khoảng từ 8-12% glycan tổng số,
- cấu trúc ba anten fucosyl hóa có 1, 2 và 3 gốc axit sialic, trong đó cấu trúc này có mặt với lượng nằm trong khoảng từ 17 đến 21% glycan tổng số,
- cấu trúc bốn anten fucosyl hóa, có từ 1 và 4 gốc axit sialic, trong đó cấu trúc này có mặt với lượng nằm trong khoảng từ 27-31% glycan tổng số và
- cấu trúc bốn anten fucosyl hóa có N-axetylactosamin tít 1 và 2 có từ 1 đến 4 gốc axit sialic, trong đó cấu trúc này nằm trong khoảng từ 38-42% glycan tổng số.

Các thuật ngữ rhEPO, EPO, HS hoặc chất đồng phân đã hyposialyl hóa có tính bazơ được sử dụng thay thế cho nhau trong sáng chế được dùng để chỉ dược phẩm có các đặc tính được mô tả trên đây, cũng thường được gọi là NeuroEPO plus.

Đối tượng dược phẩm theo sáng chế chứa hoạt chất là chất đồng phân của rhEPO đã hyposialyl hóa. Các chất đồng phân đã hyposialyl hóa này thu được bằng quy trình được mô tả theo sáng chế, không bao hàm ý biến đổi rhEPO về mặt hóa học và/hoặc di truyền để thu được chất đồng phân đã nêu. Chất đồng phân rhEPO là một phần hoạt tính của dược phẩm đã nêu, có cấu trúc bậc ba liên quan đến glycosyl hóa khác với cấu trúc của NeuroEPO, mang lại cho chúng hiệu quả cao hơn trong các cơ chế bảo vệ thần kinh và phục hồi thần kinh ở cả *in vitro* và *in vivo*.

Đối tượng dược phẩm theo sáng chế được sử dụng theo đường dùng nhỏ mũi hoặc nhỏ mắt và ở dạng dung dịch có dạng bào chế thành phẩm là thuốc nhỏ mũi, thuốc xịt mũi hoặc thuốc nhỏ mắt. Dược phẩm đã nêu chứa hoạt chất rhEPO đã hyposialyl hóa và các tá dược và/hoặc chất ổn định được dùng tùy chọn.

Các tá dược và/hoặc chất ổn định được dùng không độc đối với các đối tượng dùng chúng ở liều lượng và nồng độ được sử dụng và có thể bao gồm polyme kết dính sinh học như hydroxymethylxenluloza, hydroxypropylxenluloza và metylxenluloza; chất làm ổn định protein như L-tryptophan, L-leuxin, L-arginin hydroclorua và/hoặc L-histidin hydroclorua và muối của nó.

Ứng dụng trị liệu và phương pháp điều trị

Sáng chế đề xuất được phẩm hữu ích trong việc điều trị các rối loạn hệ thần kinh như: bệnh mạch máu não, bệnh tâm thần và bệnh thoái hóa thần kinh. Cụ thể là, các bệnh đã nêu có thể là: chứng mất trí, đột quỵ, bệnh Parkinson, mất điều hòa, chấn thương sọ não, bệnh tăng nhãn áp, bệnh tự kỷ, bệnh giảm oxy-huyết ở trẻ sơ sinh, bệnh đa xơ cứng, bệnh xơ cứng teo cơ một bên và tổn thương thần kinh do chấn thương, nhiễm độc hoặc bức xạ.

Sáng chế còn đề xuất phương pháp bao gồm bước sử dụng rhEPO đã hyposialyl hóa cho đối tượng cần điều trị từ một đến ba lần mỗi tuần trong khoảng thời gian từ 6 đến 12 tháng. Việc sử dụng này sẽ được thực hiện trong mũi (IN), bằng cách nhỏ thuốc từ từ vào niêm mạc. Liều dùng nằm trong khoảng từ 0,1mg-4mg, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 0,5mg-1mg. Lượng dùng tối đa ở mỗi liều là 1ml; 0,5ml cho mỗi lỗ mũi với tổng liều hàng ngày là 3ml. Lượng này có thể được phân phối theo thể tích nhỏ hơn trong khoảng thời gian từ 5-15 phút giữa mỗi lần bôi, tốt hơn là sau mỗi 15 phút.

Phương pháp thu nhận chất đồng phân của rhEPO đã hyposialyl hóa

Phương pháp được yêu cầu bảo hộ trong sáng chế bao gồm các giai đoạn khác nhau và sử dụng các dòng tế bào được mô tả dưới đây:

Dòng tế bào

Dòng tế bào có thể được sử dụng để thực hiện đối tượng phương pháp theo sáng chế tương tự như đã báo cáo nhằm sản xuất rhEPO. Trong số đó, các dòng được sử dụng nhiều nhất là: CHO, COS, BHK, Namalwa, HeLa, Hep3B, HepG2, tốt hơn là sử dụng dòng tế bào CHO cho sáng chế.

Quy trình lên men

Quy trình lên men theo sáng chế được thực hiện bằng cách sử dụng phương pháp ST. Quy trình này bao gồm một số giai đoạn, giai đoạn thứ nhất bao gồm bước rửa đông ống thuốc tiêm từ ngân hàng tế bào đang hoạt động cho đến khi đạt đến nhiệt độ phòng (18-24°C). Sau đó, thực hiện giai đoạn tiếp theo, trong đó cạo lớp tế bào để cô đặc tế bào và khả năng sống của tế bào để đảm bảo cấy chất lên men giống thích hợp với mục đích gia tăng sinh khối.

Khi đạt được mật độ tế bào $\geq 1 \times 10^6$ tế bào/ml, quy trình lên men được bắt đầu với các chế độ hoạt động khác nhau. Các chế độ này có thể là: nuôi cấy theo mẻ, nuôi cấy liên tục lưu giữ hoặc không lưu giữ sinh khối.

Để thu được chất đồng phân hyposialyl hóa, cần đảm bảo nhiệt độ nằm trong khoảng $34 \pm 2^\circ\text{C}$ và độ pH nằm trong khoảng $6,8 \pm 0,4$ trong giai đoạn lên men này.

Tế bào phát triển trong môi trường nuôi cấy không chứa protein cho đến khi đạt được nồng độ cuối cùng của glutamin nằm trong khoảng từ 8-12mmol/l.

Quy trình tinh chế

Quy trình tinh chế rhEPO đã hyposialyl hóa bao gồm các bước sắc ký sau:

Trước hết, thực hiện sắc ký ái lực giả trong phối tử có màu. Mục đích của bước này là thu giữ rhEPO và loại bỏ một phần chất gây nhiễm chính có mặt trong dịch nổi (SN). Sau đó, thực hiện sắc ký lọc gel để biến đổi đệm của protein thành dung dịch sử dụng cho bước sắc ký tiếp theo.

Sau đó, thực hiện sắc ký ái lực giả nhờ chelat kim loại. Bước này nhằm mục đích thu giữ rhEPO và loại bỏ hoàn toàn phần chất gây nhiễm chưa được loại bỏ trong các bước trước của quy trình này. Sắc ký lọc gel lại được thực hiện lần nữa để biến đổi đệm này thành dung dịch sử dụng cho bước sắc ký tiếp theo.

Là giai đoạn quan trọng của quy trình sản xuất nên phương pháp sắc ký trao đổi anion cần được thực hiện với phối tử amoni bậc bốn Q. Cột đơn khối được sử dụng trong bước sắc ký này. Mục đích của bước sắc ký này là tách các chất đồng phân hyposialyl hóa (hoạt tính sinh học) khỏi các chất axit, giữ lại ADN và nồng độ của sản phẩm. Tất cả các bước này đảm bảo rằng thu được các đồng dạng hyposialyl hóa mà không bị nhiễm hoặc lẫn chất đồng phân có tính axit.

Cuối cùng, thực hiện sắc ký lọc gel một lần nữa với mục đích biến đổi chất đệm và cho phép protein này rửa giải ở dạng nguyên liệu thô có hoạt tính.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ kèm theo

Hình 1. Cấu hình chất đồng phân: A) Định nghĩa kiểu cắt của chất đồng phân; B) SN được tạo ra trong môi trường nuôi cấy ở các điều kiện nhiệt độ và độ pH đã được đánh giá.

Hình 2. Tỷ lệ chất đồng phân đã hyposialyl hóa trong môi trường nuôi cấy ở các điều kiện nhiệt độ và độ pH đã được đánh giá.

Hình 3. Tỷ lệ chất đồng phân đã hyposialyl hóa trong từng môi trường nuôi cấy ở các điều kiện đã được đánh giá ở quy mô thử nghiệm.

Hình 4. Cường độ tỷ đối của chất đồng phân có tính axit yếu hơn trong SN.

Hình 5. Ảnh hưởng của giai đoạn biến đổi của độ pH và độ dẫn điện đến khả năng hấp phụ tĩnh ở phối tử amoni bậc bốn Q của chất đồng phân rhEPO: (A) hyposialyl hóa (có tính bazơ), (B) có tính axit.

Hình 6. Đường cong giao thoa A): Chất nền sắc ký "Q SFF", B): Cột đơn khối "CIM QA".

Hình 7. Ảnh hưởng của độ pH của đệm rửa giải đến tính năng của chất đồng phân có tính bazơ và chất đồng phân có tính axit.

Hình 8. Sự phân bố của chất đồng phân của rhEPO đã hyposialyl hóa ở quy mô sản xuất.

Hình 9. Nghiên cứu N-glycan của rhEPO đã hyposialyl hóa bằng phương pháp sắc ký lỏng tương tác ion lưỡng tính-ưa nước kết hợp với khối phổ.

Hình 10. Điện di đồ ion chiết xuất (EIE) của glycoform glycopeptit rhEPO O126 đã hyposialyl hóa đã quan sát được nhờ cắt bằng: a) trypsin và neuraminidaza và b) trypsin.

Hình 11. EIE của các glycoform glycopeptit N83 đã quan sát được nhờ được cắt bằng trypsin và neuraminidaza.

Hình 12. EIE của rhEPO đã hyposialyl hóa các glycoform glycopeptit N83 đã quan sát được nhờ cắt bằng: a) trypsin và neuraminidaza và b) trypsin.

Hình 13: Mô tả sơ lược khả năng sống của tế bào nuôi cấy tế bào hình sao tại thời điểm 24 và 48 giờ sau khi tế bào bị tổn thương bởi 8% dimethylsulfoxit (DMSO) và được xử lý tiếp theo bằng rhEPO đã hyposialyl hóa.

Hình 14. Biểu đồ Kaplan-Meier, khả năng sống trong 7 ngày quan sát.

Hình 15. Tình trạng thần kinh của chuột sau khi nhồi máu 24 giờ.

Hình 16. Ảnh hưởng của việc sử dụng các chất đồng phân rhEPO khác nhau đối với số lượng hồng cầu lưới ở mô hình chuột có hồng cầu bình thường.

Sáng chế được làm rõ thêm bằng các ví dụ và số liệu sau đây. Tuy nhiên, các ví dụ này không được hiểu là giới hạn phạm vi của sáng chế.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1. Ảnh hưởng của độ pH và nhiệt độ lên cấu hình của chất đồng phân rhEPO ở quy mô phòng thí nghiệm.

Từ dòng tế bào CHO đã được biến nạp gen EPO của người, đã thu được ngân hàng tế bào giống đã thích nghi để phát triển ở dạng huyền phù trong môi trường nuôi cấy không chứa protein. Sau 37 thế hệ tương ứng với 25 ngày nuôi cấy, tế bào đã thích nghi hoàn toàn với môi trường nuôi cấy này.

Để đánh giá sự biểu hiện của dòng tế bào này trong ở các điều kiện độ pH và nhiệt độ khác nhau, được thiết kế thử nghiệm trong đó cả hai biến này được kết hợp với nhau. Các điều kiện thử nghiệm được thể hiện trong bảng 1. Độ pH của môi trường nuôi cấy được kiểm soát bằng việc bổ sung 0,5 mol/l natri hydroxit.

Bảng 1. Các điều kiện thực nghiệm nhằm đánh giá ảnh hưởng của các biến độ pH và nhiệt độ lên cấu hình của chất đồng phân rhEPO.

Nồng độ tế bào ban đầu (tế bào/ml)	$0,3 \times 10^6$
Khả năng sống của tế bào(%)	>90
Thời gian nuôi cấy (ngày)	7
Nhiệt độ ủ (°C)	35 37
Thể tích hoạt động (ml)	300
Độ pH	7,2 7,3 7,5

Cấu hình của chất đồng phân của rhEPO tương ứng với các mẫu SN được tạo ra trong các môi trường nuôi cấy ở các điều kiện khác nhau đã đánh giá được xác định bằng cách tập trung điểm đẳng điện. Đã sử dụng hỗn hợp chứa ampholin có độ pH nằm trong khoảng từ 2 đến 5 và từ 3 đến 10, vật liệu tham chiếu bên trong EPOCIM® đã được sử dụng làm đối chứng. Tỷ lệ mật độ của từng chất đồng phân trong các mẫu được phân tích bằng phép đo tỷ trọng, bằng cách sử dụng chương trình *Gene Tools*. Chất đồng phân có trị số độ pH nằm trong khoảng từ 2,80 đến 4,25 được xác định là chất đồng phân có tính axit và các chất có trị số độ pH nằm trong khoảng từ 4,25 đến 6,55 được xác định là chất đồng phân có tính bazơ (Hình 1A).

Hình 1B cho thấy rằng cấu hình chất đồng phân bị ảnh hưởng mạnh bởi nhiệt độ. Bất chấp độ pH, khi các mẫu SN tương ứng với từng điều kiện được so sánh ở nhiệt độ 37°C với đối chứng, đã quan sát thấy 7 chất đồng phân có tính axit. Mặt khác, ở nhiệt độ 35°C, đã quan sát thấy sự mất chất đồng phân có tính axit, sự quan sát này đã được báo cáo ở các điều kiện có độ pH nằm trong khoảng từ 7,2 đến 7,3.

Hình 2 cho thấy rằng ở các điều kiện độ pH nằm trong khoảng từ 7,2 đến 7,3 và nhiệt độ 35°C, tổng số chất đồng phân thu được (100%) là chất đồng phân có tính bazơ.

Ví dụ 2. Ảnh hưởng của độ pH và nhiệt độ đến cấu hình chất đồng phân rhEPO ở quy mô thử nghiệm.

Đã đánh giá tác động của các điều kiện nuôi cấy tốt nhất thu được ở quy mô phòng thí nghiệm (Nhiệt độ 35 °C, độ pH nằm trong khoảng từ 7,2 đến 7,3) trong môi trường được kiểm soát và thuận lợi hơn cho việc nuôi cấy tế bào. Từ ngân hàng tế bào giống đã được mô tả trong ví dụ 1, bốn thiết bị lên men được thiết kế bằng cách sử dụng lò phản ứng sinh học loại ST (Infors-AGCH 4103, Bottmingen) có thể tích hữu ích là 3,5l. Các điều kiện hoạt động được thể hiện trong bảng 2. Khả năng sống ban đầu của tế bào là cao hơn 90% ở tất cả các điều kiện được đánh giá.

Bảng 2. Các điều kiện hoạt động tương ứng với từng thiết bị lên men

Thông số	Điều kiện 1	Điều kiện 2	Điều kiện 3	Điều kiện 4
Xv ban đầu (tế bào/ml)	$0,5 \times 10^6$	$1,76 \times 10^6$	$1,08 \times 10^6$	$2,31 \times 10^6$
Nhiệt độ hoạt động (°C)	37	35	35	37
Độ pH	7,41	7,2	7,3	-
Thể tích hoạt động (L)	1,5	3	3	3
Tổng thời gian nuôi cấy (ngày)	5	7	7	7
Dòng khí (ml/phút)	15	15	15	15
Tốc độ cánh khuấy quay (vòng/phút)	150	150	150	150
Tốc độ pha loãng (vvd)	-	0,3	0,3	0,3

Các mẫu được lấy vào cuối mỗi quy trình lên men và cấu hình chất đồng phân của các mẫu SN được tạo ra trong các mẫu cấy đối với các điều kiện được đánh giá trong lò phản ứng sinh học được xác định bằng các phương pháp tập trung điểm đẳng điện. Sau khi thu được các cấu hình này, chương trình Gene Tools đã được sử dụng và bắt đầu từ hình ảnh tương ứng với gel tập trung điểm đẳng điện, đã xác định độ lớn của từng băng có trong gel và đã đánh giá tỷ lệ chất đồng phân đã hyposialyl hóa đối với từng điều kiện.

Có thể thấy rằng trong Hình 3 ở các điều kiện nuôi cấy 2 và 3 (35 °C, độ pH nằm trong khoảng từ 7,2 đến 7,3), tỷ lệ chất đồng phân đã hyposialyl hóa là cao hơn ở các điều kiện 1 và 4. Các kết quả này chứng minh cho kết quả đạt được quy mô phòng thí nghiệm, tức là, bằng cách thay đổi các điều kiện hoạt động để có độ pH nằm trong khoảng từ 7,2 đến 7,3 và nhiệt độ là 35°C, cấu hình chất đồng phân của rhEPO được biến đổi, đạt được độ lớn lớn hơn ở các điều kiện có trị số độ pH nằm trong khoảng từ 4,25 đến 5,85.

Ví dụ 3. Sự biểu hiện của chất đồng phân rhEPO có tính bazơ được thuận lợi hơn bằng cách gia tăng nồng độ glutamin trong môi trường nuôi cấy,.

Để đánh giá xem liệu sự gia tăng nồng độ glutamin trong môi trường nuôi cấy có ảnh hưởng đến sự gia tăng chất đồng phân đã hyposialyl hóa hay không, đã đánh giá sự biểu hiện của dòng tế bào CHO tạo ra rhEPO. Ngân hàng tế bào giống đã được cho tiếp xúc với các nồng độ glutamin khác nhau trong môi trường nuôi cấy

đã sử dụng, và thích nghi với môi trường nuôi cấy đã thực hiện trong 15 ngày. Đánh giá bắt đầu với nồng độ tế bào ban đầu là $0,5 \times 10^6$ tế bào/ml trong thể tích cuối cùng là 300ml môi trường nuôi cấy, bằng cách sử dụng chai xoay được giữ trong tủ ấm 37°C với tốc độ khuấy là 600 vòng/phút. Nồng độ glutamin cuối cùng trong môi trường nuôi cấy là: 8, 12 và 16mmol/l và môi trường nuôi cấy chứa 6mmol/l của glutamin đã được sử dụng làm đối chứng.

Cường độ tỷ đối của chất đồng phân đã hyposialyl hóa trong SN của các mẫu cấy đã được đánh giá bằng phương pháp đo tỷ trọng sau bảy ngày xử lý bằng glutamin ở các nồng độ khác nhau.

Hình 4 cho thấy rằng với mỗi biến thể trong số ba biến thể được đánh giá, đã thu được tỷ lệ chất đồng phân đã hyposialyl hóa cao hơn đối với đối chứng, do đó chứng minh rằng với sự gia tăng nồng độ glutamin trong môi trường nuôi cấy, phương pháp thu nhận chất đồng phân đã hyposialyl hóa trong SN được thuận lợi hơn. Đã quan sát thấy trị số cao nhất của các chất đồng phân này với glutamin 8mmol/l (87%).

Ví dụ 4. Ảnh hưởng của độ pH và độ dẫn điện đến độ hấp phụ của chất đồng phân có tính axit và chất đồng phân có tính bazơ mạnh trong cột trao đổi amoni bậc bốn Q ở quy mô phòng thí nghiệm.

Với mục đích xác định các điều kiện độ pH và độ dẫn điện có lợi cho độ hấp phụ lớn nhất của chất đồng phân có tính axit trong cột trao đổi amoni bậc bốn mạnh Q, đã đánh giá các dung dịch đệm sau đây: 20mmol/l natri phosphat (điaxit khan và monobazơ dihydrat) và Tris 20mmol/l, HCl 10mmol/l. Các dung dịch đệm đã được đánh giá ở các trị số độ pH và độ dẫn điện khác nhau, độ pH nằm trong khoảng từ 6 và 8 và độ dẫn điện nằm trong khoảng từ 1,5 đến 5mS/cm.

Đã quan sát thấy độ hấp phụ lớn nhất của chất đồng phân có tính axit đến bộ trao đổi ion với các điều kiện bao gồm độ pH=6 và độ dẫn điện là 1,50mS/cm. Mặt khác, độ hấp phụ của chất đồng phân hyposialyl hóa (có tính bazơ) đạt cực đại ở độ pH=8 và độ dẫn điện là 1,50mS/cm. Các kết quả được thể hiện trong Hình 5.

Ví dụ 5. Chất nền anion mạnh Q sử dụng phương pháp cột đơn khối có hiệu suất phân tách chất đồng phân rhEPO tốt hơn so với sử dụng kỹ thuật gel sắc ký thông thường ở quy mô phòng thí nghiệm.

Độ hấp phụ động (Q) của mỗi phương pháp đang nghiên cứu được tính toán với hai đường cong giao thoa, bằng cách sử dụng hai trong số tốc độ dòng thẳng được nhà sản xuất khuyến nghị cho mỗi phương pháp là 100cm/giờ và 600cm/giờ đối với kỹ thuật gel sắc ký (Q SFF) và 156cm/giờ và 624cm/giờ đối với phương pháp cột đơn khối (CIM QA). Dung dịch cân bằng được sử dụng cho các thử nghiệm bằng kỹ thuật thông thường và cho kỹ thuật cột nguyên khối là đệm Tris-HCl có độ pH=8 và độ dẫn điện là 1,5mS/cm, theo các kết quả thu được trong ví dụ 4.

Mẫu rhEPO đã được dùng cho các cột và tại đầu ra mà các mẫu được lấy từ đó tại các thời điểm khác nhau. Hàm lượng protein (C) trong mỗi mẫu được xác định bằng phương pháp quang phổ kế. Với các trị số C_{in} đã biết ở mỗi mẫu, đã tính toán được phần protein không bị hấp phụ C/C_0 . Tải trọng, là khối lượng protein được dùng cho cột trên một đơn vị thể tích gel xác định, được tính theo mg rhEPO/ml chất nền Q đã tính toán được theo thời gian.

Trong Hình 6, các trị số C/C_0 so với độ hấp phụ động được biểu diễn bằng đồ thị qua đường cong giao thoa cho phép biết Q của gel trên mỗi phần protein không bị hấp phụ $C/C_0=0,1$ ở tốc độ dòng xác định. Hình 6A thể hiện đường cong giao thoa thu được bằng kỹ thuật gel sắc ký thông thường, trong đó tốc độ dòng thấp nhất là tốc độ có lưu lượng động lớn nhất. Hình 6B cho thấy rằng phương pháp cột đơn khối có độ hấp phụ động tương tự với hai tốc độ dòng thẳng được thử nghiệm, vì vậy cột này có thể hoạt động ở tốc độ dòng cao hơn mà không gặp phải sự thay đổi về độ hấp phụ động của chất nền.

Bảng 3 thể hiện trị số Q thu được bằng các phép đo khác nhau đã được thực hiện.

Bảng 3. Trị số Q thu được bằng từng tốc độ dòng được nghiên cứu trong cột Q SFF và CIM QA.

Cột	Dòng khí (cm/h)	Q (rhEPO/ml gel)
QSFF	100	7,82
	600	5,58
CIM QA	156	8,25
	624	7,79

Khi so sánh các kết quả của nghiên cứu Q được thực hiện trong cột trao đổi ion mạnh trong cột đã được nhồi và cột đơn khối, đã quan sát thấy rằng cả hai phương pháp này đều có Q tương tự nhau ở vận tốc tuyến tính thấp nhất được nghiên cứu. Tuy nhiên, ở vận tốc tuyến tính cao nhất, cột đơn khối này có độ hấp phụ động cao hơn độ hấp phụ động của chất nền sắc ký truyền thống đã đánh giá 1,40 lần. Do đó, có thể kết luận rằng cột đơn khối này cho phép tăng dòng hoạt động của quy trình này mà không ảnh hưởng đến khả năng xử lý khối lượng rhEPO cần tinh chế.

Ví dụ 6. Sự rửa giải của chất đồng phân rhEPO đã hyposialyl hóa trong cột đơn khối ở quy mô phòng thí nghiệm được thuận lợi hơn bằng cách làm giảm độ pH.

Các thử nghiệm được thực hiện bằng cách sử dụng cột Q SFF và CIM QA. Dung dịch cân bằng được sử dụng cho cả hai phương pháp này là đệm Tris-HCl ở độ pH=8 và độ dẫn điện bằng 1,5mS/cm, theo ví dụ 4. Vận tốc tuyến tính làm việc của cột Q SFF là 600cm/giờ và vận tốc tuyến tính làm việc của cột đơn khối là 624cm/h. Sau khi thay đổi đệm thành dung dịch cân bằng được đề cập trên đây, sản phẩm được sử dụng cho các thử nghiệm này là sản phẩm thu được từ cột sắc ký rây phân tử G-25 "Sephadex". Để rửa giải chất đồng phân có tính bazơ, thực hiện một số lần chạy bằng cột trao đổi anion đơn cột bằng cách sử dụng đệm natri axetat 50mmol/l Tween 20 0,01% ở trị số độ pH: 4,41; 4,81; 5,06; 5,20.

Sự thu hồi thu được trong quy trình rửa giải chất đồng phân hyposialyl hóa (có tính bazơ) và chất đồng phân có tính axit trong mỗi lần chạy được thể hiện trong Hình 7. Từ phân tích các kết quả này, đã xác định rằng độ pH của dung dịch đệm

rửa giải chất đồng phân có tính bazơ tăng thì hiệu suất giảm, do đó đệm natri axetat 50mmol/l ở độ pH=4,41 được lựa chọn để rửa giải.

Ví dụ 7. Quy trình thu nhận rhEPO đã hyposialyl hóa ở quy mô sản xuất là thích hợp về sự phân tách chất đồng phân và độ tinh khiết.

Từ ngân hàng tế bào giống đã được mô tả trong ví dụ 1, quy trình lên men đã được thực hiện với khả năng sống ban đầu của tế bào là lớn hơn 90%. Giai đoạn lên men được thực hiện ở nhiệt độ 35°C, trong môi trường nuôi cấy không chứa protein đã được bổ sung glutamin để đạt được nồng độ cuối cùng nằm trong khoảng từ 8mmol/l, độ pH của môi trường nuôi cấy được giữ trong khoảng từ 7,2 đến 7,3.

Sau bốn lần thu hoạch, giai đoạn tinh chế được thực hiện, trong đó cột trao đổi với phối tử bậc bốn Q được sử dụng cho bước quan trọng, bằng cách sử dụng cột đơn khối. Đã sử dụng dung dịch Tris-HCl ở độ pH=8 và độ dẫn điện bằng 1,5mS/cm làm chất đệm cân bằng và đệm natri axetat 50mmol/l có độ pH=4,41 để rửa giải.

Cấu hình chất đồng phân của bốn mẻ nguyên liệu thô hoạt động thu được sau quy trình tinh chế được xác định bằng các phương pháp tập trung điểm đẳng điện. Đã sử dụng hỗn hợp chứa ampholin có độ pH nằm trong khoảng từ 2 đến 5 và từ 3 đến 10, và vật liệu tham chiếu EPOCIM[®] bên trong đã được sử dụng làm đối chứng. Hình 8 thể hiện tính nhất quán trong bước tách chất đồng phân, trong đó cấu hình chất đồng phân được cấu hình bởi sáu chất đồng phân chính được quan sát, trong đó chỉ có hai chất được dùng chung với đối chứng.

Ngoài ra, hàm lượng axit sialic của chất đồng phân đã tinh chế được xác định theo phương pháp xác định phân tử được mô tả trong Dược điển Châu Âu 8.0 (2014) và độ tinh khiết được xác định bằng phương pháp HPLC pha ngược. Bảng 4 thể hiện hàm lượng axit sialic và kết quả độ tinh khiết thu được.

Bảng 4. Hàm lượng axit sialic và kết quả độ tinh khiết của rhEPO đã hyposialyl hóa.

Sản phẩm	Axit sialic (axit sialic mol/mol protein)	RP-HPLC (%)
Mê 1	5,1	96,24
Mê 2	5,5	98,03
Mê 3	6,5	98,38
Mê 4	6,9	98,29

Hàm lượng axit sialic nhỏ hơn 10 mol axit sialic/ phân tử protein và độ tinh khiết lớn hơn 95% trong bốn mẻ, từ đó có thể kết luận rằng quy trình thu nhận rhEPO đã hyposialyl hóa đảm bảo thu nhận chất đồng phân có độ pH nằm trong khoảng từ 4,25 đến 5,85, khác với kết quả đã quan sát ở NeuroEPO.

Ví dụ 8. Cấu trúc bậc ba liên quan đến glycosyl hóa rhEPO đã hyposialyl hóa thể hiện tính không đồng nhất vi mô đặc trưng.

Phân tích glycan

Để nghiên cứu cấu hình N-glycan của nó, rhEPO đã hyposialyl hóa được biến tính và được cắt bằng enzym Peptit N-glycosidaza F (PNGase F). Sau khi N-glycan được giải phóng, chúng được tinh chế bằng cách chiết xuất pha rắn, sử dụng HyperSepHypercab SPE (Mancera-Arteu, M. và đồng tác giả (2016) Anal.Chim.Acta 940: 92–103. Sau đó, chúng được dẫn xuất theo quy trình như được mô tả bởi Giménez và đồng tác giả năm 2015. (Gimenez, E và đồng tác giả (2015) Anal. Chim. Acta, 866: 59–68).

Phương pháp sắc ký lỏng mao quản tương tác ion lưỡng tính-ưa nước kết hợp với khối phổ được thực hiện theo phương pháp được mô tả bởi Mancera-Arteu, M. và đồng tác giả (2016) Anal. Chim. Acta, 940: 92–103.

Hình 9 thể hiện khối phổ của ba glycan được phát hiện trong rhEPO đã hyposialyl hóa. Có thể thấy rằng, glycan 3Ant2SiA1Fuc là nhiều nhất, trong khi đó glycan 4Ant4SiA1Fuc được tìm thấy với số lượng ít.

Bảng 5 thể hiện tỷ lệ diện tích tương đối của glycan theo cấu trúc.

Bảng 5. Tỷ lệ diện tích tương đối của glycan theo cấu trúc.

Glycan	Diện tích (%) **
Cấu trúc hai anten	10,3
Cấu trúc ba anten	17,2
Cấu trúc bốn anten	72,5

Bảng 6 thể hiện glycan được phát hiện với diện tích tương đối tương ứng, khối lượng phân tử thực nghiệm đơn đồng vị (Mexp) và sai số khối lượng. Có thể thấy rằng có một số lượng đáng kể glycan có cấu trúc ít bị sialyl hóa hơn.

Bảng 6. N-glycan được phát hiện trong rhEPO đã hyposialyl hóa bằng phương pháp sắc ký lỏng mao quản tương tác ion lưỡng tính-ưa nước kết hợp với khối phổ.

Glycan		Diện tích	Diện tích (%) *	Diện tích (%) **	Sai số Mexp[Da]
2 Ant	2Ant1SiA1Fuc	608,586	2,91	10,3	2154,8011 9,39
	2Ant2SiA1Fuc	2,321,812	11,31		2445,8983 8,34
3 Ant	3Ant1SiA1Fuc	448,587	2,18	17,2	2519,9309 6,25
	3Ant2SiA1Fuc	1,872,328	8,98		2811,0307 7,25
	3Ant3SiA1Fuc	2,562,955	12,46		3102,1243 6,58
4Ant	4Ant1SiA1Fuc	589,168	2,94	30,1	28885,0669 8,01
	4Ant2SiA1Fuc	2,122,871	10,03		3176,1571 6,09
	4Ant3SiA1Fuc	4,243,325	20,74		3467,2550 5,60
	4Ant4SiA1Fuc	1,575,249	7,80		3758,2975 5,11
4Ant 1LacAc	4Ant1LacNAc 1SiA1Fuc	205,545	1,01	35,0	3250,1917 5,45
	4Ant1LacNAc 2SiA1Fuc	1,506,731	3,67		3541,2889 5,75
	4Ant1LacNAc 3SiA1Fuc	807,621	7,01		3832,3847 3,44
	4Ant1LacNAc 4SiA1Fuc	8,539,613	3,00		4123,4849 4,12
4Ant 2Lac	4Ant2LacNAc 2SiA1Fuc	185,318	0,88	3,32	3906,4126 1,11

Ac	4Ant2LacNAc 3SiA1Fuc	433,265	2,06		4197,4971 5,26
	4Ant2LacNAc 4SiA1Fuc	322,987	1,59		4488,5519 6,33
4Ant 3Lac Ac	4Ant3LacNAc 1SiA1Fuc	68,423	0,32	4,081	3980,5185 24,3
	4Ant3LacNAc 2SiA1Fuc	1,092,708	0,3		4271,4698 16,70
	4Ant3LacNAc 3SiA1Fuc	83,360	0,38		4562,5930 13,0
	4Ant3LacNAc 4SiA1Fuc	95,315	0,43		4853,6515 16,6

* là diện tích tương đối so với glycan tổng số được phát hiện. * * là diện tích tương đối được phân loại theo anten so với glycan tổng số được phát hiện.

Có thể thấy rằng trong bảng 6, glycan có cấu trúc bị sialyl hóa nhiều hơn (bốn phân tử axit sialic) được tìm thấy với tỷ lệ thấp. Thay vào đó, các cấu trúc có phân tử axit sialic chưa được tìm thấy ở các rhEPO khác như 3Ant1SiA1Fuc, 4Ant1SiA1Fuc, 4Ant1LacNAc1SiA1Fuc và 4Ant3LacNAc1SiA1Fuc được phát hiện. Glycan 4Ant3Sia1Fuc có nhiều trong rhEPO đã hyposialyl hóa. Ngoài ra, có thể thấy rằng tỷ lệ diện tích tương đối của anten so với glycan tổng số được phát hiện là khác với rhEPO khác và các cấu trúc có một hoặc hai gốc axit sialic có mặt với lượng lớn hơn 50% diện tích tương đối bởi anten.

Phân tích glycopeptit

Để phát hiện tất cả các glucoform có trong các glycopeptit O₁₂₆ và N₈₃, rhEPO và rhEPO-CRS (sản phẩm tham chiếu được điển) đã được cắt bằng trypsin và neuraminidaza (rhEPO HS-TN). Tất cả các sialoform trong mỗi glucoform được phát hiện đã được đánh giá từ phân tích cắt bằng trypsin (rhEPO HS-T). Mẫu được phân tích bằng phương pháp khối phổ theo quy trình được mô tả bởi Giménez, E. và đồng tác giả (2011) Rapid Commun Mass Spectrom. 25: 2307-2316.

Các Hình 10A và B thể hiện glycoform glycopeptit EIEof O₁₂₆ lần lượt được phát hiện trong các chất phân giải rhEPOHS-TN và HS-T. Trong chất phân giải thứ nhất, đã quan sát thấy một đỉnh tương ứng với đỉnh glycoform O126/0SiA, vì

neuraminidaza tạo ra sự khử sialyl hóa hoàn toàn glycopeptit, sao cho tất cả các sialoform trở thành một glycoform duy nhất. Ngược lại, khi chỉ được cắt bằng trypsin, đã quan sát thấy ba sialoform có 0, 1 và 2 phân tử axit sialic.

Bảng 7 thể hiện sialoform O₁₂₆ được phát hiện với diện tích tương đối, khối lượng phân tử thực nghiệm đơn đồng vị (M_{exp}) và sai số khối lượng tương ứng.

Bảng 7. Các glycoform được phát hiện trong glycopeptit O₁₂₆ của hyposialyl hóa và rhEPO CRS đã được cắt bằng trypsin.

rhEPO-CRS-T				
Glycopeptit O126	Rt [phút]	Diện tích Rel [%]	M _{exp} [Da]	Sai số [ppm]
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
hyposialyl hóa -TEPO				
Glycopeptit O126	Rt [phút]	Diện tích Rel [%]	M _{exp} [Da]	Sai số [ppm]
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

Các kết quả thu được cho thấy rằng sialoform chiếm đa số là sialoform chứa một phân tử axit sialic. Cả hai tỷ lệ diện tích tương đối của chất đồng phân đã sialyl hóa và của các chất đồng phân chỉ có một axit sialic đều cao hơn so với các chất như đã mô tả đối với rhEPO khác, tìm thấy theo tỷ lệ cả hai sialoform khác với CRSrhEPO.

Đối với glycopeptit N83, khi phân tích cắt rhEPO HS-TN, đã phát hiện sáu đỉnh, tương ứng với sáu glycoform khác nhau không chứa axit sialic. Các EIE thu được được thể hiện trong Hình 11 và các glycoform được phát hiện trong bảng 8.

Các kết quả thu được cho thấy rằng ở vị trí N₈₃, các cấu trúc bốn anten khử sialyl hóa phức chiếm tỷ lệ cao hơn.

Bảng 8. Các glycoform của EPOHS-TN glycopeptit N83 đã phát hiện

Glycopeptit ₈₃	R _t [phút]	Diện tích _{rel} [%]	M _{exp} [Da]	Sai số [ppm]
2Ant0SiA1Fuc	15,4	17,12	4126,9263	13,0
3Ant0SiA1Fuc	15,7	27,33	4492,0674	13,9
4Ant0SiA1Fuc	15,9	24,30	4857,1996	12,9
4Ant1LacNAc0SiA1Fuc	16,2	12,50	5222,3335	12,3
4Ant2LacNAc0SiA1Fuc	16,4	6,75	5587,3257	13,6
4Ant3LacNAc0SiA1Fuc	15,9	12,0	5952,6219	14,8

Hình 12A cho thấy rằng không có sự phân tách giữa các cấu trúc bốn anten khác nhau trong chất phân giải rhEPOHS-TN. Ngược lại, khi phân tích glycoform sialyl hóa của chất phân giải rhEPOHS-T, quan sát thấy sự phân tách rõ ràng giữa chúng, các chất có ba gốc axit sialic có mật độ lớn hơn (Hình 12B). Các kết quả này phù hợp với các phát hiện từ nghiên cứu glycan.

Bảng 9 thể hiện tất cả các sialoform được phát hiện và diện tích tương đối, khối lượng phân tử thực nghiệm đơn đồng vị (M_{exp}) và sai số khối lượng tương ứng.

Bảng 9. Các glycoform của glycopeptit N₈₃ được phát hiện trong các chất phân giải trypsin và trypsin/neuroaminidaza.

Glycopeptit N ₈₃		Diện tích tham chiếu (%)	Diện tích (%) **	Mexp [Da] Sai số [ppm]
2 Ant	2Ant1SiA1Fuc	2,54	10,47	4417,9833 3,43
	2Ant2SiA1Fuc	7,93		4709,1311 14,3
3Ant	3Ant1SiA1Fuc	9,17	19,56	4783,1079 1,58
	3Ant2SiA1Fuc	7,49		5074,2569 12,1
	3Ant3SiA1Fuc	2,90		5365,3564 12,2
4Ant	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
4Ant 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
4Ant t 2LacAc	4Ant2LacNAc2SiA1Fuc	6,42	17,05	6169,8030 34,1
	4Ant2LacNAc3SiA1Fuc	4,81		6460,6122 11,7
	4Ant2LacNAc4SiA1Fuc	5,82		6751,6217 23,9

Kết quả chứng minh rằng rhEPO đã hyposialyl hóa được đặc trưng ở chỗ, nó có ít cấu trúc được sialyl hóa hơn (ví dụ, 2Ant1SiA1Fuc hoặc 3Ant1SiA1Fuc) khi protein này chỉ được cắt bằng trypsin. Khi tỷ lệ diện tích tương đối của cấu trúc sialyl hóa đơn và đôi được xác nhận, các kết quả cho thấy rằng chúng có mặt với lượng khoảng 60%.

Cấu trúc bốn anten trong glycopeptit N₈₃ được tìm thấy với tỷ lệ phần trăm cao nhất so với các glycoform khác, các cấu trúc có hai gốc axit sialic là các cấu trúc có tỷ lệ lớn nhất.

Ví dụ 9. RhEPO đã hyposialyl hóa có tác dụng phục hồi tế bào hình sao kháng lại độc tính của DMSO đối với tế bào.

Dòng tế bào hình sao PG4 được nuôi cấy trong môi trường Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) có hàm lượng glucoza cao, được bổ sung NaHCO_3 3,7g/l và 10% huyết thanh bê (FBS). Các tế bào này được ủ trong 24 giờ ở nhiệt độ 37°C trong môi trường 5% CO_2 / 95% không khí. Sau thời gian xác định, SN được chiết xuất và các tế bào này được gây tổn thương bằng DMSO 8% và được ủ tiếp trong 24 giờ. Sau đó, loại bỏ SN và bổ sung môi trường nuôi cấy DMEM 2% chứa rhEPO đã hyposialyl hóa với các nồng độ khác nhau (1,25; 2,5; 5 và 10 ng/ml). Tại thời điểm 24 giờ và 48 giờ, bổ sung thuốc thử Alamar Blue, sau đó ủ các tế bào này trong 6 giờ và đọc kết quả ở bước sóng 540/630nm. Tất cả các mẻ nuôi cấy được ủ ở nhiệt độ 37°C trong môi trường 5% CO_2 /95% không khí.

Có thể thấy trong Hình 13, các tế bào có thể phục hồi khả năng sống của chúng trong rhEPO đã hyposialyl hóa ở các nồng độ khác nhau 1,25; 2,5; 5 và 10 ng/ml, điều kiện tốt nhất là rhEPO đã hyposialyl hóa 1,25 ng/ml, chứng tỏ khả năng phục hồi của tế bào hình sao.

Ví dụ 10. RhEPO đã hyposialyl hóa có hoạt tính bảo vệ thần kinh tốt hơn NeuroEPO.

Chuột nhảy từ Mông Cổ đã được sử dụng để phát triển mô hình thiếu máu cục bộ một bên vĩnh viễn theo phương pháp được mô tả bởi Kahn K. trong 1972, (Kahn K. (1972) Minneap 22: 510-515). Sau đó, chuột được chia ngẫu nhiên thành 5 nhóm thử nghiệm:

Nhóm 1: Tá được: 10 μl tá được

Nhóm 2: Được xử lý bằng 0,142mg/kg rhEPO đã hyposialyl hóa

Nhóm 3: Được xử lý bằng 0,0142mg/kg rhEPO đã hyposialyl hóa

Nhóm 4: Được xử lý bằng 0,142mg/kg NeuroEPO

Nhóm 5: Được xử lý bằng 0,0142mg/kg NeuroEPO

Mỗi lần điều trị được thực hiện theo đường truyền, ba lần/ngày trong bốn ngày. Chuột được đánh giá trong 4 ngày điều trị đầu tiên, cũng như trong quá trình hồi phục ở 3 ngày tiếp theo.

Các kết quả thể hiện tỷ lệ chuột sống sót cao hơn đáng kể so với chất màu khi được xử lý bằng rhEPO đã hyposialyl hóa với liều 0,142 và 0,0142mg/kg, trong khi đó chỉ có NeuroEPO chỉ làm giảm tỷ lệ tử vong đáng kể với liều 0,142mg/kg nhưng không làm giảm tỷ lệ tử vong với liều 0,0142mg/kg (Hình 14).

Đánh giá về mặt thần kinh cho thấy tác dụng bảo vệ thần kinh của rhEPO đã hyposialyl hóa (NeuroEPO plus), làm giảm đáng kể các trị số của thang điểm thần kinh ở chuột được xử lý với liều lượng được sử dụng, so với nhóm giả dược và với các nhóm được xử lý bằng NeuroEPO, trong đó kết quả tương tự thu được bằng rhEPO đã hyposialyl hóa chỉ có thể đạt được với liều 0,142mg/kg. (Hình 15). (Kiểm tra thống kê Duncan, mức ý nghĩa $p > 0,05$; mức khác biệt $p > 0,05$).

Ví dụ 11 RhEPO đã hyposialyl hóa không làm tăng số lượng hồng cầu lưới ở mô hình chuột có hồng cầu bình thường.

Chuột cái B6D2F1 được chia ngẫu nhiên thành 6 nhóm thử nghiệm, mỗi nhóm 6 con và được điều trị một liều duy nhất như sau:

Nhóm 1: 0,003mg/ml rhEPO chuẩn làm việc trong thể tích 200 μ l theo đường tiêm dưới da (SC).

Nhóm 2: 0,006mg/ml rhEPO đã hyposialyl hóa trong thể tích 200 μ l theo đường SC.

Nhóm 3: 0,5mg/ml rhEPO đã hyposialyl hóa trong thể tích 200 μ l theo đường truyền.

Nhóm 4: 1mg/ml rhEPO đã hyposialyl hóa trong thể tích 200 μ l theo đường truyền.

Nhóm 5: 2mg/ml rhEPO đã hyposialyl hóa trong thể tích 200 μ l theo đường truyền.

Nhóm 6: Đối chứng, 200 μ L tá dược theo đường SC.

Kết quả số lượng hồng cầu lưới được thể hiện trong Hình 16. Có thể thấy rằng không có sự khác biệt đáng kể giữa chuột trong nhóm đối chứng và chuột trong các nhóm được xử lý bằng rhEPO đã hyposialyl hóa bằng cả hai đường SC và đường

truyền. Số lượng hồng cầu lưới của chuột được xử lý bằng chất rhEPO chuẩn làm việc cao hơn đáng kể so với số lượng hồng cầu lưới của chuột trong nhóm đối chứng và trong nhóm được xử lý bằng rhEPO đã hyposialyl hóa, bằng cả hai đường dùng. (Thử nghiệm Duncan, mức ý nghĩa $p > 0,05$; mức khác biệt $p < 0,05$).

Các kết quả đã chứng minh rằng EPO hyposialyl hóa không làm tăng số lượng hồng cầu lưới, thậm chí ngay cả ở liều cao nhất được thiết lập cho thử nghiệm này, điều này cho thấy rằng EPO hyposialyl hóa không có tác dụng tạo máu.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Dược phẩm, đặc trưng ở chỗ dược phẩm này chứa hoạt chất là erythropoietin tái tổ hợp của người (rhEPO) có trị số điểm đẳng điện nằm trong khoảng từ 4,25 đến 5,85 và độ không đồng nhất vi mô của N-glycan đã fucosylat hóa được hình thành bởi cấu trúc bi, tri và tetra-anten, có các gốc axit sialic đã được mono và bi-sialyl hóa với lượng nằm trong khoảng 40-60% glycan tổng số, gốc axit sialic đã được tri-sialyl hóa với lượng nằm trong khoảng 40-43% glycan tổng số và gốc axit sialic đã được tetra-sialyl hóa với lượng nằm trong khoảng 10-13% glycan tổng số và chế phẩm này còn chứa tá dược được dụng.
2. Dược phẩm theo điểm 1, đặc trưng ở chỗ vị trí O-glycosyl hóa trong serin 126 có 3 sialoform chứa từ 0 đến 2 gốc axit sialic, trong đó cấu trúc monosialyl hóa này là phổ biến nhất và chiếm từ 78-82% glycan tổng số và cấu trúc asialyl hóa chiếm từ 6-10% glycan tổng số.
3. Dược phẩm theo điểm 1, đặc trưng ở chỗ vị trí N-glycosyl hóa của asparagin 83 chứa:
 - Cấu trúc hai anten đã fucosyl hóa chứa từ 1 đến 2 gốc axit sialic, trong đó cấu trúc này có mặt với lượng nằm trong khoảng từ 8-12% glycan tổng số,
 - Cấu trúc ba anten đã fucosyl hóa chứa từ 1, 2 và 3 gốc axit sialic, trong đó cấu trúc này có mặt với lượng nằm trong khoảng từ 17-21% glycan tổng số,
 - Cấu trúc bốn anten đã fucosyl hóa chứa từ 1 và 4 gốc axit sialic, trong đó cấu trúc này có mặt với lượng nằm trong khoảng từ 27-31% glycan tổng số và
 - Cấu trúc bốn anten đã fucosyl hóa chứa N-acetyl lactosamin tít 1 và 2 có từ 1 gốc 4 gốc axit sialic, trong đó cấu trúc này có mặt với lượng nằm trong khoảng từ 38-42% glycan tổng số.
4. Dược phẩm theo điểm 1, đặc trưng ở chỗ tá dược được dụng này là polyme bám dính sinh học và chất ổn định protein.
5. Dược phẩm theo điểm 4, đặc trưng ở chỗ polyme bám dính sinh học này được chọn từ nhóm bao gồm:

- hydroxymethylxenluloza,
- hydroxypropylxenluloza và
- methylxenluloza.

6. Dược phẩm theo điểm 4, đặc trưng ở chỗ chất ổn định protein này được chọn từ nhóm bao gồm:

- L-tryptophan,
- L-leuxin,
- L-arginin hydrocloura và
- L-histidin hydrocloura.

7. Phương pháp thu nhận rhEPO mà không cần biến đổi hóa học và di truyền và trị số điểm đẳng điện nằm trong khoảng từ 4,25 đến 5,85 theo điểm bất kỳ trong số các điểm 1-6, đặc trưng ở chỗ bước lên men được thực hiện trong bể khuấy và bước sắc ký với cột đơn khối làm chất trao đổi anion với phối tử amoni bậc bốn Q được sử dụng trong quá trình tinh chế.

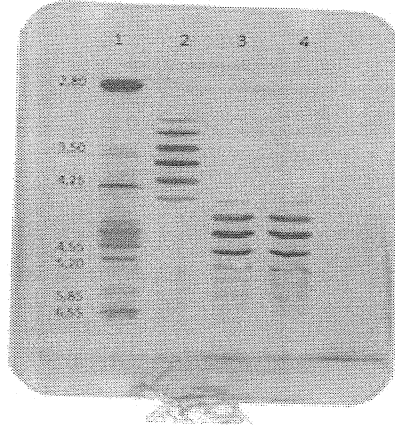
8. Phương pháp theo điểm 7, đặc trưng ở chỗ bước lên men rhEPO được thực hiện trong bể khuấy ở nhiệt độ 35°C và phạm vi độ pH nằm trong khoảng 7,2-7,3, trong môi trường nuôi cấy không chứa protein đã bổ sung glutamin để tạo ra nồng độ cuối cùng nằm trong khoảng từ 8 và 12 mmol/L.

9. Phương pháp theo điểm 7, đặc trưng ở chỗ trong bước tinh chế, dung dịch Tris 20 mmol/L, HCl 10 mmol/L có độ pH=8 và độ dẫn điện bằng 1,5 mS/cm được sử dụng làm đệm cân bằng và dung dịch natri axetat 50 mmol/L có độ pH=4,41 làm đệm rửa giải.

10. Dược phẩm chứa hoạt chất rhEPO đã hyposialyl hóa thu được bằng phương pháp theo các điểm từ 7-9.

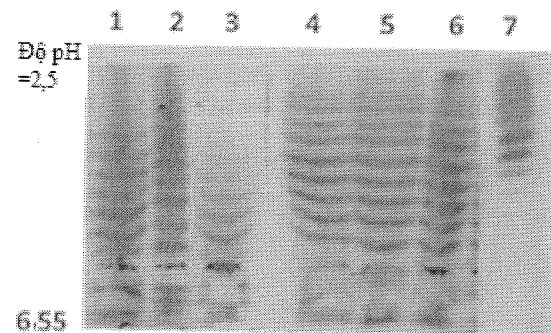
Hình 1

(A)



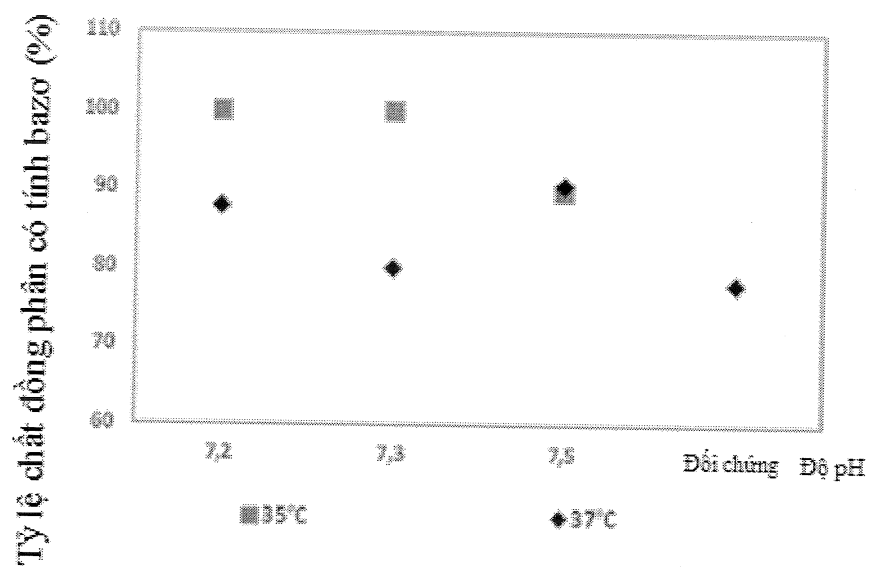
1. IP chuẩn
2. Đối chứng
3. EPO 1 có tính bazơ
4. EPO 2 có tính bazơ

(B)

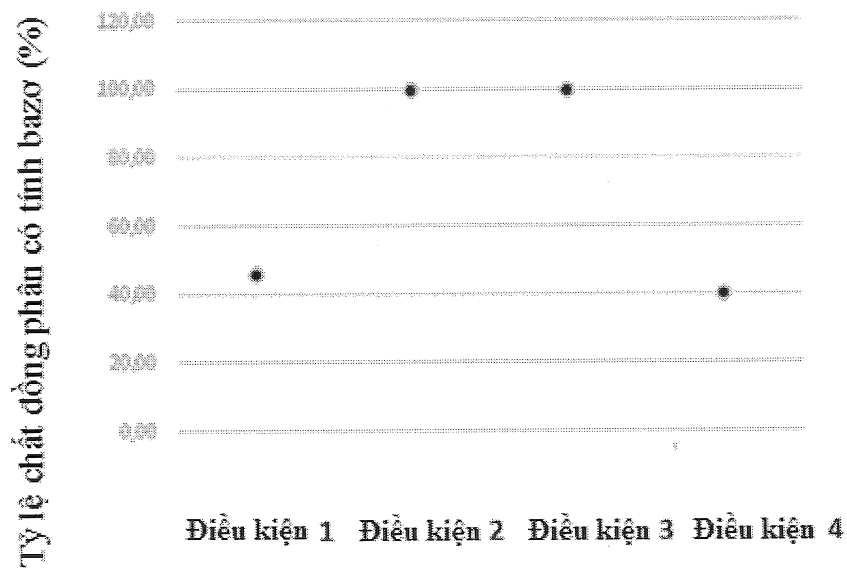


1. 35°C, độ pH=7,5
2. 35°C, độ pH=7,2
3. 35°C, độ pH=7,3
4. 37°C, độ pH=7,3
5. 37°C, độ pH=7,2
6. 37°C, độ pH=7,5
7. Đối chứng

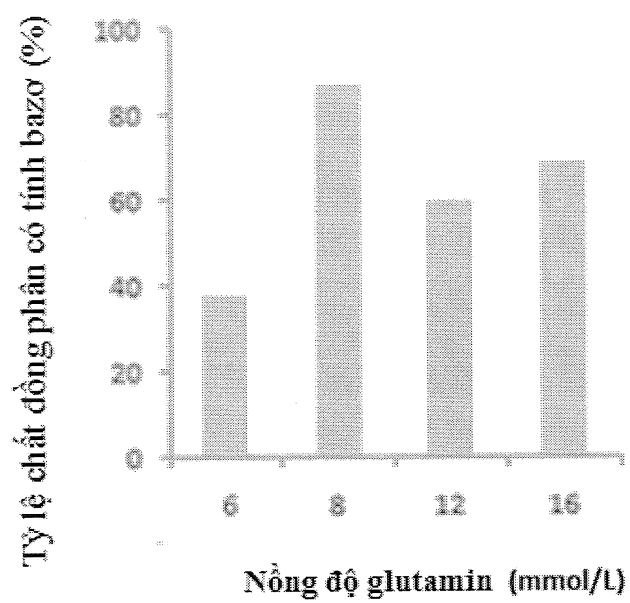
Hình 2



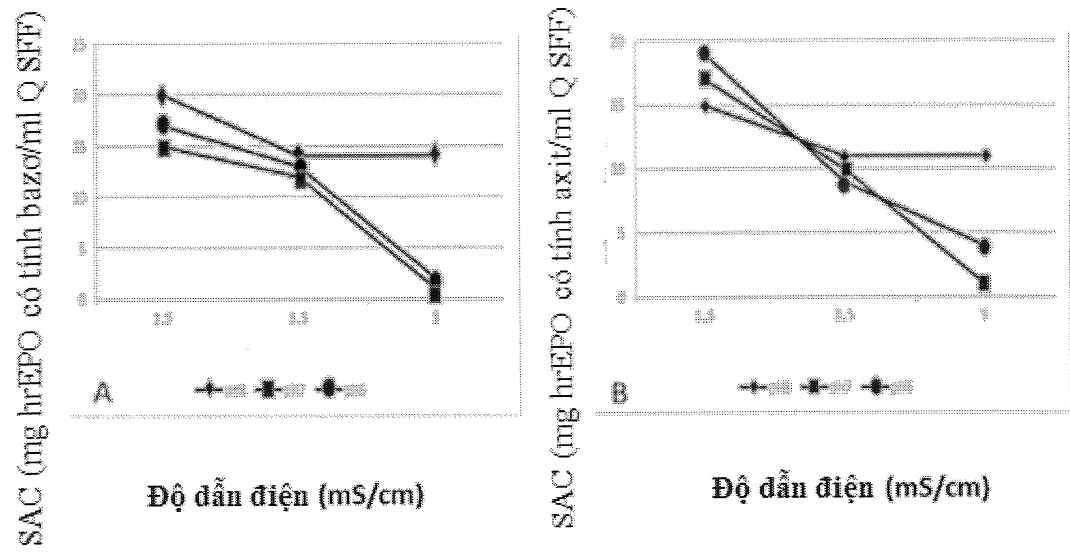
Hình 3



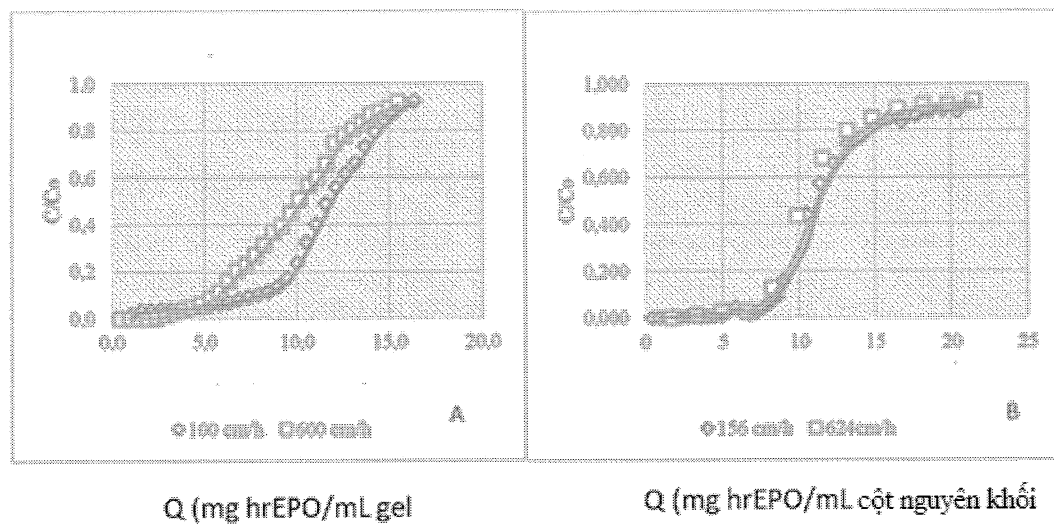
Hình 4



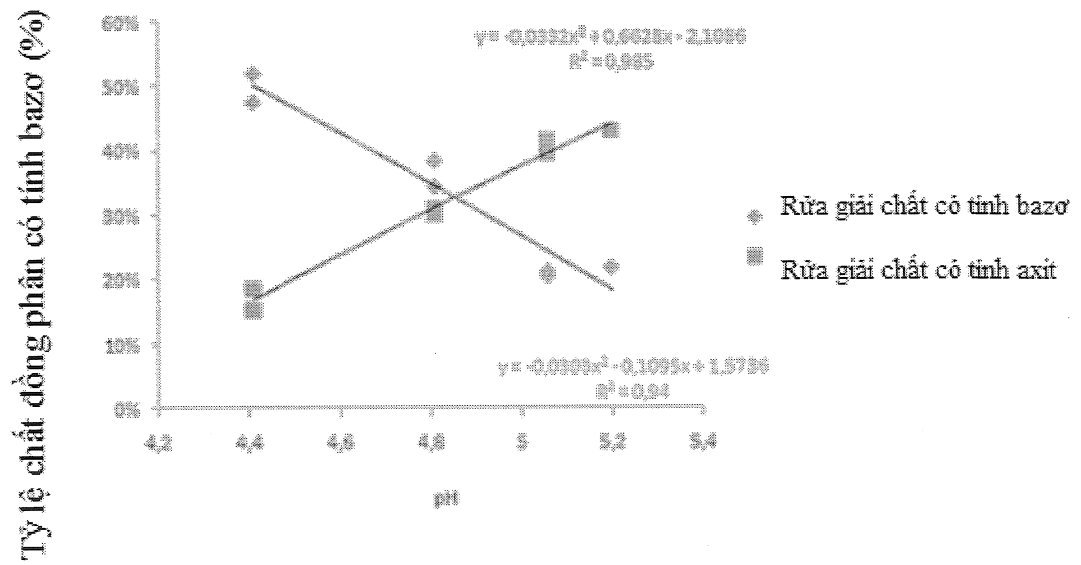
Hình 5



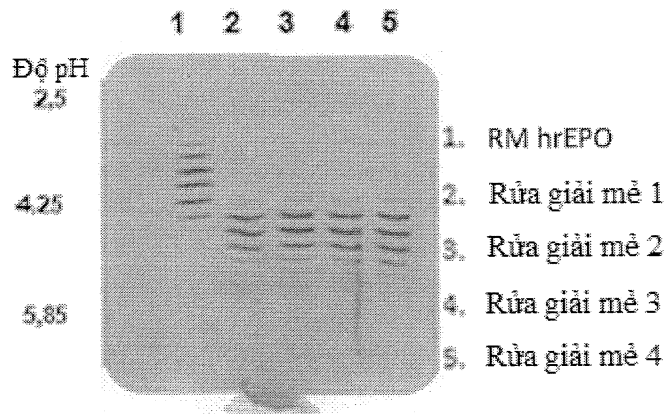
Hình 6



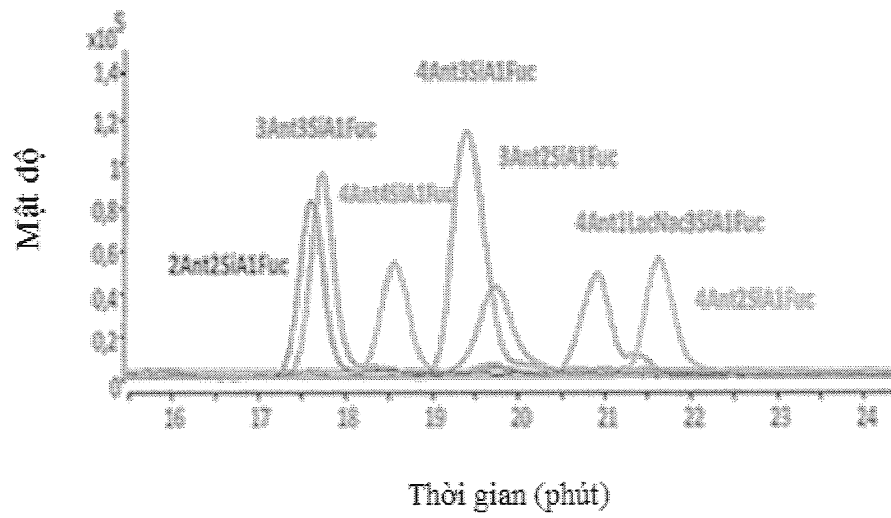
Hình 7



Hình 8

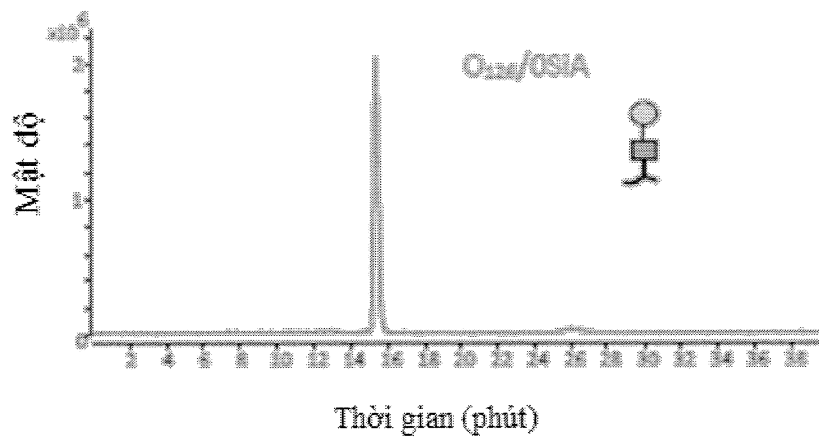


Hình 9



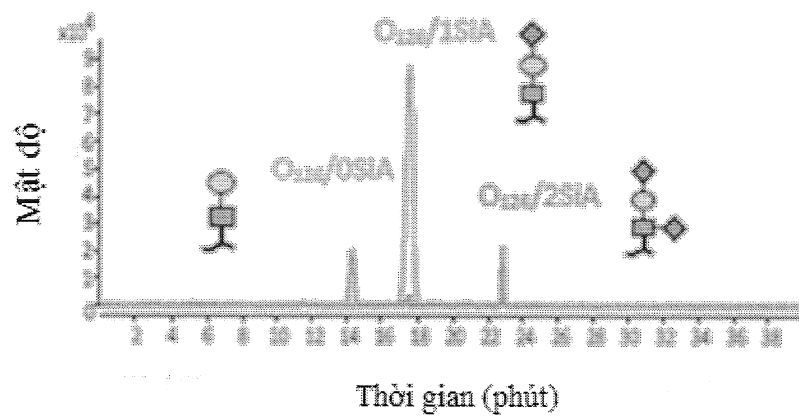
Hình 10

A)

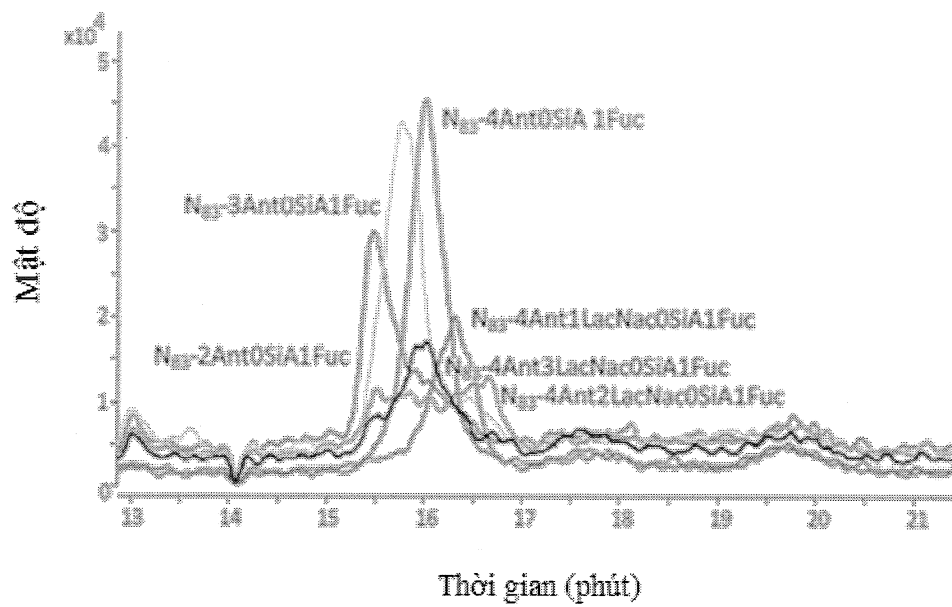


Hình 10

B)

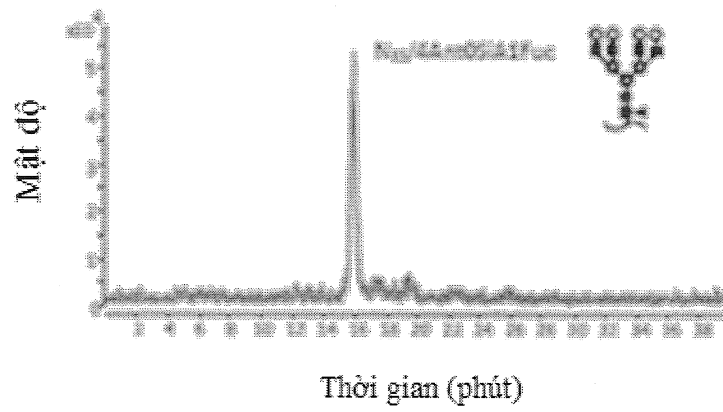


Hình 11

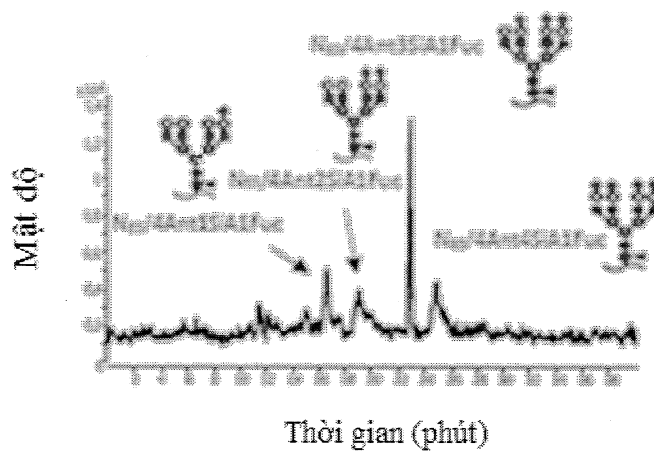


Hình 12

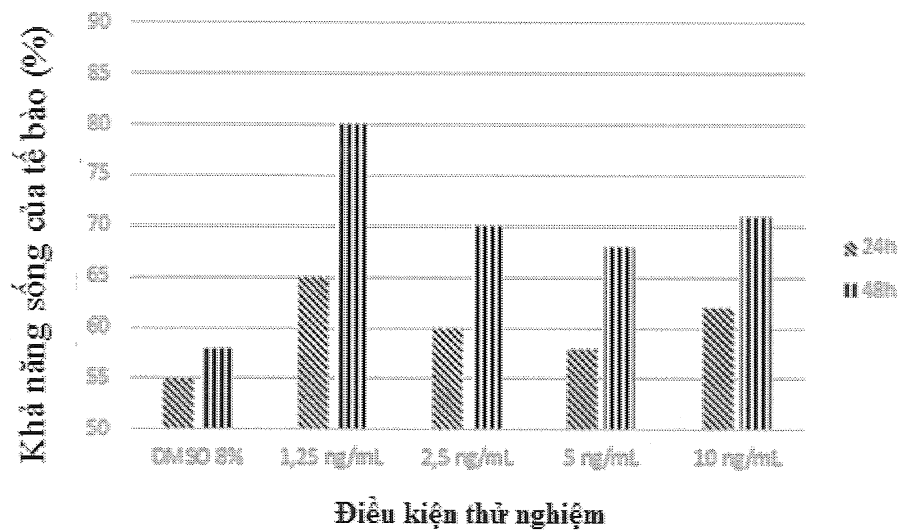
A)



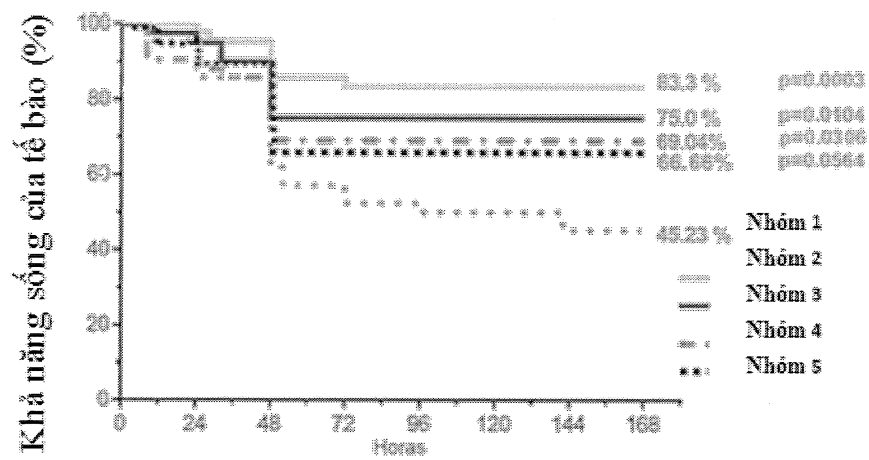
B)



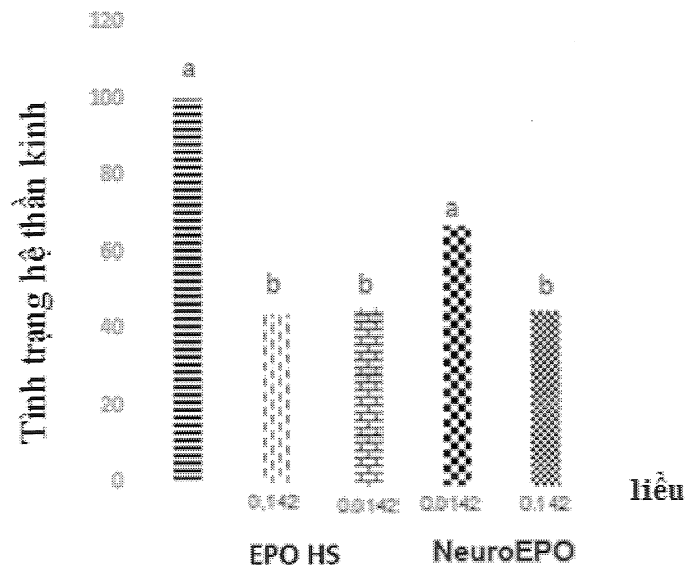
Hình 13



Hình 14



Hình 15



Hình 16

