

### Введение

Настоящее изобретение относится к новому соединению, а также способу получения указанного соединения. Представляющее собой карбамилированный эритропоэтин (СЕРО) новое соединение карбамилировано по всем или большинству первичных аминов лизина и по N-концевой аминокислоте молекулы, и, кроме того, данное соединение имеет низкий уровень карбамилирования первичных аминов других аминокислот в молекуле. Кроме того, данное новое соединение свободно от агрегированных белков и полимеров и приемлемо для применения в фармацевтических композициях для лечения заболеваний, например, центральной и периферической нервной системы и других тканей, экспрессирующих центральный рецептор ЕРО. Одним дополнительным неожиданным преимуществом данного способа получения является тот факт, что способ предоставляет продукт, содержащий меньшее количество агрегированного белка и меньшее количество полимеров, чем продукты, получаемые другими описанными для эритропоэтина известными способами карбамилирования.

### Предпосылки изобретения

Satake, R. et al. (1990) *Biochimica et Biophysica Acta*; 1038: 125-129 и Mun, K.-C. and Golper, T.A. (2000) *Blood Purif.*; 18: 13-17 показали снижение биологической гематopoэтической активности карбамилированным ЕРО. Brines et al. 2003, патентная заявка США 20030072737 показали, что потеря гематopoэтической активности не препятствует тканевым защитным свойствам ЕРО.

Карбамилирование белков широко известно как побочный эффект применения мочевины в очистке белков и как результат высокого уровня мочевины в сыворотке. Карбамилирование вызвано спонтанным разложением мочевины до цианата. Цианат отвечает за карбамилирование первичных аминов белка в N-концевой области и подверженных карбамилированию лизинах белка (фиг. 1). Кроме того, другие возможные подверженные карбамилированию аминокислотные остатки представляют собой аргинин, цистеин, тирозин, аспарагиновая кислота, глутаминовую кислоту и гистидин, однако реакция зависит от pH и не протекает так быстро, как с N-концевым остатком и остатком лизина.

Hörkkö S. et al. (1992) *Kidney International.*; 41: 1175-1181, Plapp, B.V. et al. (1971) *Jour. Biol. Chem.*; 246(4): 939-945, Satake, R. et al. (1990) *Biochimica et Biophysica Acta*; 1038: 125-129 и Mun, K.-C. and Golper, T.A. (2000) *Blood Purif.*; 18: 13-17 провели исследования для того, чтобы выяснить, способно ли карбамилирование белков улучшать или ухудшать биологическую активность белков. Они исследовали биологическое действие карбамилирования белков, используя KCNO в качестве источника цианата. В результате повышенного карбамилирования все они наблюдали снижение или изменение биологической активности. Оценка степени карбамилирования основана на двух аналитических способах:

1. Измерение снижения свободных аминогрупп с применением анализа с тринитробензолсульфоновой кислотой (TNBS) и

2. Аминокислотный анализ, определяющий преобразованные в остатки гомоцитруллина лизины. Hörkkö S. et al. (1992) выполняли карбамилирование липопroteина низкой плотности максимум в течение 6 ч при 37°C 2М KCNO, но не получали полностью карбамилированный белок, применяя анализ с TNBS.

Plapp, B. V. et al. (1971) изучали действие времени и получили почти полностью карбамилированную бычью панкреатическую дезоксирибонуклеазу А после 24-часовой обработки 1М KCNO при 37°C.

Mun, K.-C. and Golper, T.A. (2000) изучали зависимость от времени с максимальным временем реакции 6 ч с применением 2М KCNO. Они также изучали действие повышения концентрации KCNO в течение 6 ч, все реакции проводили при 37°C.

Авторы настоящего изобретения обнаружили, что карбамилирование ЕРО приводит к образованию полимеров и агрегатов, делая его, таким образом, биофармацевтически непригодным. Кроме того, авторы обнаружили, что образование таких полимеров и агрегатов зависит от условий процесса карбамилирования. Следовательно, необходима разработка процесса с оптимальными параметрами, рассматривая pH, время, концентрацию цианата, температуру, белковую концентрацию и наиболее важный параметр - степень полимеризации белка. Настоящее изобретение включает в себя оптимальный процесс карбамилирования с образованием продукта с низкой степенью полимеризации и агрегации, и, кроме того, неожиданно авторы изобретения обнаружили, что получен полностью карбамилированный ЕРО, имея в виду N-концевую аминокислоту и все остатки лизина (последнее происходит в указанном диапазоне pH). Для удаления образовавшихся агрегатов и полимеров выполняли последующую стадию способа по изобретению. Полученный карбамилированный чистый ЕРО представляет собой новое соединение и в настоящей заявке заявлен как таковое, наряду с содержащими данное соединение фармацевтическими композициями.

Ранее проиллюстрировано, что степень карбамилирования зависит от концентрации цианата и времени. Однако не описано, как проводить процесс изменяемого карбамилирования для производства биофармацевтического продукта.

Присутствие агрегатов при недостаточно оптимальном получении связано с индукцией антител. И, следовательно, присутствие агрегатов приводит к неприемлемому для применения у людей биофармацевтическому продукту.

Описанный в настоящем изобретении способ карбамилирования и очистки приводит к получению

белка, характеризуемого как полностью карбамилированный с наименьшей из возможной степенью образования полимеров или агрегатов и с минимальной потерей конечного продукта, что делает его, таким образом, экономически целесообразной стадией.

Кроме того, получение карбамилированного белка предоставляет биофармацевтически приемлемый продукт с исключительно минимальным риском развития иммунологической реакции к белку из-за агрегатов и полимеров.

Кроме аминокислотного анализа, аналитические способы оценки полного карбамилирования представляют собой измерение свободных первичных аминогрупп с применением TNBS и, наконец, определение продукта и расщепленного MALDI-TOF продукта.

Для получения фармацевтических композиций для лечения чувствительных к нейропротективному действию нативного эритропозтина заболеваний можно применять новое соединение по изобретению, представляющее собой эритропозтин, полностью карбамилированный по свободным аминогруппам на N-концевой аминокислоте и лизинах молекулы, и, кроме того, не агрегированный и не полимеризованный в объеме свыше 2,5%, и содержащий минимальное количество избыточно или недостаточно карбамилированного эритропозтина.

### **Сущность изобретения**

Настоящее изобретение относится к масштабируемому способу карбамилирования белка для получения биофармацевтических продуктов. Кроме того, изобретение относится к продукту, полученному указанным способом, к содержащим соединение фармацевтическим композициям и к применению данных композиций.

Описанный в настоящей заявке способ карбамилирования и очистки приводит к получению белка, характеризуемого как полностью карбамилированный с наименьшей из возможной степенью образования полимеров или агрегатов и с минимальной потерей конечного продукта.

Способ карбамилирования оптимизировали к получению карбамилированного белка с наименьшим количеством полимера или агрегатов, что делает его экономически целесообразным способом. Кроме того, конечный продукт содержит ограниченные количества изоформ избыточно и/или недостаточно карбамилированного эритропозтина (менее или более 9 карбамилирований на молекулу). Недостаточно карбамилированный ЕРО содержит менее 9 карбамильных остатков, т.е. карбамилеваны не все из 8 лизинов и N-концевая аминокислота. Недостаточно карбамилированный ЕРО может иметь, например, около 5 карбамильных остатков и, тем не менее, не обладать классической активностью эритропозтина, делая его приемлемым для применения по настоящему изобретению. Избыточно карбамилированный ЕРО имеет более 9 карбамильных остатков и карбамилеван по аминокислотам, отличным от восьми лизиновых остатков и N-концевой аминокислоты. СЕРО может иметь также и 15 карбамильных остатков и, тем не менее, обладать желаемым действием, т.е., отсутствием классической активности эритропозтина. По меньшей мере приблизительно 90%, и наиболее предпочтительно 95% изоформ СЕРО карбамилеваны только по 8 лизиновым остаткам и N-концевому остатку.

Кроме того, получение карбамилированного белка удаляет агрегированный и полимеризованный продукт до максимального уровня 3 или 2,5% и, таким образом, предоставляет биофармацевтически приемлемый продукт с исключительно минимальным риском развития иммунологической реакции к белку из-за агрегатов и полимеров.

Кроме аминокислотного анализа аналитические способы оценки карбамилирования представляют собой измерение свободных первичных аминогрупп с TNBS и определение продукта и расщепленного MALDI-TOF и ЖХ-МС/МС продукта.

### **Подробное описание изобретения**

#### **Способы получения**

Способ карбамилирования белков состоит из 6 стадий:

1. Концентрирование ультрафильтрацией
2. Модифицирование карбамилеванием.
3. Обессоливание гель-фильтрацией
4. Очистка анионообменом.
5. Концентрирование и замена буфера ультра- и диафильтрацией.
6. Фильтрация через фильтр с размером пор 0,22 мкм

По данному способу карбамилирования исходным веществом является эффективно очищенный человеческий ЕРО, но может являться любая форма ЕРО животного или человеческого типа, в качестве не ограничивающего примера ЕРО представляет собой синтетический, рекомбинантный человеческий ЕРО или биологически, или химически модифицированный человеческий ЕРО, как, например, асиало-ЕРО, мутанты человеческого ЕРО, т.е. молекула с включенными в аминокислотную последовательность заменами, фрагменты ЕРО, пептиды ЕРО, другие белки или смесь белков, если желательны карбамилевание нескольких белков.

Первая стадия способа включает в себя подбор концентрации белка ультрафильтрацией, где концентрацию белка подбирают с целью поддержания низкого объема в ходе производства. По предпочтительному варианту осуществления концентрация белка составляет от 0,05-10 или 0,05-8 мг/мл. Более

предпочтительным вариантом осуществления является 0,05-7 мг/мл, а наиболее предпочтительны 2-5 мг/мл. Агрегаты формируются в большей степени, если концентрация увеличена. Ультрафильтрацию выполняют посредством BioMax (Millipore) с нижним пределом молекулярной массы от 5 кДа. Можно применять другие фильтры. Кроме того, посредством добавления стабилизаторов можно подобрать растворимость белка.

После завершения стадии концентрирования белковый раствор смешивают с К-борат тетрагидратом, К-цианатом с pH 7-11 или pH 7-10. По предпочтительному варианту осуществления pH равно 8-10, а наиболее предпочтительно 9,0. Диапазоны температур от 0-60°C или 0 -50°C или от до 40°C или от 0 до менее чем 37°C, но предпочтительный вариант осуществления представляет собой температурный интервал 30-34°C, предпочтительно 32°C, в течение временного интервала 10 мин - 30 суток или 30 мин - 30 суток или 1 ч - 30 суток или 1 ч - 20 суток или 1 ч - 10 суток или 1 ч - 5 суток или 1 ч - 2 суток или 1-26 ч или 18-26 ч или предпочтительно 22-26 ч, наиболее предпочтительно 24 ч. Однако данные предпочтительные интервалы можно менять, если меняют другие параметры процесса, т.е. температуру, концентрацию цианата и концентрацию белка.

При понижении температуры ниже предельной выход низок из-за медленного и неэффективного карбамилрования. При превышении температурных пределов выход низок из-за повышенной агрегации. Еще один критический параметр представляет собой время, так как карбамилрование не будет завершенным, если время укорочено или наблюдают формирование агрегатов, если время увеличено, следовательно, приводя к более низкому выходу.

Следовательно, представляют процесс с согласованными параметрами, т.е., сниженную реакцию карбамилрования можно компенсировать посредством увеличения концентрации цианата и/или времени реакции, если температура понижена. Кроме того, если снижено время реакции, пониженную реакцию карбамилрования можно компенсировать посредством повышения температуры и/или концентрации цианата. Наконец, в способе со сниженной концентрацией цианата, пониженную реакцию карбамилрования можно компенсировать посредством повышения времени реакции и/или температуры.

Следовательно, в заключение необходимо отметить, что одно значимое изменение одного критического параметра (время, температура, концентрация цианата и белковая концентрация) предполагает изменение одного или нескольких из оставшихся критических параметров для того, чтобы получить полностью карбамилрованную молекулу с низким образованием агрегатов и полимеров.

Концентрация боратного буфера может составлять 0,05-2М, но в предпочтительном варианте осуществления 0,1-1М, а наиболее предпочтительно 0,5М из-за существенного гидролиза и полимеризации цианата при поглощении протонов и потери буферной емкости, что приводит к сдвигу pH раствора.

Кроме того, концентрация цианата предпочтительно находится в интервале 0,05-10М, или 0,05-8М, или 0,05-6М, или 0,05-4М, или 0,05-2М, предпочтительным вариантом осуществления является 0,05-1М, а наиболее предпочтительно 0,5М.

Для контроля сдвига pH, вызванного протонным поглощением используемой 0,5М концентрации цианата, необходима 0,5М концентрация боратного буфера. Можно использовать способ с применением других солей цианата и бората. Кроме того, можно применять другие реакционные буферные растворы помимо боратного, например карбонатный буфер или фосфатный буфер.

Обессоливание реакционной смеси белка и цианата выполняют хроматографической гелефильтрацией. Применяют матрицу G-25 Fine (Amersham Biosciences). Время выдержки до нанесения образца на колонку контролируют, и оно не должно превышать 2 ч, поскольку это может вызвать дополнительное карбамилрование и образование полимера. Обессоливание и замену буфера белков можно выполнять диализом, диа-ультрафильтрацией или хроматографической гелефильтрацией. Можно применять другие матрицы гелефильтрации, такие как например, матрицы сшитых полисахаридов или сшитых смешанных полисахаридов, полиакриламид, полистирол или матрицы керамической природы. Кроме того, на этой стадии можно менять высоту колонки.

Для получения продукта с менее 40% агрегатов и полимеров или менее 30%, или менее 25%, или менее 20%, или менее 15%, или менее 12,5%, или менее 10%, или менее 8%, или менее 7% можно стандартизировать стадию карбамилрования.

Удаление агрегатов и полимеров выполняют посредством стадии очистки с применением анионного обмена. Отмечают, что можно отделить карбамилрованный ЕРО от остатков исходного вещества и от агрегатов/полимеров. Разделяющий буфер А представляет собой: 0,3% Трис (25 мМ), 0,3% (50 мМ) NaCl, pH 8,5 ± 0,2, и элюирующий буфер В: 0,3% Трис (25 мМ), 5,8% (1М) NaCl, pH 8,5 ± 0,2. Градиент выполняют с 0-30% более 20 объемов колонки, приводя к желательному разделению. Стадия очистки может приводить к получению продукта с менее 3% агрегатов и полимеров или менее 2,5%, или менее 2%, или менее 1,5%, или менее 1%, или менее чем приблизительно 0,5%.

Элюирование и сбор, и объединение пика карбамилрованного ЕРО влияет на распределение неоднородности, т.е. изоформ, элюированного белка. Другими словами, количества избыточно и недостаточно карбамилрованного СЕРО варьируют в зависимости от способа сбора и объединения. Точное объединение приводит к снижению содержания избыточно и/или недостаточно карбамилрованного эритропоэтина. Увеличение интервала градиента обеспечит выделение более определенного продукта посред-

ством исключения других продуктов.

Композиция карбамилированного ЕРО с менее чем приблизительно 40 мас.% определенных ESI-масс-спектрометрией избыточно и недостаточно карбамилированных изоформ представляет собой один вариант осуществления изобретения. Более предпочтительный вариант осуществления представляет собой СЕРО с менее чем приблизительно 35 мас.% избыточно и недостаточно карбамилированных изоформ, определенных ESI-масс-спектрометрией. Еще более предпочтительный вариант осуществления представляет собой СЕРО с менее чем приблизительно 30 мас.% избыточно и недостаточно карбамилированных изоформ, определенных ESI-масс-спектрометрией. Еще более предпочтительный вариант осуществления представляет собой СЕРО с менее чем приблизительно 25 мас.% избыточно и недостаточно карбамилированных изоформ, определенных ESI-масс-спектрометрией. Еще более предпочтительный вариант осуществления представляет собой СЕРО с менее чем приблизительно 20 мас.% избыточно и недостаточно карбамилированных изоформ, определенных ESI-масс-спектрометрией. Еще более предпочтительный вариант осуществления представляет собой СЕРО с менее чем приблизительно 15 мас.% избыточно и недостаточно карбамилированных изоформ, определенных ESI-масс-спектрометрией. Еще более предпочтительный вариант осуществления представляет собой СЕРО с менее чем приблизительно 10 мас.% избыточно и недостаточно карбамилированных изоформ, определенных ESI-масс-спектрометрией. Еще более предпочтительный вариант осуществления представляет собой СЕРО с менее чем приблизительно 5 мас.% избыточно и недостаточно карбамилированных изоформ, определенных ESI-масс-спектрометрией. Еще более предпочтительный вариант осуществления представляет собой СЕРО с менее чем приблизительно 2 мас.% избыточно и недостаточно карбамилированных изоформ, определенных ESI-масс-спектрометрией. Наиболее предпочтительный вариант осуществления представляет собой СЕРО с менее чем приблизительно 1 мас.% избыточно и недостаточно карбамилированных изоформ, определенных ESI-масс-спектрометрией.

Кроме того, влияние суммарного содержания изоформ, сбор и объединение пика карбамилированного ЕРО оказывает влияние на распределение избыточно карбамилированного СЕРО.

Предпочтительно, чтобы количество определенных ESI-масс-спектрометрией изоформ избыточно карбамилированного СЕРО составляло менее приблизительно 35 мас.%. Еще более предпочтительно, чтобы количество определенных ESI-масс-спектрометрией изоформ избыточно карбамилированного СЕРО составляло менее приблизительно 30 мас.%, а еще более предпочтительно, чтобы количество определенных ESI-масс-спектрометрией изоформ избыточно карбамилированного СЕРО составляло менее приблизительно 25 мас.%, а еще более предпочтительно, чтобы количество определенных ESI-масс-спектрометрией изоформ избыточно карбамилированного СЕРО составляло менее приблизительно 20 мас.%, а еще более предпочтительно, чтобы количество определенных ESI-масс-спектрометрией изоформ избыточно карбамилированного СЕРО составляло менее приблизительно 15 мас.%. Наиболее предпочтительно количество избыточно карбамилированного ЕРО должно составлять не более чем приблизительно 10%, приблизительно 5% или приблизительно 1 мас.% от суммарного СЕРО.

Можно применять другие разделяющие и элюирующие буферы, а также другие анионообменные матрицы. В качестве не ограничивающего примера матрицы представляют собой сшитые полисахариды или сшитые смешанные полисахариды, полиакриламид, полистирол или матрицы керамической природы. Кроме того, для очистки можно равнозначно применять катионообменную, гидрофобную хроматографию, хроматографию с обращенными фазами, аффинную хроматографию и хроматографию с исключением по размеру.

В следующей стадии для подбора концентрации и буфера диа/ультрафильтрацией применяют установку с проточной фильтрацией вдоль потока. Концентрацию карбамилированного ЕРО корректируют до > 0,5 мг/мл и меняют буфер на буферный раствор с 20 мМ цитрата, 100 мМ NaCl. Концентрирование и замену буфера выполняют посредством BioMax (Millipore) с нижним пределом молекулярной массы от 5 кДа. Можно применять другие фильтры.

Наконец, для исключения роста патогенной среды очищенное биофармацевтическое лекарственное вещество фильтруют через фильтр с размером пор 0,22 мкм с применением Millipak (Millipore). Можно применять любой фильтр с размером пор 0,22 мкм.

С применением способа полностью карбамилированного ЕРО получают с менее 3% или предпочтительно менее 2,5% агрегатов, измеренных ВЭЖХ с исключением по размеру. Полное карбамилирование 8 лизиновых остатков подтверждают с применением аминокислотного анализа, определяющего превращенные в гомоцитруллин лизины. Кроме того, после карбамилирования применяют анализ TNBS для определения первичных аминов, доказывая, таким образом, полное карбамилирование лизинов и N-конца.

Кроме того, полное исследование с применением MALDI-TOF определяет изменение в исходной массе обработанного PNGase белка и белка с N-гликанами. Кроме того, MALDI-TOF анализ в области "отпечатка пальцев" пептидных масс/ЖХ-МС/МС анализ показывают, что все 8 лизинов и N-концевая аминокислота карбамилированы. Другие карбамилированные аминокислоты не определяют и не регистрируют модификации гликанов. Кроме того, в конечном продукте получают сниженное количество избыточно и недостаточно карбамилированных форм ЕРО. Данный продукт является новым и заявленным.

Один вариант осуществления изобретения представляет собой композицию, полученную после стадии карбамилирования, но до анионообменной очистки, включающей в себя карбамилированный ЕРО с менее приблизительно 40 мас.% агрегатов и полимеров, или менее приблизительно 30%, или менее приблизительно 25%, или менее приблизительно 20%, или менее приблизительно 15%, или менее приблизительно 12,5%, или менее приблизительно 10%, или менее приблизительно 8%, или менее приблизительно 7% и количество цианата.

Кроме того, один вариант осуществления изобретения представляет собой композиция, полученная после анионообменной очистки, включающая в себя карбамилированный ЕРО с менее приблизительно 3 мас.% агрегатов и полимеров, или менее приблизительно 2,5%, или менее приблизительно 2%, или менее приблизительно 1,5%, или менее приблизительно 1%, или менее приблизительно 0,5%. Кроме того, данная композиция содержит изоформы, состоящие из избыточно или недостаточно карбамилированного ЕРО в количествах менее приблизительно 40 мас.% суммарного карбамилированного ЕРО, или более предпочтительно менее приблизительно 35%, или менее приблизительно 30%, или менее приблизительно 25%, или менее приблизительно 20%, или менее приблизительно 15%, или менее приблизительно 10%, или менее приблизительно 7,5%, или менее приблизительно 5%, или менее приблизительно 2%, и наиболее предпочтительно менее приблизительно 1%. Кроме того, количество избыточно карбамилированного ЕРО в композиции может составлять менее приблизительно 35 мас.% суммарного карбамилированного ЕРО, или более предпочтительно менее приблизительно 30%, или менее приблизительно 25%, или менее приблизительно 20%, или менее приблизительно 15%, или менее приблизительно 10%, или менее приблизительно 7,5%, или менее приблизительно 5%, или менее приблизительно 2%, и наиболее предпочтительно менее приблизительно 1%.

#### **Фармацевтические композиции по изобретению**

Один аспект изобретения представляет собой применение соединений по изобретению для получения фармацевтических композиций для применения у людей или млекопитающих для лечения описанных ниже состояний.

Один вариант осуществления изобретения представляет собой фармацевтическая композиция, содержащая терапевтически эффективное количество карбамилированного ЕРО с менее приблизительно 3 мас.% агрегатов и полимеров, или более предпочтительно менее приблизительно 2,5%, или менее приблизительно 2%, или менее приблизительно 1,5%, или менее приблизительно 1%, и наиболее предпочтительно менее приблизительно 0,5%, и, кроме того, данная композиция включает в себя изоформы, состоящие из избыточно или недостаточно карбамилированного ЕРО в количествах менее приблизительно 40 мас.% суммарного карбамилированного ЕРО, или более предпочтительно менее приблизительно 35%, или менее приблизительно 30%, или менее приблизительно 25%, или менее приблизительно 20%, или менее приблизительно 15%, или менее приблизительно 10%, или менее приблизительно 7,5%, или менее приблизительно 5%, или менее приблизительно 3%, или менее приблизительно 2%, и наиболее предпочтительно менее приблизительно 1%. Кроме того, количество избыточно карбамилированного ЕРО в композиции может составлять менее приблизительно 35 мас.% суммарного карбамилированного ЕРО, или более предпочтительно менее приблизительно 30%, или менее приблизительно 25%, или менее приблизительно 20%, или менее приблизительно 15%, или менее приблизительно 10%, или менее приблизительно 5%, или менее приблизительно 3%, или менее приблизительно 2%, и наиболее предпочтительно менее приблизительно 1%.

При осуществлении первого аспекта настоящего изобретения содержащую соединение по изобретению фармацевтическую композицию, как описано выше, можно вводить млекопитающему любым способом, обеспечивающим необходимый уровень соединения по изобретению в сосудистой системе для обеспечения прохождения сквозь эндотелиально-клеточный барьер и благоприятного действия на восприимчивые клетки. Аналогичные эффекты желательны при использовании с целью перфузии ткани или органа. В случае, когда клетки или ткань не васкуляризованы и/или введение представляет собой промывание клеток или ткани композицией по изобретению, фармацевтическая композиция обеспечивает эффективное для лечения клеток количество соединения по изобретению. Эндотелиально-клеточные барьеры, сквозь которые может проходить соединение по изобретению, включают в себя запирающие зоны, перфорированные соединения, фенестрированные соединения и любые другие представленные у млекопитающего типы эндотелиальных барьеров. В качестве не ограничивающего примера предпочтительным барьером является эндотелиально-клеточное плотное соединение.

Указанное выше соединение по изобретению, как правило, приемлемо для терапевтического или профилактического лечения человеческих заболеваний центральной нервной системы или периферической нервной системы, имеющих, главным образом, неврологические или психиатрические симптомы, глазных заболеваний, сердечно-сосудистых заболеваний, сердечно-легочных заболеваний, респираторных заболеваний, заболеваний почек, заболеваний мочевых путей и заболеваний репродуктивной системы, желудочно-кишечных заболеваний и эндокринных и метаболических нарушений. Конкретно, такие состояния и заболевания включают в себя гипоксические состояния, неблагоприятно воздействующие на возбуждаемые ткани, как, например, возбуждаемые ткани в ткани центральной нервной системы, ткани периферической нервной системы или сердечной ткани или ткани сетчатки, такие как, например, в головном

мозге, сердце или сетчатке/глазу. Таким образом, соединение по изобретению можно применять для лечения или профилактики повреждения возбудимой ткани в результате гипоксических состояний в ряде условий и состояний. В качестве не ограничивающих примеров такие условия и состояния представлены здесь далее в таблице.

В примере защиты от поддающихся лечению по настоящему изобретению патологий нервной ткани, подобные патологии включают в себя состояния, полученные в результате сниженной оксигенации нервных тканей. Любое состояние, снижающее доступ кислорода к нервной ткани, приводящее к стрессу, повреждению и, наконец, гибели нервной клетки, можно лечить способами по настоящему изобретению. Как правило, определяемые как гипоксия и/или ишемия, данные состояния возникают в результате или включают в себя в качестве не ограничивающих примеров инсульт, сосудистую окклюзию, пренатальное или постнатальное кислородное голодание, удушье, удушение, удушье, утопление с угрозой жизни, отравление угарным газом, вдыхание дыма, травму, включая хирургическую и радиотерапию, асфиксию, эпилепсию, гипогликемию, хроническое обструктивное заболевание легких, эмфизему, синдром расстройства дыхания у взрослых, гипотензивный шок, септический шок, анафилактический шок, инсулиновый шок, серповидный кризис, остановку сердца, нарушение ритма, кессонную болезнь и неврологические расстройства, вызванные проведением искусственного кровообращения.

По одному из вариантов осуществления, например, конкретные фармацевтические композиции, содержащие композицию по изобретению, можно вводить для предотвращения травмы или повреждения ткани, возникающего в результате риска травмы или повреждения ткани во время хирургических процедур, таких как, например, резекция опухоли или лечение аневризмы. Другие патологии, вызванные или возникающие в результате гипогликемии, поддающиеся лечению описанными здесь способами, включают в себя передозировку инсулина, также называемую ятрогенной гиперинсулинемией, инсулиному, дефицит соматотропного гормона, гипокортицизм, передозировку лекарственным препаратом и определенные новообразования.

Другие патологии, являющиеся результатом повреждения возбудимой нервной ткани, включают в себя судорожные расстройства, как, например, эпилепсия, конвульсии или хронические судорожные расстройства. Другие поддающиеся лечению состояния и заболевания в качестве не ограничивающих примеров включают в себя заболевания, как, например, инсульт (ишемический инсульт, субарахноидальное кровоизлияние, внутримозговое кровоизлияние), рассеянный склероз, гипотензия, остановка сердца, болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, церебральный паралич, травма головного или спинного мозга, СПИД-деменция, возрастная потеря когнитивной функции, потеря памяти, амиотрофический боковой склероз, судорожные расстройства, алкоголизм, ишемия сетчатки, обусловленное глаукомой повреждение зрительного нерва и потеря нейронов.

Конкретная композиция и способы по настоящему изобретению можно применять для лечения воспаления, обусловленного болезненными состояниями или различными травмами, как, например, физически или химически индуцированное воспаление. Такие травмы могут включать в себя ангиит, хронический бронхит, панкреатит, остеомиелит, ревматический артрит, гломерулонефрит, воспаление зрительного нерва, темпоральный артериит, энцефалит, менингит, поперечный миелит, дерматомиозит, полимиозит, некротический фасциит, гепатит и некротический энтероколит.

Данные демонстрируют, что активированные астроциты могут проявлять цитостатическую роль по отношению к нейронам, продуцируя нейротоксины. Оксид азота, активные формы кислорода и цитокины синтезируются глияльными клетками в ответ на церебральную ишемию (см. Becker, K. J. 2001. Targeting the central nervous system inflammatory response in ischemic stroke. *Curr Opin Neurol* 14:349-353 и Mattson, M. P., Culmsee, C., and Yu, Z. F. 2000. Apoptotic and Antiapoptotic mechanisms in stroke. *Cell Tissue Res* 301: 173-187.). Кроме того, исследования демонстрируют, что в моделях нейродегенерации активация глии и последующая продукция воспалительных цитокинов зависит от первичного нейронного повреждения (см. Viviani, B., Corsini, E., Galli, CL., Padovani, A., Ciusani, E., and Marinovich, M. 2000. Dying neural cells activate glia through the release of a protease product. *Glia* 32: 84-90 и Rabuffetti, M., Scioratti, C., Tarozzo, G., Clementi, E., Manfredi, A.A., and Beltramo, M. 2000. Inhibition of caspase-1-like activity by Ac-Tyr-Val-Ala-Asp-chloromethyl ketone includes long lasting neuroprotection in cerebral ischemia through apoptosis reduction and decrease of proinflammatory cytokines. *J Neurosci* 20: 4398-4404). Воспаление и активация глии присущи различным формам нейродегенеративных расстройств, включающих в себя церебральную ишемию, травму головного мозга и экспериментальный аллергический энцефаломиелит, расстройства, при которых эритропоэтин оказывает нейропротективное действие.

Ингибирование продукции цитокинов эритропоэтином может, по меньшей мере, частично, опосредовать свое защитное действие. Однако в отличие от "классических" противовоспалительных цитокинов, таких как ИЛ-10 и ИЛ-13, ингибирующих непосредственно фактор некроза опухоли, эритропоэтин оказывается активным только при наличии гибели нейрона.

Не желая быть ограниченными любой конкретной теорией, очевидно, что данную противовоспалительную активность можно гипотетически в качестве неограничивающих примеров объяснить несколькими теориями. Во-первых, так как эритропоэтин предотвращает апоптоз, были бы предотвращены вызванные апоптозом воспалительные события. Кроме того, эритропоэтин может предотвращать высвобо-

ждение молекулярных сигналов от гибнущих нейронов, стимулирующих клетки глии или способные действовать непосредственно на клетки глии, снижающие их взаимодействие с данными продуктами. Еще одна возможность состоит в том, что эритропоэтин выявляет более проксимальных участников воспалительного каскада (например, каспаза 1, реакционно-способный кислород или промежуточные соединения азота), запускающих апоптоз и воспаление.

Кроме того, очевидно, что эритропоэтин обеспечивает противовоспалительную защиту без обратного действия, обычно связанного с другими противовоспалительными соединениями, как, например, дексаметазон. Опять не желая быть связанными любой конкретной теорией, однако, очевидно, что это может быть обусловлено действием эритропоэтина на нейротоксины с широким спектром действия, как, например, оксид азота (NO). Хотя в ответ на различные травмы активированные астроциты и микроглия продуцируют нейротоксические количества NO, NO служит для многих целей в организме, включающих в себя модулирование необходимых физиологических функций. Таким образом, хотя применение противовоспалительного средства может ослабить воспаление посредством супрессии NO или других нейротоксинов, если противовоспалительное средство обладает слишком долгим периодом полувыведения, оно также может перекрещиваться с задачами данных химических реагентов в восстановлении повреждения, вызванного приводящей к воспалению травмой. Предполагают, что соединение по настоящему изобретению способно ослаблять воспаление без перекреста с репаративными возможностями нейротоксинов, таких как NO.

Конкретные композиции и способы по изобретению можно применять для лечения состояний и повреждений ткани сетчатки. Такие заболевания в качестве не ограничивающих примеров включают в себя ишемию сетчатки, дистрофию желтого пятна, отслоение сетчатки, пигментную дегенерацию сетчатки, артериосклеротическую ретинопатию, гипертензивную ретинопатию, закупорку артерии сетчатки, закупорку вены сетчатки, гипотензию и диабетическую ретинопатию.

По еще одному из вариантов осуществления способы и принципы по изобретению можно применять для профилактики или лечения повреждений, вызванных лучевым поражением или индуцированным химиотерапией повреждения возбудимой ткани. В качестве не ограничивающего примера для защиты от повреждений, вызванных соединениями, такими как таксаны, цисплатин и другие химиотерапевтические средства, способные индуцировать периферическую нейропатию. Дополнительная польза способов по настоящему изобретению состоит в лечении нейротоксического отравления, как, например, отравление домоевой кислотой моллюска, нейролатиризм и болезнь Гуама, амиотрофический боковой склероз и болезнь Паркинсона.

Как указано выше, настоящее изобретение также относится к способу усиления функции возбудимости ткани у млекопитающего посредством периферического введения соединения по изобретению, как описано выше. Различные заболевания и расстройства поддаются лечению с применением данного способа, и, кроме того, данный способ приемлем для усиления когнитивной функции при отсутствии какого-либо расстройства или заболевания. Такие применения настоящего изобретения описаны в дополнительной части далее и включают в себя улучшение познания и обучаемости у человека и не относящихся к человеку приматов.

Расстройства и заболевания, поддающиеся лечению посредством способов по данному аспекту настоящего изобретения, направленные на центральную нервную систему в качестве не ограничивающих примеров, включают в себя расстройства настроения, тревожные расстройства, депрессию, аутизм, синдром дефицита внимания с гиперактивностью и когнитивную дисфункцию. При данных расстройствах характерно усиление нейронной функции. Другие расстройства, поддающиеся лечению в соответствии с замыслом настоящего изобретения, включают в себя, например, расстройство сна, апноэ во сне и связанные с путешествиями расстройства; субарахноидальные и аневризматические кровотечения, гипотензивный шок, ударное повреждение, септический шок, анафилактический шок и осложнения различных энцефалитов и менингитов, например связанные с заболеванием соединительной ткани энцефалиты, как, например, туберкулез кожи.

Другие применения включают в себя профилактику или защиту от отравления нейротоксинами, как например, отравление домоевой кислотой моллюска, нейролатиризм и болезнь Гуама, амиотрофический боковой склероз, болезнь Паркинсона; послеоперативное лечение эмболии или ишемического повреждения; тотальное облучение головного мозга; серповидный кризис и эклампсия.

Дополнительная группа поддающихся лечению способами по настоящему изобретению расстройств включает в себя митохондриальную дисфункцию наследственной или приобретенной природы, являющуюся причиной ряда неврологических заболеваний, являющихся типичным примером нейронального повреждения и гибели. Например, болезнь Ли (подострая некротическая энцефалопатия) характеризуется прогрессивной потерей зрения и энцефалопатией из-за резкого снижения нейронной функции и миопатии. В этих случаях, дефектный митохондриальный метаболизм не в состоянии восполнять достаточные высокие энергетические субстраты для поддержания метаболизма возбудимых клеток. Модулятор активности рецептора эритропоэтина оптимизирует недостаточную функцию в ряде митохондриальных заболеваний. Как указано выше, гипоксические состояния неблагоприятно действуют на возбудимые ткани. Возбудимые ткани включают в качестве не ограничивающих примеров в себя ткань цен-

тральной нервной системы, ткань периферической нервной системы и сердечную ткань. Кроме описанных выше состояний, способы по настоящему изобретению приемлемы для лечения отравления вдыханием, например, угарного газа и вдыхания дыма, тяжелой астмы, синдрома расстройства дыхания у взрослых, удушья и близкого к смерти от утопления состояния. Дополнительные состояния, создающие гипоксические условия или индуцирующие повреждение возбудимой ткани другими способами, включают в себя гипогликемию, которая может произойти при неадекватном дозировании инсулина или при инсулин-продуцирующих новообразованиях (инсулинома).

Различные нейрофизиологические расстройства, как полагают, возникающие из-за повреждения возбудимой ткани, поддаются лечению посредством срочных процедур. Хронические расстройства, в которые вовлечено нейрональное повреждение и лечение которых обеспечивается по настоящему изобретению, включают в себя связанные с центральной нервной системой и/или периферической нервной системой расстройства, включающие в себя возрастную потерю когнитивной функции и старческое слабоумие, хронические судорожные расстройства, болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, деменцию, потерю памяти, амиотрофический латеральный склероз, рассеянный склероз, туберозный склероз, болезнь Вильсона, церебральный и прогрессирующий надъядерный паралич, болезнь Гоуама, деменцию с тельцами Леви, прионные заболевания, как, например, спонгиозная энцефалопатия, например, болезнь Крейтцфельда-Якоба, болезнь Гентингтона, миотоническую дистрофию, болезнь Шарко-Мари-Тута, атаксию Фридриха и другие атаксии, а также синдром Жилля де ла Туретта, судорожные расстройства, как, например, эпилепсия и хронические судорожные расстройства, инсульт, травму головного или спинного мозга, СПИД-деменцию, алкоголизм, аутизм, ишемию сетчатки, глаукому, расстройства автоматической функции, такие как гипертензия и расстройства сна, и нейropsychиатрические расстройства, в качестве не ограничивающих примеров включающие в себя шизофрению, шизоаффективное расстройство, синдром нарушения внимания с гиперактивностью, дистимическое расстройство, большое депрессивное расстройство, мания, обсессивно-компульсивное расстройство, связанные с применением психоактивных веществ расстройства, беспокойство, паническое расстройство, а также униполярные и биполярные аффективные расстройства. Дополнительные нейropsychиатрические и нейродегенеративные расстройства включают в себя, например, расстройства, указанные в American Psychiatric Association's Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM), самая последняя версия IV, полностью включенная сюда в качестве ссылки.

По еще одному из вариантов осуществления можно применять содержащие соединение по изобретению рекомбинантные химерные молекулы токсинов для терапевтического применения токсинов для лечения пролиферативного заболевания, как, например, злокачественная опухоль, или вирусного заболевания, как например, подострый склерозирующий панэнцефалит.

В табл. 1 в качестве не ограничивающих перечислены дополнительные примеры в отношении различных состояний и заболеваний, поддающихся лечению указанными выше соединениями по изобретению.



Таблица 1

Клетка, ткань или орган	Дисфункция или патология	Расстройство или заболевание	Тип
Сердце	Ишемия	Сердечно-сосудистое заболевание	Острое, хроническое стабильное, нестабильное
		Инфаркт миокарда	Синдром Дресслера
		Стенокардия	
		Врожденный порок сердца	Клапанная кардиомиопатия
		Стенокардия Принцметала	
		Разрыв сердца	Аневризматическое отверстие перегородки
		Ангиит	
	Аритмия	Тахи-, брадиаритмия, патологии наджелудочковой, внутрижелудочковой проводимости	Стабильная, нестабильная гиперчувствительность каротидного синуса
	Застойная сердечная недостаточность	Левосторонняя, правосторонняя, бивентрикулярная, систолическая, диастолическая	Кардиомиопатии, как например, идиопатическая семейная, инфекционная, метаболическая, болезнь накопления, пороки, заболевание соединительной ткани, инфильтрация и гранулемы, нейрососудистая
		Миокардиты	Аутоиммунный, инфекционный, идиопатический
		Легочное сердце	
	Грубая и пенетрирующая травма		
	Токсины	Кокаиновая токсичность	
Сосудистая	Гипертензия	Первичная, вторичная	
	Декомпрессионная болезнь		
	Фиброзно-мышечная гиперплазия		
	Аневризма	Расслаивающая, разрывающая, расширяющая	
Легкие	Обструктивная	Астма, хронический бронхит, эмфизема и дыхательная обструкция	
	Ишемическая болезнь легких	Легочная эмболия, легочный тромбоз, жировая эмболия	

	Вызываемые загрязнением окружающей среды заболевания легких		
	Ишемическая болезнь легких	Легочная эмболия, легочный тромбоз	
	Интерстициальное заболевание легких	Идиопатический легочный фиброз	
	Наследственная	Кистозный фиброз	
	Легочное сердце		
	Травма		
	Пневмония и пневмониты	Инфекционная, паразитарная, токсическая, травматическая, ожоговая, аспирационная	
	Саркоидоз		
Поджелудочная железа	Эндокринная	Сахарный диабет, тип I и II	Отсутствие, дисфункция бета клеток, диабетическая нейропатия
		Другое поражение эндокринных клеток поджелудочной железы	
	Экзокринная	Поражение экзокринной поджелудочной железы	Панкреатит

Костная	Остеопения	Первичная, Вторичная	Гипогонадизм, иммобилизация, постклимактерический, возрастной, гиперпаратиреозидизм, гипертиреозидизм, дефицит кальция, магния, фосфора и/или витамина D
	Остеомиелит		
	Аваскулярный некроз		
	Травма		
	Болезнь Пажета		
Кожа	Алопеция	Локальная, тотальная	Первичная, вторичная, мужчина мужское облысение
	Витилиго	Локальное, генерализованное	Первичное, вторичное
	Диабетическое изъязвление		
	Болезнь периферических сосудов		
	Ожоговые повреждения		
Аутоиммунные расстройства	Красная волчанка, болезнь Шегрена, ревматоидный артрит, гломерулонефрит, ангиит		
	Гистиоцитоз клеток лангерганса		
Глаз	Воспаление зрительного нерва		

	Грубые и пенетрирующие повреждения, инфекции, саркоид, серповидно-клеточное заболевание, отслоение сетчатки, темпоральный артериит		
	Ишемия сетчатки, дистрофия желтого пятна, пигментная дегенерация сетчатки, атеросклеротическая ретинопатия, гипертензивная ретинопатия, закупорка артерии сетчатки, закупорка вены сетчатки, гипотензия, диабетическая ретинопатия и макулярный отек		
Эмбриональные и зародышевые расстройства ЦНС	Асфиксия		
	Ишемия		
	Синдром хронической усталости, острый и хронический гипоосмолярный и гиперосмолярный синдромы, СПИД-деменция, смертельная электротравма		
	Энцефалит	Бешенство, герпес	
	Менингит		

	Субдуральная гематома		
	Пристрастие к никотину		
	Пристрастие к наркотическим веществам и синдром отмены	Кокаин, героин, крэк, марихуана, ЛСД, фенциклидин, полинаркомания, экстази, опиоиды, седативные/успокоительные средства, амфетамины, кофеин	
	Обсессивно-компульсивные расстройства		
	Спинальный стеноз, поперечный миелит, синдром Гийена-Барре, травма, сдавление корешка нерва, опухолевое сдавление, тепловой удар		
ЛОР	Шум в ушах, синдром Меньера, потеря слуха		
	Травматическое повреждение, баротравмы		

Почка	Почечная недостаточность	Острая, хроническая	Сосудистая/ишемическая, коллагеновая болезнь, диабетическое заболевание почек, нефротические синдромы, инфекции, повреждение, контраст-индуцированная, индуцированная химиотерапией, индуцированная экстракорпоральным кровообращением или профилактическая
	Болезнь Шенлейн-Геноха		
Поперечно-полосатая мышца	Аутоиммунные расстройства	Миастения гравис, дерматомиозит, полимиозит	
	Миопатии	Наследственная, метаболическая, эндокринная и токсическая	
	Тепловой удар		
	Повреждение с размождением тканей		
	Рабдомиоз		
	Митохондриальное заболевание		
Половая дисфункция	Инфекция	Некротический фасциит	
	Центральная и периферическая (например, эректильная дисфункция)	Вторичная импотенция в результате лечения, (диабет)	
Печень	Гепатит	Вирусный, бактериальный, паразитический	

	Ишемическая болезнь		
	Цирроз, жировая инфильтрация печени		
	Инфильтрирующие/метаболические заболевания		
ЖКТ	Ишемическая болезнь пищеварительного тракта		
	Воспалительное заболевание пищеварительного тракта		
	Некротический энтероколит		
Трансплантация органа	Лечение донора и реципиента		
Половые пути	Бесплодие	Сосудистое, аутоиммунное, патологии матки, имплантационные нарушения	
Эндокринная	Гландулярная гипер- и гипофункция		

Как указано выше, данные заболевания, расстройства или состояния являются только иллюстрациями ряда преимуществ, обеспечиваемых соединением по изобретению. Соответственно, данное изобретение в целом обеспечивает терапевтическое или профилактическое лечение последствий механической травмы или человеческих заболеваний. Предпочтительно терапевтическое или профилактическое лечение заболеваний, расстройств или состояний ЦНС и/или периферической нервной системы. Представлено терапевтическое или профилактическое лечение заболеваний, расстройств или состояний с психиатрическим компонентом. Представленное терапевтическое или профилактическое лечение заболеваний, расстройств или состояний в качестве не ограничивающих примеров включает в себя заболевания с глазным, сердечно-сосудистым, сердечно-легочным, респираторным, почечным, мочевым, репродуктивным, желудочно-кишечным, эндокринным или метаболическим компонентом.

В одном из вариантов осуществления такую содержащую соединение по изобретению фармацевтическую композицию можно вводить системно для защиты или улучшения состояния клеток-мишеней, ткани или органа. Такое введение может представлять собой парентерально, посредством ингаляции, через слизистую оболочку, например перорально, назально, ректально, интравагинально, сублингвально, подслизистым введением или чрескожно. Предпочтительно парентеральное введение представляет собой, например, внутривенную или интраперитонеальную инъекцию, а также в качестве не ограничивающих примеров включает в себя внутриартериальное, внутримышечное, внутрикожное и подкожное введение.

Для других путей введения, которыми вводят фармацевтическую композицию, как, например, посредством перфузируемой жидкости, инъекции в орган, или другого местного введения, приводит к результату в соответствующих концентрациях соединения по изобретению, как описано выше. Предпочтительная концентрация составляет приблизительно 0,01 nM - 30 nM.

Фармацевтические композиции по изобретению могут включать в себя терапевтически эффективное количество соединения и фармацевтически приемлемый носитель. В конкретном варианте осуществления термин "фармацевтически приемлемый" означает средства, одобренные Федеральным регулирующим органом или правительством штата или перечисленные в американской Фармакопее или другой общепризнанной иностранной фармакопее для применения у животных, а более конкретно, у людей. Термин "носитель" относится к растворителю, адъюванту, наполнителю или носителю, с которым вводят лекарство. Такие фармацевтические носители могут представлять собой стерильные жидкости, как, например, солевые растворы в воде и маслах, включающие в себя масла из нефтепродуктов, животного, растительного или синтетического происхождения, как например, арахисовое масло, соевое масло, минеральное масло, сезамовое масло и т.п. Предпочтительным носителем является физиологический раствор, когда фармацевтическую композицию вводят внутривенно. В качестве жидких носителей, конкретно для инъекционных растворов также можно применять солевые растворы и водный раствор глюкозы, и растворы глицерина. Фармацевтически приемлемые наполнители включают в себя крахмал, глюкозу, лактозу, сахарозу, желатин, солод, рис, муку, мел, силикагель, стеарат натрия, моностеарат глицерина, тальк, хлорид натрия, сухое снятое молоко, глицерин, пропилен, гликоль, воду, этанол и т.п. Если жела-

тельно, композиция также может содержать небольшие количества увлажнителей или эмульгирующих веществ или pH буферных веществ. Данные композиции могут принимать форму растворов, суспензий, эмульсий, таблеток, пилюль, капсул, порошков, составов с замедленным высвобождением и т.п. Композицию можно формулировать как суппозиторий с обычными связывающими веществами и носителями, как, например, триглицериды. Соединения по изобретению можно формулировать как нейтральные или солевые формы. Фармацевтически приемлемые соли включают в себя соли, образованные свободными аминогруппами, как, например, полученные из соляной, фосфорной, уксусной, щавелевой, винной кислот группы и т.д., и группы, образованные свободными карбоксильными группами, как, например, группы, полученные из натрия, калия, аммония, кальция, гидроксидов железа, изопропиламина, триэтиламина, 2-этиламиноэтанола, гистидина, прокаина и т.д. Примеры приемлемых фармацевтических носителей описаны в "Remington's Pharmaceutical Sciences" у E.W. Martin. Такие композиции содержат терапевтически эффективное количество соединения, предпочтительно в очищенной форме, вместе с приемлемым количеством носителя для обеспечения формы для соответствующего введения пациенту. Формулировка должна удовлетворять способу введения.

Приспособленные для перорального введения фармацевтические композиции можно принимать в виде капсул или таблеток; в виде порошков или гранул; в виде растворов, сиропа или суспензий (в водных или неводных жидкостях); в виде съедобных пленок или кремов; или в виде эмульсий. Таблетки или твердые желатиновые капсулы могут содержать лактозу, крахмал или их производные, стеарат магния, сахаросодержащий натрий, целлюлозу, карбонат магния, стеариновую кислоту или их соли. Мягкие желатиновые капсулы могут содержать растительные масла, воски, жиры, полутвердые или жидкие полиолы и т.д. Растворы и сиропы могут содержать воду, полиолы и сахара.

Предназначенное для перорального введения активное вещество можно покрывать или смешивать с веществом, задерживающим распад и/или абсорбцию активного вещества в желудочно-кишечном тракте (например, можно применять глицерилмоностеарат или глицерилдистеарат). Таким образом, можно достичь продолжительного высвобождения активного вещества в течение многих часов, и, если необходимо, активное вещество можно защищать от деградации в желудке. Для облегчения высвобождения активного вещества в конкретном участке желудочно-кишечного тракта фармацевтические композиции для перорального введения можно формулировать с помощью определенного pH или ферментативных условий.

Приспособленные для трансдермального введения фармацевтические композиции можно вводить в виде дискретных частей, предназначенных для сохранения в непосредственном контакте с эпидермисом реципиента в течение длительного промежутка времени. Приспособленные для местного введения фармацевтические композиции можно вводить в виде мазей, кремов, суспензий, лосьонов, порошков, растворов, паст, гелей, спреев, аэрозолей или масел. Для местного применения на коже, рту, глазу или других внешних тканях предпочтительно применять местно мазь или крем. При формулировании в виде мази активный ингредиент можно применять с парафиновой или водорастворимой масляной основой. В качестве альтернативы, активный ингредиент можно формулировать в крем с основой "масло-в-воде" или основой "вода-в-масле". Приспособленные к местному введению в глаз фармацевтические композиции включают в себя глазные капли. В данных композициях активный ингредиент можно растворять или суспендировать в приемлемом носителе, например в водном растворителе. Приспособленные к местному введению в ротовой полости фармацевтические композиции включают в себя таблетки, пастилки и жидкости для полоскания рта.

Приспособленные для назального и легочного введения фармацевтические композиции могут содержать твердые носители, как, например, порошки (предпочтительно с размером частиц в диапазоне от 20 до 500 мкм). Порошки можно вводить сопровождающимся вдохом способом, т.е. посредством быстрого вдыхания носом из поднесенного близко к носу контейнера с порошком. В качестве альтернативы, приспособленные для назального введения композиции могут содержать жидкие носители, например спреи для носа или капли для носа. В качестве альтернативы, ингаляцию непосредственно в легкие можно выполнять посредством глубокой ингаляции или установки загубника в ротоглотку. Данные композиции могут содержать водные или масляные растворы активного ингредиента. Композиции для введения ингаляцией можно поставлять в специально приспособленных устройствах, в качестве не ограничивающих примеров включающих в себя аэрозоли под давлением, распылители или порошковдуватели, которые можно конструировать для введения определенных заранее дозировок активного ингредиента. По предпочтительному варианту осуществления, фармацевтические композиции по изобретению вводят прямо в носовую полость или легкие через носовую полость или ротоглотку.

Приспособленные для ректального введения фармацевтические композиции можно вводить в виде суппозитория или клизм. Приспособленные для вагинального введения фармацевтические композиции можно вводить в виде вагинальных суппозитория, тампонов, кремов, гелей, паст, пен или аэрозольных препаратов.

Приспособленные для парентерального введения фармацевтические композиции включают в себя водные и неводные стерильные инъекционные растворы или суспензии, которые могут содержать антиоксиданты, буферные растворы, бактериостатические вещества и растворы с кровью предполагаемого



реципиента, превращающие композиции, главным образом, в изотонические. Другие компоненты, которые могут присутствовать в таких композициях, включают в себя, например, воду, спирты, полиолы, глицерин и растительные масла. Приспособленные для парентерального введения фармацевтические композиции можно выпускать в однократной дозировке или содержащих многократные дозировки контейнерах, например герметично закрытых ампулах и флаконах, и можно хранить в высушенном сублимацией (лиофилизированном) состоянии, требующем только добавления стерильного жидкого носителя непосредственно перед применением, например, стерильного физиологического раствора для инъекций. Предназначенные для немедленного приема инъекционные растворы и суспензии можно получать из порошков, гранул и таблеток. По одному из вариантов осуществления содержащий инъекционный раствор соединения по изобретению автоинжектор можно использовать для неотложного применения в машинах скорой помощи, пунктах медицинской помощи и в условиях боевых действий, а также для самостоятельного введения в домашних условиях, особенно в случаях возможной травматической ампутации, как, например, неосторожное обращение с газонокосилкой. Вероятность выживания после реплантации клеток и тканей в отрезанной ноге или пальце ноги можно увеличить введением соединения по изобретению в несколько участков в отрезанную часть, как только осуществление этого станет возможным, даже до прибытия медицинского персонала на участок, или доставки пострадавшего индивидуума с отрезанным пальцем ноги в отделение неотложной хирургии.

По предпочтительному варианту осуществления композицию формулируют в соответствии с общепринятыми способами, например, приспособленную для внутривенного введения людям фармацевтическую композицию. Как правило, композиции для внутривенного введения представляют собой растворы в стерильном изотоническом водном буферном растворе. Если необходимо, композиция также может включать в себя растворитель и местный анестетик для снятия боли в участке инъекции, как например, лидокаин. Как правило, ингредиенты комплектуют отдельно или смешивают вместе в стандартную лекарственную форму, например в виде сухого лиофилизированного порошка или безводного концентрата в герметически закрытом контейнере, как например, ампула или пакет-саше с указанием количества активного вещества. При инфузионном введении композицию можно дозировать с помощью содержащего фармацевтически стерильную воду или физиологический раствор инфузионного сосуда. При введении композиции посредством инъекции ампулу со стерильным физиологическим раствором можно приготовить таким образом, чтобы можно было смешать ингредиенты непосредственно перед введением.

Как правило, суппозитории содержат активное вещество в диапазоне от 0,5 до 10 мас.%; пероральные препараты предпочтительно содержат от 10 до 95% активного вещества.

Перфузируемую композицию можно готовить для применения в сосудах для пересаженных органов, для перфузии *in situ* или для введения в сосудистую систему донорского органа перед забором органа. Такие фармацевтические композиции могут содержать не приемлемые для острого или хронического, местного или системного введения индивидууму концентрации соединения по изобретению, но удовлетворяющие функциям, определенным здесь в трупе, сосудах для органа, перфузате для органа, или перфузии *in situ* до удаления или снижения содержащихся там концентраций соединения по изобретению до выведения или возвращения обработанного органа или ткани в системную циркуляцию.

Изобретение также относится к фармацевтической упаковке или набору, содержащему один или несколько заполненных одним или несколькими ингредиентами фармацевтических композиций по изобретению контейнеров. Такой контейнер(ы) необязательно сопровождается уведомлением в форме, установленной государственными органами, контролирующими производство, применение или продажу фармацевтических препаратов или биологических продуктов, в таком уведомлении отражено одобрение организации производства, применения или продажи для введения людям.

По еще одному из вариантов осуществления, например, соединение по изобретению можно выпускать в системе с контролируемым высвобождением. Например, полипептид можно вводить с применением внутривенной инфузии, имплантируемой осмотической помпы, трансдермального пластыря, липосом или других способов введения. По одному из вариантов осуществления можно применять помпу (см. Langer, выше; Sefton, 1987, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14: 201; Buchwald et al., 1980, Surgery 88: 507; Saudek et al., 1989, N. Engl. J. Med. 321: 574). По еще одному из вариантов осуществления соединение можно выпускать в везикуле, конкретно липосоме (см. Langer, Science 249: 1527-1533 (1990); Treat et al., in *Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer*, Lopez-Berestein и Fidler (eds.), Liss, New York, pp. 353-365 (1989); WO 91/04014; патент США № 4704355; Lopez-Berestein, *ibid.*, pp. 317-327; see generally *ibid.*). По еще одному из вариантов осуществления можно применять полимерные материалы (см. *Medical Applications of Controlled Release*, Langer и Wise (eds.), CRC Press: Boca Raton, Florida, 1974; *Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance*, Smolen and Ball (eds.), Wiley: New York (1984); Ranger and Peppas, J. Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem. 23: 61, 1953; также см. Levy et al., 1985, Science 228: 190; During et al., 1989, Ann. Neurol. 25: 351; Howard et al., 1989, J. Neurosurg. 71: 105).

По еще одному из вариантов осуществления систему с контролируемым высвобождением можно помещать близко от терапевтической мишени, т.е. целевых клеток, ткани или органа, требуя, таким образом, только части системной дозы (см., например, Goodson, pp. 115-138 in *Medical Applications of Controlled Release*, vol. 2, supra, 1984). Другие системы с контролируемым высвобождением обсуждают в

обзоре у Langer (1990, Science 249: 1527-1533).

По еще одному из вариантов осуществления соединение по изобретению в виде соответствующей формулировки можно вводить посредством назального, перорального, ректального, вагинального или сублингвального введения.

В конкретном варианте осуществления может быть желательно введение композиций по изобретению местно в нуждающуюся в лечении область; этого можно достичь, в качестве не ограничивающего примера, локальной инфузией во время хирургической операции, местной аппликацией, например в сочетании с обработкой раны после хирургической операции, инъекцией, посредством катетера, при помощи суппозитория или при помощи имплантата, указанный имплантат представляет собой пористый, непористый или гелеобразный материал, включающий в себя мембраны, как, например, силиконовые мембраны или нити.

Выбор предпочтительной эффективной дозы квалифицированный специалист производит на основании рассмотрения нескольких факторов, известных любому специалисту в данной области. Такие факторы включают в себя конкретную форму соединения по изобретению и его фармакокинетические параметры, как, например, биодоступность, метаболизм, период полувыведения и т.д., устанавливаемые во время стандартных процедур разработки, обычно используемых при получении разрешения контролирующего органа для фармацевтического соединения. Дополнительные факторы в обсуждении дозы включают в себя подвергнутое лечению состояние или заболевание, или достижение пользы у нормального индивидуума, массу тела пациента, путь введения, если введение является острым или хроническим, сопутствующие назначения лекарственных средств и другие факторы, хорошо известные для достижения эффекта от введенных фармацевтических веществ. Таким образом, точную дозу следует определять согласно заключению практикующего врача и обстоятельств каждого пациента, например, в зависимости от состояния и иммунного статуса отдельного пациента и в соответствии со стандартными клиническими способами.

По еще одному аспекту настоящего изобретения перфузат или перфузионный раствор предоставляют для перфузии и хранения органов для трансплантации, перфузионный раствор, включающий в себя количество соединения по изобретению, эффективен для защиты чувствительных клеток и ассоциированных клеток, тканей или органов. Трансплантация в качестве не ограничивающего примера включает в себя ксенотрансплантацию, где орган (включая клетки, ткань или другую часть тела) забирают от одного донора и пересаживают в отличающегося реципиента; и аутооттрансплантацию, при которой орган забирают из одной части тела и помещают в другую, включая хирургические процедуры на столе, при которых орган можно удалить, и во время его положения *ex vivo* резецировать, восстановить или обработать иначе, как, например, удаление опухоли, а затем возратить в исходное положение. По одному из вариантов осуществления перфузионный раствор представляет собой раствор the University of Wisconsin (UW) solution (патент США № 4798824), содержащий от приблизительно 1 до приблизительно 25 Ед/мл эритропоэтина, 5% гидроксипропилкрахмала (с молекулярным весом от приблизительно 200000 до приблизительно 300000 и в значительной степени свободный от этиленгликоля, этиленхлоргидрина, хлорида натрия и ацетона); 25 мМ  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 3 мМ глутатиона; 5 мМ аденозина; 10 мМ глюкозы; 10 мМ буферного раствора HEPES; 5 мМ глюконата магния; 1,5 мМ  $\text{CaCl}_2$ ; 105 мМ глюконата натрия; 200000 единиц пенициллина; 40 единиц инсулина; 16 мг дексаметазона; 12 мг фенолового красного; с pH 7,4-7,5 и осмолярностью приблизительно 320 мОсм/л. Раствор применяют для поддержания трупных почек и поджелудочных желез до трансплантации. С применением раствора консервирование можно продолжать свыше 30-часового ограничения, рекомендованного для консервирования трупных почек. Данный конкретный перфузат является всего лишь иллюстративным рядом подобных растворов, которые можно приспособить для настоящего применения включением эффективного количества соединения по изобретению. По дополнительному варианту осуществления перфузионный раствор содержит от приблизительно 0,01 пг/мл до приблизительно 400 нг/мл соединения по изобретению, или приблизительно от 40 приблизительно до 300 нг/мл соединения по изобретению.

Тогда как предпочтительным реципиентом соединения по изобретению во всех целях здесь является человек, применяемые здесь способы одинаковы для всех млекопитающих, конкретно одомашненных животных, домашнего скота, домашних животных и животных зоопарка. Однако изобретение не ограничено таким образом, и преимущества можно применять к любому млекопитающему.

#### **Терапевтические и профилактические применения соединений по изобретению**

Как отмечено далее в примере 1, присутствие рецепторов эритропоэтина в эндотелии капилляров головного мозга человека указывает, что мишени соединений по изобретению присутствуют в головном мозге человека, и что исследования на животных данных соединений по изобретению непосредственно переносятся на лечение или профилактику людей.

По еще одному аспекту изобретения способы и композиции для улучшения жизнеспособности клеток, тканей или органов, не отделенных от сосудистой системы эндотелиально-клеточным барьером, обеспечивают экспонированием клеток, ткани или органов непосредственно с фармацевтической композицией, содержащей соединение по изобретению, или введением, или взаимодействием соединения по изобретению - взаимодействием фармацевтической композиции с сосудистой системой ткани или орга-

на. Усиленная активность восприимчивых клеток в обработанной ткани или органе содействует оказанным положительным эффектам.

Как описано выше, изобретение отчасти основано на открытии, что молекулы эритропоэтина можно транспортировать от люминальной поверхности к поверхности базальной мембраны эндотелиальных клеток капилляров органов с эндотелиально-клеточными плотными контактами, включающими в себя, например, головной мозг, сетчатку и яички. Таким образом, чувствительные клетки поперек барьера являются восприимчивыми мишенями для лечебных воздействий соединения по изобретению, а другие типы клеток или тканей, или органов, содержащих и зависящих полностью или частично от восприимчивых клеток, представляют собой здесь мишени для способов по изобретению. Не желая связываться с любой конкретной теорией, после транцитоза соединения по изобретению, соединение по изобретению может взаимодействовать с рецептором эритропоэтина на чувствительной клетке, например нервной, ретикулярной, мышечной, сердечной, легочной, печеночной, почечной, клетке тонкого кишечника, коры надпочечников, мозгового вещества надпочечника, капиллярного эндотелия, яичек, яичников, поджелудочной железы, костной, клетке кожи или эндодермальной клетке, а связывание рецептора может инициировать сигнальную передачу по каскаду, приводя к активации программы генной экспрессии в чувствительной клетке или ткани, приводя к защите клетки или ткани, или органа от повреждения, как, например, токсинами, химиотерапевтическими веществами, лучевой терапией, гипоксией и т.д. Таким образом, способы защиты содержащей чувствительные клетки ткани от повреждения или гипоксического стресса, и усиление функции такой ткани описаны в подробном описании здесь далее. Как указано выше, способы по изобретению одинаково применимы к людям, а также к другим животным.

По одному из способов одного варианта осуществления изобретения, млекопитающего больного для лечения злокачественной опухоли подвергают системной химиотерапии, включающей в себя лучевую терапию, обычно обладающей побочными эффектами, как, например, поражение нервов, легких, сердца, яичников или яичек. Введение содержащей соединение по изобретению фармацевтической композиции, как описано выше, выполняют перед или во время химиотерапии и/или лучевой терапии для защиты различных тканей и органов от повреждения химиотерапевтическим веществом, например для защиты яичек. Лечение можно продолжать до тех пор, пока циркулирующие концентрации химиотерапевтического вещества снизятся ниже уровня потенциальной опасности в организме млекопитающего.

По одному из способов еще одного варианта осуществления изобретения, различные органы, запланированные для забора от жертвы автомобильной аварии для трансплантации нескольким реципиентам, несколько из которых необходимо транспортировать на продолжительные расстояния и период времени. Перед забором органа жертве вводят содержащую соединение по изобретению фармацевтическую композицию, как здесь описано. Для транспортировки забранные органы перфузируют содержащей соединение по изобретению перфузионной жидкостью, как здесь описано, и хранят в содержащей соединение по изобретению емкости. Определенные органы непрерывно перфузируют пульсирующей перфузией дважды, используя перфузат по настоящему изобретению, содержащий соединение по изобретению. При транспортировке и при имплантации и реперфузии органов *in situ* происходит минимальное повреждение функции органа.

По еще одному из вариантов осуществления изобретения, хирургическое вмешательство для восстановления сердечного клапана требует временной остановки сердца и артериальной окклюзии. Перед хирургической операцией пациенту вводят 4 мкг соединения по изобретению на кг массы тела. Такая обработка предотвращает гипоксическое ишемическое клеточное повреждение, конкретно после реперфузии.

По еще одному из вариантов осуществления изобретения, соединение по изобретению можно применять при любом хирургическом вмешательстве, как, например, операция в условиях искусственного кровообращения. По одному из вариантов осуществления, для защиты головного мозга, сердца и других органов введение содержащей соединение по изобретению фармацевтической композиции, как описано выше, выполняют перед, во время и/или после процедуры искусственного кровообращения.

В указанных выше примерах, в которых соединение по изобретению применяют для аппликаций *ex vivo*, или для обработки чувствительных клеток, как например нервной ткани, ткани сетчатки, сердца, легких, печени, почек, тонкого кишечника, коры надпочечников, мозгового вещества надпочечников, капиллярного эндотелия, яичек, яичников или клеток, или ткани эндометрия, изобретение относится к фармацевтической композиции в стандартной лекарственной форме, приспособленной для защиты или активации чувствительных клеток, тканей или органов, отдаленных от сосудистой системы, содержащей в стандартной дозировке эффективное нетоксичное количество соединения по изобретению и фармацевтически приемлемого носителя в диапазоне от приблизительно 0,01 пг до 5 мг, 1 пг до 5 мг, 500 пг до 5 мг, 1 нг до 5 мг, 500 нг до 5 мг, 1 мкг до 5 мг, 500 мкг до 5 мг, или 1 мг до 5 мг. По предпочтительному варианту осуществления, количество соединения по изобретению находится в диапазоне от приблизительно 1 нг до 5 мг.

По дополнительному аспекту изобретения обнаружили, что введение ЕРО восстанавливает когнитивную функцию у подверженных травме головного мозга животных. Можно предположить, что соединения по изобретению обладают такими же защитными эффектами для клеток, как ЕРО. После 5-

суточной или 30-суточной выдержки ЕРО все еще способен к восстановлению функционирования по сравнению с ложно-обработанными животными, показывая способность ЕРО восстанавливать или воспроизводить активность головного мозга. Таким образом, изобретение также относится к применению соединения по изобретению для получения фармацевтической композиции для лечения травмы головного мозга и других когнитивных дисфункций, включая в себя лечение значительно позже повреждения (например, трех суток, пяти суток, недели, месяца или дольше). Изобретение также относится к способу лечения когнитивной дисфункции после повреждения посредством введения эффективного количества соединения по изобретению. Для данного аспекта изобретения можно применять любое соединение по изобретению, как здесь описано.

Кроме того, данный восстановительный аспект изобретения относится здесь к применению любого из соединений по изобретению для получения фармацевтической композиции для восстановления клеточной, тканевой или органной дисфункции, где лечение начинают после и значительно позже ответственного за дисфункцию исходного повреждения. Кроме того, лечение с применением соединения по изобретению может перекрывать развитие заболевания или состояния во время острой фазы, а также хронической фазы.

В примере, где соединение обладает эритропоэтической активностью, соединение можно вводить системно в дозировке на введение между приблизительно 1 мкг и приблизительно 100 мкг/кг массы тела, предпочтительно приблизительно 5-50 мкг/кг массы тела, наиболее предпочтительно 10-30 мкг/кг массы тела. Данная эффективная доза должна быть достаточной для достижения сывороточных концентраций соединения более чем приблизительно 10000, 15000 или 20000 мЕд/мл сыворотки после введения соединения. Таких сывороточных концентраций можно достичь в течение приблизительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 ч после введения. Такие дозировки можно повторять по мере необходимости. Например, введение можно повторять ежедневно, так длительно, насколько это клинически необходимо, или после соответствующего интервала, например каждые от 1 до 12 недель, но предпочтительно каждые от 1 до 3 недель. Эффективное количество соединения и фармацевтически приемлемый носитель можно фасовать в сосуд с однократной дозой или другой контейнер. Однако, соединение по изобретению не является эритропоэтическим, т.е. оно способно проявлять описанную здесь активность без увеличения концентрации гемоглобина или гематокрита. Такое неэритропоэтическое соединение особенно предпочтительно в примерах, где способы по настоящему изобретению направлены на хроническое применение. По еще одному из вариантов осуществления, соединение по изобретению дают в дозе, большей, чем соответствующая необходимая для максимальной стимуляции эритропоэза доза (мас./мас.) природного эритропоэтина. Как указано выше, соединение по изобретению не обладает эритропоэтической активностью, и следовательно указанные выше дозировки выражают в единицах, только приблизительно соответствующих количествам природного эритропоэтина; здесь выше представлены молярные эквиваленты для дозировок, применимые к любому соединению по изобретению.

### Примеры

Настоящее изобретение можно лучше понять со ссылкой на следующие далее не ограничивающие примеры, представленные в качестве иллюстрации изобретения. Следующие далее примеры представлены для того, чтобы более полно проиллюстрировать предпочтительные варианты осуществления изобретения. Однако их не следует интерпретировать в качестве ограничивающих полноту изобретения.

**Пример 1. Получение карбамилированного эритропоэтина**

Исходное вещество способа в данном примере представляет собой очищенный рекомбинантный человеческий ЕРО.

Первую белковую концентрацию корректируют ультрафильтрацией с целью сохранения небольшого объема реакции.

Белковую концентрацию доводят до 3 мг/мл. Ультрафильтрацию выполняют посредством BioMax (Millipore) с нижним пределом молекулярной массы от 5 кДа.

После завершения стадии концентрирования раствор ЕРО смешивают с 0,5М К-борат тетрагидратом, 0,5М К-цианатом при pH 9,0, раствор инкубируют при 32°C в течение 24 ч.

Обессоливание реакционной смеси ЕРО и цианата выполняют гель-фильтрацией. Белок обессоливают с буферным раствором 25 мМ Трис, 50 мМ NaCl pH 8,5. Применяют смолу G-25 Fine (Amersham Biosciences).

Выполняют загрузку образца приблизительно 20% объема колонки, применяя поток 90 см/ч на колонку высотой приблизительно 15 см.

Обессоленный карбамилированный ЕРО собирают дополнительной обработкой.

На данном этапе содержание полимер/агрегат составляет 7,3%.

Следующая стадия представляет собой удаление агрегатов и полимеров, выполняя стадию очистки с применением анионного обмена. Для очистки применяют смолу SOURCE 30Q (Amersham Biosciences). На колонку используют приблизительно 4,5 мг/мл карбамилированного ЕРО. Разделяющий буфер А представляет собой: 25 мМ Трис, 50 мМ NaCl, pH 8,5, и элюирующий буфер В: 25 мМ Трис, 1 М NaCl, pH 8,5. Градиент выполняют с 0-30% более 20 объемов колонки, собирают и объединяют основной пик карбамилированного ЕРО.

Объединенную фракцию после стадии очистки корректируют до концентрации  $> 0,5$  мг/мл, и меняют буфер на буферный раствор с 20 мМ цитрата, 100 мМ NaCl с применением диа/ультрафильтрации с проточной фильтрацией вдоль потока. Концентрирование и замену буфера выполняют на  $0,1 \text{ м}^2$  BioMax (Millipore) с нижним пределом молекулярной массы от 5 кДа.

Наконец, очищенное биофармацевтическое лекарственное вещество фильтруют через фильтр с размером пор 0,22 мкм с применением Millipak (Millipore) для исключения пророста.

Полученный в результате обработки карбамилированный ЕРО обладает свойствами, определяющими его как приемлемый в качестве биофармацевтического.

Определенное SEC-HPLC содержание полимер/агрегат составляет 0,5%.

Определенные аминокислотным анализом карбамилированные лизины составляют 100%.

Концентрация составляет  $> 0,5$  мг/мл.

Для определения изменения в исходной массе обработанного PNGase белка и белка с N-гликанами выполняют исследование с применением MALDI-TOF. Кроме того, выполняют MALDI-TOF анализ "отпечатка пальцев" пептидных масс/ЖХ-МС/МС, как указано далее:

1. СЕРО и ЕРО очищают на колонке POROS R1 (POROS R1 reverse phase column material, PerSeptive Biosystems (1-1259-06)). До применения колоночный материал хранят в 50% HiPerSolv для HPLC VWR 152525R. Колонку R1 уравнивают и промывают 5% муравьиной кислотой (33015, Riedel de Haën). Образцы элюируют из колонки качественным матричным раствором Agilent MALDI HCCA (G2037A). Исходную массу определяют посредством анализа на приборе Bruker Reflex IV MALDI-TOF.

2. В течение ночи 0,3 пмоль СЕРО и/или ЕРО подвергают обработке 1 единицей PNGase F и PNGase F/O-гликозидазы. Общую массу определяют с применением MALDI-TOF.

3. СЕРО и ЕРО (1,5 пмоль) восстанавливают в растворе 50 мкл 10 мМ DTT, 50 мМ  $\text{NH}_4\text{CO}_3$  с последующим алкилированием в 50 мкл 55 мМ иодацетамида, 50 мМ  $\text{NH}_4\text{CO}_3$ . Перед расщеплением трипсином образцы очищают на колонке POROS R1. Фракцию расщепленного образца очищают на колонке POROS R2 перед анализом MALDI-TOF (POROS 50 R2 PerSeptive Biosystems (1-1159-05)). Колонку R2 уравнивают и промывают 0,1% трифторуксусной кислотой (99+% spectrometric grade, Aldrich 302031-100ml). Образцы элюируют из колонки качественным матричным раствором Agilent MALDI HCCA (G2037A). Полученную посредством трипсинового расщепления группу пептидов обрабатывают PNGase F и очищают на колонках POROS R2, и исследуют посредством MALDI-TOF.

4. СЕРО и ЕРО восстанавливают в растворе DTT и алкилируют иодацетамидом. Перед расщеплением Glu-C образцы очищают на колонке POROS R1. Перед анализом MALDI-TOF фракцию расщепленного образца очищают на колонках POROS R2. Полученную посредством Glu-C расщепления группу пептидов обрабатывают PNGase F и очищают на колонках POROS R2.

5. Для исключения возможности присутствия частично карбамилированного СЕРО, исходный ЕРО и СЕРО расщепляют Lys-C. Образцы анализируют с применением MALDI-TOF.

Закключение состоит в том, что 8 лизинов и N-концевая аминокислота являются карбамилированными. Другие карбамилированные аминокислоты не определены, и не обнаружено никаких модификаций гликанов.

Ссылки:

Обычная идентификация белков посредством MS:

Mann M., Hojrup P., Roepstorff P. (1993) Use of mass spectrometric molecular weight information to identify proteins in sequence databases, *Biol Mass Spectrom* 22, 338-345.

Yates, J. R., Speicher S, Griffin P. R., Hunkapiller T. (1993) Peptide mass maps: a highly informative approach to protein identification, *Anal Biochem* 214, 397-408.

Исходная масса:

Laugesen S, Roepstorff P. (2003) Combination of two matrices results in improved performance of MALDI MS for peptide mass mapping и protein analysis. *J. Am Soc. Mass Spectrom.* 14(9), 992-1002.

Расщепление/соединение:

Larsen MR, Hojrup P, Roepstorff P. (2005) Characterization of gel-separated glycoproteins using two-step proteolytic digestion combined with sequential microcolumns and mass spectrometry. *Mol Cell Proteomics.* 4(2), 107-19.

Дополнительные исследования позволили определить степень и гомогенность карбамилирования ЕРО, специфичность карбамилирования и идентичность сайтов карбамилирования, и присутствие потенциальных неспецифичных модификаций в результате побочных реакций карбамилирования и процесса очистки. Образцы анализировали посредством анализа общей массы образцов дегликозилированных белков и пептидного картирования с применением эндопротеаз LysC и трипсина для расщепления, и анализ LC/MS для определения пептидов.

Пример 2. Анализ общей массы

Анализ выполняют с тремя образцами ЕРО, карбамилированными с применением способа по примеру 1. Все три образца очищают после реакции карбамилирования с применением анионного обмена, как описано в примере 1. Один из образцов СЕРО (обозначенный СЕРО-СМС) получают посредством

СМС Biotech, масштаб производства из 1 г (концентрация: 0,82 мг/мл; буферный раствор: 20 мМ цитрат Na, 0,3 мМ лимонная кислота, 0,1М NaCl, pH 6,9-7,3). Оставшиеся два образца, обозначенные СЕРО-1 и СЕРО-2, получают из лабораторного масштаба производства 70 мг (концентрация: 1,1 мг/мл; буферный раствор: 25 мМ Трис, 0,2 М NaCl, pH 8,3-8,7). Данные образцы СЕРО сравнивают с не модифицированным или исходным ЕРО (концентрация: 0,82 мг/мл; буферный раствор: 2 мМ цитрат Na, 0,3 мМ лимонная кислота, 0,1 NaCl, pH 6,9-7,3) и ложным СЕРО (полученный посредством способа карбамилирования без добавления цианата К ЕРО) (концентрация: 0,38 мг/мл; буферный раствор: 20 мМ цитрат Na, 0,3 мМ лимонная кислота, 0,1М NaCl, pH 6,9-7,3).

#### ESI-масс-спектрометрия

До проведения анализа общей массы образцы подвергают ферментативному дегликозилированию. Каждый образец инкубируют в течение ночи с 50 мкг N-гликозидазы F (Prozyme from Glyko) , рекомбинантной нейраминидазы A. ureafaciens и O-гликозидазы при белковой концентрации 0,5 мг/мл. Полноту реакции дегликозилирования проверяют посредством способа SDS-PAGE при введении 3 мкг каждого образца в 12% Трис-глициновые гели. Оставшееся вещество из каждого образца используют для анализа по массе.

Добавлением соответствующего объема матричного раствора гуанидина гидрохлорида дегликозилированные образцы вносят к гуанидину гидрохлориду с концентрацией 4-5М, а затем обессоливают в содержащем 2% муравьиную кислоту и 40% ацетонитрил буферном растворе. Гуанидин гидрохлорид добавляют для того, чтобы обеспечить полное восстановление дегликозилированного ЕРО и СЕРО для масс-спектрометрического анализа. Определение массы выполняют с применением Waters ESI-Q-ToF или Waters ESI-LCT-масс-спектрометра, обеспечивающего ESI-наноспрей источник ионизации. Оценку данных проводят автоматической деконволюцией и ручным определением конкретных представляющих интерес пиков посредством программного обеспечения Mass Lynx 4.0. Количественное определение относительных отношений карбамилированных разными способами образцов СЕРО выполняют вычислением относительных отношений на основании регистрируемых в области масса/заряд интенсивностей сигналов.

Дегликозилирование приводит к образованию полностью удаляемых N-связанных сахаров. Однако высвобождение O-связанных Сахаров является не полным, особенно для образцов СЕРО.

Как предполагалось, в результате карбамилирования образцы СЕРО показали различные спектры масс по сравнению с ЕРО и образцами ложного СЕРО. Как показано в табл. 2, деконволюция спектров дала в результате массы для основных пиков для различных образцов, как ожидалось теоретически. Во всех образцах СЕРО обнаружили только в значительной степени карбамилированные молекулы СЕРО, с основной изоформой, представляющей собой полностью карбамилированную изоформу с полным карбамилированием 8 лизинов и N-концевой аминокислоты, т.е. 9 карбамильными остатками. Образцы СЕРО демонстрируют гетерогенность в содержании дополнительных изоформ, соответствующих 8, 10 и 11 карбамильным остаткам, присоединенных к СЕРО. Содержащие 8 карбамильных остатков образцы обозначены как недостаточно карбамилированные, с отсутствием по меньшей мере одного карбамильного остатка. Образцы с 10 и 11 карбамильными остатками обозначены как избыточно карбамилированные, где избыточные присоединенные карбамильные остатки могут связываться в неспецифичных условиях с отличными от лизина аминокислотами. В спектрах всех образцов определяют несколько минорных сигналов, но, как полагают, ни один не представляет собой неспецифично модифицированный образец. В образцах ЕРО и СЕРО обнаружили несколько минорных сигналов, и, как полагают, примеси уже присутствовали в исходном ЕРО.

Таблица 2. Полученные при анализе по общей массе деконволюционные массы дегликозилированных образцов СЕРО и ЕРО

ОБРАЗЕЦ	Теоретически ожидаемая масса	Полученная масса	Интерпретация
Исходный ЕРО	18239	18237	Соответствует
Ложный-СЕРО	18239	18239	Соответствует
СЕРО-СМС	18626 (9х карб)	18583 <b>18626</b> 18669 18711 18991	8х карб <b>9х карб</b> 10х карб 11х карб 9х карб + 0-сахар
СЕРО-1	18626 (9х карб)	18583 <b>18626</b> 18669 18711 18989	8х карб <b>9х карб</b> 10х карб 11х карб 9х карб + 0-сахар
СЕРО-2	18626 (9х карб)	18584 <b>18626</b> 18669 18712 18992	8х карб <b>9х карб</b> 10х карб 11х карб 9х карб + 0-сахар

В табл. 3 показаны относительные соотношения различных изоформ. Диапазоны недостаточно карбамилированного СЕРО приблизительно от 1,5 до 5,5% общего СЕРО в зависимости от образца, а диапазоны избыточно карбамилированного СЕРО приблизительно от 11 до 22% в зависимости от образца. СЕРО-1 и СЕРО-2 имеют одинаковое распределение изоформ, тогда как СЕРО-СМС имеет меньше недостаточно карбамилированных образцов по сравнению с двумя другими образцами. Различные масштабы производства дают выход продуктов с различным распределением, но как показано в табл. 3 для лабораторного масштаба производства, производство с подобным результатом можно повторять. Как обсуждали ранее, в любом выполненном масштабе производства распределение можно приспособить посредством корректировки объединения из анионообменной колонки.

Цифры в табл. 3 представляют собой минимальное соотношение недостаточно и избыточно карбамилированного СЕРО. Причиной этого является степень карбамилирования (от 8-кратной до 11-кратной), возможно, не точно определенная степень недостаточно, полностью и избыточно карбамилированного СЕРО. Например, молекула СЕРО, содержащая 8 карбамильных остатков, определенных анализом по массе, может иметь только 7 карбамильных групп, специфично связанных с лизинами, а оставшийся карбамильный остаток может представлять собой неспецифично связанный с другой аминокислотой. Данную ситуацию можно рассматривать только как недостаточно карбамилированный СЕРО, даже если существуют неспецифически связанные карбамильные группы. Наоборот, содержащая 10 карбамильных остатков молекула СЕРО, возможно, имеет только 8 специфично связанных остатков и два связанных неспецифично. В данной ситуации изоформу СЕРО рассматривают только избыточно карбамилированную, даже если все лизины не карбамилированы.

Таблица 3. Степень и гетерогенность карбамилрования: относительные соотношения различно карбамилрованных образцов СЕРО

		ОТНОСИТЕЛЬНОЕ СОДЕРЖАНИЕ		
	Степень карбамилрования	СЕРО-СМС*	СЕРО- 1*	СЕРО- 2**
1	8х карб	1,5%	5,1%	5,5%
2	<b>9х карб</b>	<b>77%</b>	<b>83,3%</b>	<b>83,6%</b>
3	10х карб	19,8%	10,9%	10,2%
4	11х карб	1,7%	0,7%	0,7%
5	Σ № 2-4 (>9х)	98,5%	94,9%	94,5%
6	Σ № 3+4 (избыточнокарб.)	21,5%	11,6%	10,9%

\*n=2

\*\*n=1

## Пример 3. LysC пептидное картирование

С применением эндопротеаз LysC и трипсина для расщепления выполняют исследование пептидной карты образцов ЕРО и СЕРО. Исследования всех пептидных карт проводили с дегликозилированными пептидами. Ферментативное дегликозилирование пептидов выполняют одновременно с эндопротеазным расщеплением.

Образцы ЕРО и СЕРО (приблизительно 150 мкг каждого) денатурируют и восстанавливают посредством инкубации с гуанидином гидрохлоридом и DTT. Свободные сульфгидрильные группы алкилируют иодуксусной кислотой. Алкилированные образцы обессоливают и выполняют замену буфера на соответствующий буфер с применением колонок для гель-фильтрации одноразового использования.

Эндопротеазу, N-гликозидазу и нейраминидазу, одновременно добавляют к образцам алкилированных ЕРО и СЕРО. Образцы в течение ночи инкубируют при 37°C. После инкубации приблизительно 5 мкг каждой смеси используют для анализа RP-HPLC/MS с применением Jupiter, C18 RP-колонок из Phenomenix, соединенных с ESI-LCT из Waters. В масс-спектрометре регистрируют УФ-сигнал при 220 нм и общее количество ионов (TIC). Для идентификации и количественного анализа полученных пептидов оценивают TIC. Так как LysC не способен к расщеплению карбамилрованных лизинов, предполагалось, что если карбамиллованы все лизины, указывая на специфичность карбамилрования, при расщеплении LysC фрагменты не образуются. В случае неполного карбамилрования должны образоваться конкретные фрагменты СЕРО. В табл. 4 перечислены теоретически образующиеся при расщеплении LysC фрагменты ЕРО, полностью и избыточно карбамилрованных СЕРО и недостаточно карбамилрованного СЕРО.

Таблица 4. LysC пептидное картирование: списки теоретически образующихся при расщеплении LysC пептидных фрагментов ЕРО, полностью или избыточно карбамилрованного СЕРО и недостаточно карбамилрованных СЕРО и ЕРО



Обозначение пептида	Аминокислоты от - до	Масса	Аминокислотная последовательность
K1	1-20	2399,3	APPR LIDSR VLER YLLEAK
K2	21-45	2804,2	EA NIT TGCAEHCS LNENEITVPDDTK
K3	46-52	926,5	VNFYAWK
K4	53-97	5022,7	RMEVGQQA VEV WQGLALLSEAVL RGQALLVNSSQP WEPLQLHVDK
K5	98-116	1954,2	AVSGLR SLTTLLR ALGAQK
K6 (+O-сахар)	117-140	2863,3	EAISPPDAASAAP LR TITADTFR K
K7	141-152	1498,8	LFR VYSNFLR GK
K8	153-154	259,2	LK
K9	155-165	1242,5	LYTGEACRTGD

СЕРО (полностью карбамиллированный и избыточно карбамиллированный)

Обозначение фрагмента	Аминокислоты от - до	Масса
СЕРО (9х карб)	1-165	19227
СЕРО (10х карб)	1-165	19270
СЕРО (11х карб)	1-165	19313

Недостаточно карбамиллированный СЕРО (8х карбамиллирование)

Не карбамиллированная аминокислотная группа	Ожидаемая для N-концевого фрагмента масса	Ожидаемая для C-концевого фрагмента масса
Ни одной (9х карбамиллированный)	19227	-
N-конец	19184	-
Lys20	2443,9	16755,9
Lys45	5274,9	13924,8
Lys52	6227,0	12972,7
Lys97	11276,8	7923,0
Lys116	13257,1	5942,6
Lys140	16147,2	3052,4
Lys152	17672,0	1527,5
Lys154	17956,4	1244,3

Как ожидали, полученный для расщепленных LysC образцов ЕРО и СЕРО LysC пептидный профиль полностью отличается. Расщепление LysC исходного ЕРО и ложного СЕРО привело к образованию ожидаемого пептидного профиля. В обоих образцах можно определить все пептиды от K1 до K9. В ЕРО и ложном СЕРО пептиды K5 и K1 являются частично расщепленными в неспецифических условиях. Не определяют никаких значимых дополнительных пиков и не определяют пики, отсутствующие в LysC карте ложного СЕРО по сравнению с исходным ЕРО. Исходя из этих данных, можно заключить, что при карбамиллировании и процессе очистки не возникает значимых неспецифических ковалентных модификаций белка ЕРО.

Пептидные карты образцов СЕРО имеют различные пептидные профили с исходным ЕРО. Присутствует один основной пик и несколько незначительных пиков. Как показано в табл. 5, полученные из пиков массы хорошо коррелируют с массами, ожидаемыми для не расщепленного СЕРО, или для фрагментов при расщеплении LysC недостаточно карбамиллированного СЕРО. Основной пик (А) включает в себя исходный, дегликозилированный, полностью карбамиллированный СЕРО (9х карбамиллов) и избыточно карбамиллированный СЕРО (10х карбамиллов) (табл. 5). Четыре незначительных пика (В-Е) включают в себя недостаточно карбамиллированный СЕРО (8х карбамиллов), с различными пиками, включающими в себя недостаточно карбамиллированный СЕРО, не карбамиллированный по конкретным лизинам. Пики В и С содержат недостаточно карбамиллированный СЕРО, в котором отсутствует специфическое карбамиллирование по Lys45, тогда как пики D и E содержат недостаточно карбамиллированный СЕРО, в котором отсутствует специфическое карбамиллирование по Lys97 (табл. 5).

Таблица 5. LysC пептидное картирование: распределение экспериментально полученных масс с теоретически полученными фрагментами СЕРО из недостаточно карбамиллированного СЕРО

№ пика	Полученная масса	Интерпретация	Ожидаемая масса
А	19228	СЕРО (9х карб + О-сахар)	19227
	19271	СЕРО (10х карб + О-сахар)	19270
В	18867	СЕРО (9х карб w/o О-сахар)	18862
	13926	СЕРО-фрагмент (aa46-165)	13924,3
С	5276	СЕРО-фрагмент (aa1-45)	5274,8
Д	7924	СЕРО-фрагмент (aa98-165)	7922,4
Е	11279	СЕРО-фрагмент (aa1-97)	11276,6

В относительных соотношениях пиков для различных образцов СЕРО существует несколько различий. Образцы СЕРО 1 и 2 имеют более рельефные пики D и E, чем у СЕРО-СМС, показывая, что они содержат больше образцов недостаточно карбамилированного СЕРО.

Из-за технических ограничений трудно количественно оценить минорные пики, так как они связаны с основным пиком. Однако с применением областей пиков по УФ-детекции в качестве грубого определения относительных отношений различных образцов можно определить, что недостаточно карбамилированный СЕРО может составлять менее 10% изоформ СЕРО в образцах и, что СЕРО-1 и СЕРО-2 имеют двойное количество недостаточно карбамилированных изоформ по сравнению с СЕРО-СМС.

В целом, данные LysC пептидного картирования хорошо согласуются с описанным в примере 2 анализом по общей массе. СЕРО-СМС содержит меньше недостаточно карбамилированных изоформ СЕРО, тогда как СЕРО-1 и СЕРО-2 содержат больше избыточно карбамилированных изоформ СЕРО. Данное пептидное картирование также показывает, что лизин 45 и лизин 97 могут представлять собой области неполного карбамилирования.

Пример 4. Пептидное картирование посредством трипсина

Расщепление образца с применением трипсина описано в примере 3.

Расщепление ЕРО и ложного СЕРО трипсином приводит к образованию ожидаемого пептидного профиля. Как ожидали, при расщеплении трипсином в обоих образцах можно определить большинство пептидов (от T1 до T21), за исключением некоторых небольших ди- и трипептидов (как например T21). Смотри табл. 6. Как и в случае с расщеплением LysC, не выявляют значимых дополнительных пиков и не выявляют пиков, отсутствующих у ложного СЕРО по сравнению с исходным ЕРО. Исходя из этих данных, заключают, что при карбамилировании и процессе очистки не образуется неспецифических ковалентных модификаций белка ЕРО.

Пептидные профили образцов СЕРО отличаются от не модифицированного ЕРО. Обычно трипсин расщепляет по лизину и аргинину, таким образом, можно предположить, что в случае полностью карбамилированного ЕРО может произойти фрагментирование только посредством расщепления аргининов. Таким образом, после получения пептидного профиля с использованием трипсина можно определить области специфического карбамилирования и неспецифически карбамилированные пептиды. Ожидаемые при расщеплении трипсином молекул СЕРО пептиды допускают расщепление по аргининам (R) только, как указано в табл. 6.

Таблица 6. Список ожидаемых для ЕРО и СЕРО расщепленных трипсином пептидов ЕРО

Обозначение пептида	Аминокислоты от - до	Масса (MH)	Аминокислотная последовательность
T1	1-4	439,3	APPR
T2	5-10	763,4	LICDSR
T3	11-14	513,3	VLER
T4	15-20	735,4	YLLEAK
T5	21-45	2806,2	EANITTGCAEHCS LNENITVPDDTK
T6	46-52	926,5	VNFYAWK
T7	53-53	174,1	R

T8	54-76	2525,3	MEVGQQAQVEVW QGLALLSEAVLR
T9	77-97	2359,2	GQALLVNSSQPW EPLQLHVDK
T10	98-103	601,4	AVSGLR
T11	104-110	802,5	SLTTLLR
T11	111-116	586,3	ALGAQK
T13 (+O-сахар)	117-131	1829,8	EAISPPDAASAAP LR
T14	132-139	923,5	TITADTFR
T15	140-140	146,1	K
T16	141-143	434,3	LFR
T17	144-150	897,5	VYSNFLR
T18	151-152	203,1	GK
T19	153-154	259,2	LK
T20	155-162	969,4	LYTGEACR
T21	163-165	291,1	TGD

СЕРО (предполагаемое расщепление только по Arg (R) в результате полного карбамилрования)

Обозначение пептида	Аминокислоты от - до	Масса (МН)	Аминокислотная последовательность
R1 (1x карб)	1-4	482,3	APPR
R2	5-10	763,4	LICDR
R3	11-14	515,3	VLER
R4 (3x карб)	15-53	4717,2	YLLEAKEANITT GCAEHCSLNENIT VPDDTKVNFYA WKR
R5	54-76	2525,3	MEVGQAQVEVWQ GLALLSEAVLR
R6 (1x карб)	77-103	2985,3	GQALLVNSSQPW EPLQLHVDKAVS GLR
R7	104-110	802,5	SLTTLLR
R8 (1x карб) (+O-сахар)	111-131	2441,1	ALGAQKEAISPPD AASAAPLR
R9	132-139	923,5	TITADTFR
R10 (1x карб)	140-143	605,4	KLFR
R11	144-150	897,5	VYSNFLR
R12 (2x карб)	151-162	1481,7	GKCLKYTGEACR
R13	163-165	291,1	TGD

Все ожидаемые для расщепления трипсином пептиды определяли в виде основных пиков во всех образцах СЕРО, за исключением С-концевого пептида R13. Данный пептид также не обнаружили в исходном ЕРО или ложном СЕРО. Полученные при специфическом расщеплении только по аргининам пики от R1 до R12 рассматривают как подавляющее большинство определенных в образцах СЕРО пептидов. Кроме того, все содержащие лизин пептиды определяют почти исключительно в полностью карбамилрованной форме. Эти данные показывают высокую степень специфического карбамилрования по лизинам и N-концевой аминокислоте.

Кроме основного пептида во всех образцах СЕРО также определяют шесть минорных пептидов. Анализом по массе определяют три из минорных пептидов как результат расщепления трипсином избыточно карбамилрованного СЕРО, а оставшиеся три образуются в результате расщепления недостаточно карбамилрованного СЕРО.

В табл. 7 перечислены все пептиды, определенные в картах с расщеплением трипсином трех проанализированных образцов СЕРО. Высоко распространенные пептиды от R1 до R12, образованные из полностью и специфически карбамилрованного ЕРО, указаны обычным шрифтом, правильно карбамилрованный ЕРО дополнительно обозначен жирным шрифтом. Наиболее вероятно образованные расщеплением недостаточно карбамилрованного СЕРО пептиды обозначены курсивом, а образованные расщеплением избыточно карбамилрованного СЕРО пептиды обозначены подчеркнутым шрифтом.

Таблица 7. Пептидная карта при расщеплении трипсином: список пептидов, определенных в пептидной карте СЕРО с расщеплением трипсином

Пептид	Масса	Относительное количество ионов (%) * СЕРО-1	Относительное количество ионов (%) * СЕРО-2	Относительное количество ионов (%) * СЕРО-СМС
<b>R1_1x карб</b>	<b>482,25</b>	<b>1,28</b>	<b>1,09</b>	<b>1,15</b>
R2	763,35	7,87	8,49	8,15
R3	515,31	2,78	2,58	2,66
R4_b1_1x карб (T6+T7_1x карб)	1125,6	0,17	0,2	0,15
<b>R4_3x карб</b>	<b>4717,2</b>	<b>1,5</b>	<b>0,80</b>	<b>1,32</b>
R5	2525,34	11,44	9,56	9,54
R5 ox	2541,34	0,15	0,15	0,21
R5 Na	2547,32	0,15	0,13	0,14
R5 a1	1869,97	0,17	0,17	0,16
R5 b1	673,38	0,29	0,27	0,25
T9=R6 a1	2359,24	0,62	0,54	0,26
T10=R6 b1	602,35	0,95	0,8	0,65
<b>R6_1x карб</b>	<b>2985,60</b>	<b>15,36</b>	<b>14,48</b>	<b>15,78</b>
R7	802,49	7,16	7,28	7,05
R7_1x карб	845,49	+ <sup>1</sup>	+ <sup>1</sup>	+ <sup>1</sup>
R8_1x карб	2076,10	0,16	0,15	0,16
R8_1x карб	2076,10	0,5	0,44	0,63
<b>R8_SA0_1x карб</b>	<b>2441,1</b>	<b>9,19</b>	<b>9,34</b>	<b>9,20</b>
R9	923,47	9,85	11,11	10,58
<b>R10_1x карб</b>	<b>605,37</b>	<b>5,17</b>	<b>5,40</b>	<b>5,43</b>
R10_2x карб	648,37	0,02	0,03	0,03
R11	897,47	9,82	10,70	10,30
<b>R12_a1_2x карб</b>	<b>806,46</b>	<b>0,20</b>	<b>0,22</b>	<b>0,17</b>
<b>R12_2x карб</b>	<b>1481,73</b>	<b>7,91</b>	<b>7,90</b>	<b>7,84</b>
R12_3x карб	1524,74	0,28	0,26	0,59
R13	291,11	-	-	-

\*- интенсивность по отношению к общему количеству импульсов в ПИС

1- обнаружен посредством ручного определения; сигнал подтвержден как специфический

Со ссылкой на табл. 7, минорные пики T9 и T10, содержащие соответственно R6\_a1 и R6\_b1 пептиды, наиболее вероятно получены при расщеплении молекул недостаточно карбамилированного СЕРО, не карбамилированного по Lys97. Пептид R4\_b1+1xкарб. образуется, если не карбамилирована аминокислота Lys45. Пептид R6\_a1 (пик T9) более выражен в образцах СЕРО-1 и СЕРО-2, по сравнению с СЕРО-СМС, показывая, что образующая его молекула может иметь двойное количество недостаточно карбамилированного СЕРО. Пептиды R6\_b1 и R4\_b1 + 1xкарб. представлены в равных количествах во всех образцах СЕРО.

Выполнить вычисление относительного содержания недостаточно карбамилированного СЕРО из этих данных представляет трудности из-за технических ограничений. Однако, собрав все наблюдения вместе, приблизительно определили, что количество недостаточно карбамилированных образцов составляет приблизительно 10%, так как это заключили из анализа по общей массе и LysC пептидного картирования.

Три других минорных пептида, элюированных с остальными пептидами, интерпретировали по массе как содержащие один избыточный карбамильный остаток, т.е. избыточно карбамилированный СЕРО. Пептиды R10\_2xкарб. и R7\_1xкарб. определяют в незначительных количествах, причем обнаружили, что R12\_3xкарб. имеет значимую интенсивность сигнала. СЕРО-СМС имеет в два раза большее содержание избыточно карбамилированных образцов СЕРО по сравнению с СЕРО-1 и СЕРО-2. Это согласуется с результатами анализа по общей массе. Из этих данных также следует заключить, что аминокислотная

последовательность 151-62 ЕРО представляет собой область для неспецифического карбамилирования.

Кроме того, по тем же причинам, что и для количественной оценки неполного карбамилирования, количественная оценка избыточно карбамилированных образцов представляет трудности. Однако, предположив, что одинаковая эффективность ионизации пептидов, отличающаяся только по степени карбамилирования, по относительному количеству ионов производных R12 вычислили, что приблизительно 3-7% СЕРО представляют собой избыточно карбамилированные образцы. Это представляет собой меньшее количество избыточно карбамилированных изоформ, вычисленных анализом по общей массе.

В целом, из анализа по общей массе и данных пептидного картирования ЕРО и СЕРО можно заключить следующее.

Образцы СЕРО, являющиеся в достаточно высокой степени карбамилированными, исходя из анализа по общей массе. Приблизительно 95-98% всех молекул полностью карбамилированы и содержат по меньшей мере 9 карбамильных остатков (см. табл. 3). Картирование с применением LysC и трипсина подтверждает высокую степень карбамилирования по специфическим сайтам, и что наиболее вероятно более 95% молекул СЕРО являются полностью карбамилированными по 8 лизинам и N-концевой аминокислоте.

Данные также показывают четыре обнаруженных изоформы СЕРО. В проанализированных образцах СЕРО определяют образцы с 8, 9, 10 и 11 карбамильными остатками, изоформа с 9 карбамильными остатками представляет собой доминирующие образцы. Предполагают, что содержащая 8 карбамильных остатков вместо 9 небольшая часть молекул СЕРО является неполностью карбамилированной. Для СЕРО-1 и СЕРО-2 данные изоформы составляют приблизительно 5% от общего, а для СЕРО-СМС данная изоформа образуется приблизительно у 1,5% из общего количества молекул СЕРО.

Более значительная часть молекул СЕРО является избыточно карбамилированной, т.е. содержит 10 или 11 карбамильных остатков. Интервалы избыточно карбамилированного СЕРО составляют приблизительно от 11% для СЕРО-1 и СЕРО-2 до приблизительно 22% в СЕРО-СМС.

Данные пептидного картирования показывают высокую степень специфичности карбамилирования по 8 лизинам и N-концу. Кроме того, в целом пептидное картирование подтверждает результаты анализа по общей массе. По меньшей мере приблизительно 90-95% молекул СЕРО являются специфически модифицированными карбамильными остатками по всем лизинам и N-концу. Однако эти данные также показывают неполное и избыточное карбамилирование образцов СЕРО. Из-за некоторых технических ограничений тяжело определить точное соотношение недостаточно карбамилированных образцов, но приблизительно определили, что оно составляет приблизительно до 10%, что согласуется с обнаруженным по анализу общей массы количеством. Кроме того, на молекуле ЕРО определили два различных положения Lys45 и Lys97, как положения, где наиболее вероятно происходит отсутствие карбамилирования.

В обеих сериях пептидного картирования также обнаружили избыточно карбамилированные образцы. Более того, из-за технических ограничений тяжело количественно оценить точное количество избыточно карбамилированных образцов. Исходя из полученных данных, можно спекулировать, что при пептидном картировании определяют слишком малые количества избыточно карбамилированных образцов. Пептидным картированием определяют только от одной трети до одной второй количества избыточно карбамилированных образцов по сравнению с анализом по общей массе.

Разумное объяснение для данного противоречия состоит в том, что идентифицируют вообще не все из избыточно карбамилированных пептидов или в неправильном количестве. На карте LysC в значительных количествах определяют нерасщепленные содержащие 10 карбамильных остатков образцы СЕРО, а в картировании с применением трипсина определяют три пептида с содержанием одного избыточного карбамильного остатка. Два из этих фрагментов определяют только в следовых количествах. Третий пептид, пептид СЕРО из 152-162 аминокислот, граничит с С-концом и является причиной одной третьей части избыточного карбамилирования, и может представлять собой сайт для неспецифического карбамилирования в ЕРО.

Посредством любого выполненного анализа не определили значительных количеств других неспецифических (не связанных карбамиллом) модификаций в образцах СЕРО или в образцах ложного СЕРО.

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ получения карбамилированного белка эритропоэтина с менее чем приблизительно 40% агрегированного белка и менее чем приблизительно 40 мас.% избыточно и недостаточно карбамилированного белка, определенного ESI-масс-спектрометрией, при этом способ включает в себя взаимодействие количества эритропоэтина с количеством цианата при температуре, pH и в течение периода времени, необходимых для по меньшей мере приблизительно 90% карбамилирования аминокрупп в лизинах и N-концевой аминокислоте эритропоэтина.

2. Способ по п.1, где белок карбамилированного эритропоэтина представляет собой человеческий эритропоэтин.

3. Способ по п.1, где белок карбамилированного эритропоэтина имеет менее чем приблизительно

30% агрегированного белка.

4. Способ по п.1, где белок карбамилированного эритропозтина имеет менее чем приблизительно 20% агрегированного белка.

5. Способ по п.1, где белок карбамилированного эритропозтина имеет менее чем приблизительно 10% агрегированного белка.

6. Способ по п.1, где белок карбамилированного эритропозтина имеет менее чем приблизительно 30 мас.% избыточно и недостаточно карбамилированного белка.

7. Способ по п.1, где белок карбамилированного эритропозтина имеет менее чем приблизительно 20 мас.% избыточно и недостаточно карбамилированного белка.

8. Способ по п.1, где белок карбамилированного эритропозтина имеет менее чем приблизительно 10 мас.% избыточно и недостаточно карбамилированного белка.

9. Способ по п.1, где белок карбамилированного эритропозтина имеет менее чем приблизительно 30 мас.% избыточно карбамилированного белка.

10. Способ по п.1, где белок карбамилированного эритропозтина имеет менее чем приблизительно 20 мас.% избыточно карбамилированного белка.

11. Способ по п.1, где белок карбамилированного эритропозтина имеет менее чем приблизительно 10 мас.% избыточно карбамилированного белка.

12. Способ по п.1, где концентрация взаимодействующего с цианатом белка эритропозтина составляет приблизительно от 0,05 приблизительно до 10 мг/мл.

13. Способ по п.1, где концентрация взаимодействующего с цианатом белка эритропозтина составляет приблизительно от 2 приблизительно до 5 мг/мл.

14. Способ по п.1, где концентрация цианата составляет приблизительно от 0,05 приблизительно до 10M.

15. Способ по п.1, где концентрация цианата составляет приблизительно от 0,05 приблизительно до 2M.

16. Способ по п.1, где температурные диапазоны приблизительно от 0 приблизительно до 60°C.

17. Способ по п.1, где температурные диапазоны приблизительно от 30 приблизительно до 34°C.

18. Способ по п.1, где pH находится приблизительно от 7 приблизительно до 11.

19. Способ по п.1, где pH находится приблизительно от 8 приблизительно до 10.

20. Способ по п.1, где период времени составляет приблизительно от 10 мин приблизительно до 30 суток.

21. Способ по п.1, где период времени составляет приблизительно от 1 ч приблизительно до 5 суток.

22. Способ по п.1, где белок эритропозтина взаимодействует с цианатом в присутствии буферного раствора.

23. Способ по п.22, где буферным раствором является борат.

24. Способ по п.22, где концентрация буферного раствора составляет приблизительно от 0,05 приблизительно до 2M.

25. Способ по п.22, где концентрация буферного раствора составляет приблизительно от 0,1 приблизительно до 1M.

26. Способ по п.22, где концентрация буферного раствора составляет приблизительно 0,5M.

27. Способ по п.1, где концентрация взаимодействующего с цианатом белка эритропозтина составляет приблизительно от 0,05 приблизительно до 10 мг/мл, концентрация цианата составляет приблизительно от 0,05 приблизительно до 10M, температурные диапазоны приблизительно от 0 приблизительно до 60°C, pH находится приблизительно от 7 приблизительно до 11, а время составляет приблизительно от 10 мин приблизительно до тридцати суток.

28. Способ по п.1, где концентрация взаимодействующего с цианатом белка эритропозтина составляет приблизительно от 2 приблизительно до 5 мг/мл, концентрация цианата составляет приблизительно от 0,05 приблизительно до 2M, температурные диапазоны приблизительно от 30 приблизительно до 34°C, pH находится приблизительно от 8 приблизительно до 10, а время составляет приблизительно от 1 ч приблизительно до 5 суток.

29. Способ по п.1, где концентрация взаимодействующего с цианатом белка эритропозтина составляет приблизительно 3 мг/мл, концентрация цианата составляет приблизительно 0,5M, температура составляет приблизительно 32°C, pH составляет приблизительно 9, а период времени составляет приблизительно 24 ч.

30. Способ получения карбамилированного белка эритропозтина с менее чем приблизительно 3% агрегированного белка и менее чем приблизительно 40 мас.% избыточно и недостаточно карбамилированного белка, определенного ESI-масс-спектрометрией, включающий в себя очистку карбамилированного эритропозтина с применением анионообменной, катионообменной, гидрофобной хроматографии, хроматографии с обращенными фазами, аффинной хроматографии или хроматографии с исключением по размеру.

31. Способ по п.30, где белок карбамилированного эритропозтина представляет собой человеческий

эритропоэтин.

32. Способ по п.30, где по меньшей мере 90% аминокислотных остатков на лизинах и N-концевой аминокислоте эритропоэтина карбамиллированы.

33. Способ по п.30, где белок карбамиллированного эритропоэтина имеет менее чем приблизительно 2,5% агрегированного белка.

34. Способ по п.30, где белок карбамиллированного эритропоэтина имеет приблизительно 0,5% или менее агрегированного белка.

35. Способ по п.30, где белок карбамиллированного эритропоэтина имеет менее чем приблизительно 30 мас.% избыточно и недостаточно карбамиллированного белка.

36. Способ по п.30, где белок карбамиллированного эритропоэтина имеет менее чем приблизительно 20 мас.% избыточно и недостаточно карбамиллированного белка.

37. Способ по п.30, где белок карбамиллированного эритропоэтина имеет менее чем приблизительно 10 мас.% избыточно и недостаточно карбамиллированного белка.

38. Способ по п.30, где белок карбамиллированного эритропоэтина имеет менее чем приблизительно 30 мас.% избыточно карбамиллированного белка.

39. Способ по п.30, где белок карбамиллированного эритропоэтина имеет менее чем приблизительно 20 мас.% избыточно карбамиллированного белка.

40. Способ по п.30, где белок карбамиллированного эритропоэтина имеет менее чем приблизительно 10 мас.% избыточно карбамиллированного белка.

41. Способ получения белка карбамиллированного эритропоэтина с менее чем приблизительно 3% агрегированного белка и менее чем приблизительно 40 мас.% избыточно и недостаточно карбамиллированного белка, определенного ESI-масс-спектрометрией, при этом способ включает в себя:

(а) взаимодействие количества эритропоэтина с количеством цианата при температуре, pH и в течение периода времени, необходимых для по меньшей мере приблизительно 90% карбамиллирования аминокислотных остатков на лизинах и N-концевой аминокислоте эритропоэтина; и

(b) очистку белка карбамиллированного эритропоэтина с применением анионообменной, катионообменной, гидрофобной хроматографии, хроматографии с обращенными фазами, аффинной хроматографии или размерно-эксклюзионной хроматографии.

42. Способ по п.41, где белок карбамиллированного эритропоэтина представляет собой человеческий эритропоэтин.

43. Способ по п.41, где белок карбамиллированного эритропоэтина имеет менее чем приблизительно 2,5% агрегированного белка.

44. Способ по п.41, где белок карбамиллированного эритропоэтина имеет приблизительно 0,5% или менее агрегированного белка.

45. Способ по п.41, где белок карбамиллированного эритропоэтина имеет менее чем приблизительно 30 мас.% избыточно и недостаточно карбамиллированного белка.

46. Способ по п.41, где белок карбамиллированного эритропоэтина имеет менее чем приблизительно 20 мас.% избыточно и недостаточно карбамиллированного белка.

47. Способ по п.41, где белок карбамиллированного эритропоэтина имеет менее чем приблизительно 10 мас.% избыточно и недостаточно карбамиллированного белка.

48. Способ по п.41, где белок карбамиллированного эритропоэтина имеет менее чем приблизительно 30 мас.% избыточно карбамиллированного белка.

49. Способ по п.41, где белок карбамиллированного эритропоэтина имеет менее чем приблизительно 20 мас.% избыточно карбамиллированного белка.

50. Способ по п.41, где белок карбамиллированного эритропоэтина имеет менее чем приблизительно 10 мас.% избыточно карбамиллированного белка.

51. Способ по п.41, где концентрация взаимодействующего с цианатом белка эритропоэтина составляет приблизительно от 0,05 до 10 мг/мл.

52. Способ по п.41, где концентрация взаимодействующего с цианатом белка эритропоэтина составляет приблизительно от 2 до 5 мг/мл.

53. Способ по п.41, где концентрация взаимодействующего с цианатом белка эритропоэтина составляет приблизительно 3 мг/мл.

54. Способ по п.41, где концентрация цианата составляет приблизительно от 0,05 до 10M.

55. Способ по п.41, где концентрация цианата составляет приблизительно от 0,05 до 2M.

56. Способ по п.41, где концентрация цианата составляет приблизительно 0,5M.

57. Способ по п.41, где температурные диапазоны приблизительно от 0 до 60°C.

58. Способ по п.41, где температурные диапазоны приблизительно от 30 до 34°C.

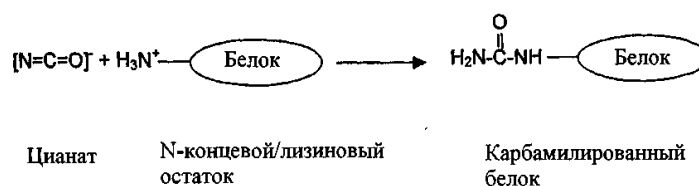
59. Способ по п.41, где температура составляет приблизительно 32°C.

60. Способ по п.41, где pH находится приблизительно от 7 до 11.

61. Способ по п.41, где pH находится приблизительно от 8 до 10.

62. Способ по п.41, где рН составляет приблизительно 9.
63. Способ по п.41, где период времени составляет приблизительно от 10 мин приблизительно до 30 суток.
64. Способ по п.41, где период времени составляет приблизительно от 1 ч приблизительно до 5 суток.
65. Способ по п.41, где период времени составляет приблизительно 24 ч.
66. Способ по п.41, где белок эритропоэтина взаимодействует с цианатом в присутствии буферного раствора.
67. Способ по п.66, где буферным раствором является борат.
68. Способ по п.66, где концентрация буферного раствора составляет приблизительно от 0,05 приблизительно до 2М.
69. Способ по п.66, где концентрация буферного раствора составляет приблизительно от 0,1 приблизительно до 1М.
70. Способ по п.66, где концентрация буферного раствора составляет приблизительно 0,5М.
71. Способ по п.41, где концентрация взаимодействующего с цианатом белка эритропоэтина составляет приблизительно от 0,05 приблизительно до 10 мг/мл, концентрация цианата составляет приблизительно от 0,05 приблизительно до 10М, температурные диапазоны приблизительно от 0 приблизительно до 60°C, рН находится приблизительно от 7 приблизительно до 11, а время составляет приблизительно от 10 мин приблизительно до 30 суток.
72. Способ по п.41, где концентрация взаимодействующего с цианатом белка эритропоэтина составляет приблизительно от 2 приблизительно до 5 мг/мл, концентрация цианата составляет приблизительно от 0,05 приблизительно до 2М, температурные диапазоны приблизительно от 30 приблизительно до 34°C, рН находится приблизительно от 8 приблизительно до 10, а время составляет приблизительно от 1 ч приблизительно до 5 суток.
73. Способ по п.34, где концентрация взаимодействующего с цианатом белка эритропоэтина составляет приблизительно 3 мг/мл, концентрация цианата составляет приблизительно 0,5М, температура составляет приблизительно 32°C, рН составляет приблизительно 9, а период времени составляет приблизительно 24 ч.
74. Способ получения карбамилированного белка эритропоэтина с менее чем приблизительно 40% агрегированного белка и менее чем приблизительно 40 мас.% избыточно и недостаточно карбамилированного белка, при этом способ включает в себя взаимодействие количества эритропоэтина с количеством цианата при температуре, рН и в течение периода времени, необходимыми для по меньшей мере приблизительно 90% карбамилирования аминокрупп в лизинах и N-концевой аминокислоте эритропоэтина, причем эритропоэтин взаимодействует с цианатом в присутствии бората калия.
75. Способ получения карбамилированного белка эритропоэтина с менее чем приблизительно 40% агрегированного белка и менее чем приблизительно 40 мас.% избыточно и недостаточно карбамилированного белка, при этом способ включает в себя взаимодействие количества эритропоэтина с количеством цианата при температуре от 30 до 34°C, рН и в течение периода времени, необходимых для по меньшей мере приблизительно 90% карбамилирования аминокрупп в лизинах и N-концевой аминокислоте эритропоэтина.
76. Способ получения карбамилированного белка эритропоэтина с менее чем приблизительно 40% агрегированного белка и менее чем приблизительно 40 мас.% избыточно и недостаточно карбамилированного белка, при этом способ включает в себя взаимодействие количества эритропоэтина с количеством цианата при температуре, рН и в течение периода времени, необходимых для по меньшей мере приблизительно 90% карбамилирования аминокрупп в лизинах и N-концевой аминокислоте эритропоэтина, причем карбамилированный белок эритропоэтина очищается с применением анионообменной хроматографии при поддержании рН 8,5±0,2 как разделяющего, так и элюирующего буферов.

#### Реакция цианата с N-концевым и лизиновыми остатками белков



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2