

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

G01N 33/50 (2023.08); G01N 33/5002 (2023.08); C12N 15/85 (2023.08); C12N 15/79 (2023.08)

(21)(22) Заявка: 2023103087, 13.02.2023

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
13.02.2023Дата регистрации:
27.12.2023

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 13.02.2023

(45) Опубликовано: 27.12.2023 Бюл. № 36

Адрес для переписки:

191119, Санкт-Петербург, ул. Звенигородская,
9, ООО "ГЕРОФАРМ"

(72) Автор(ы):

Сапарова Валерия Бяшимовна (RU),
Афанасьева Алина Николаевна (RU),
Шитикова Виктория Олеговна (RU),
Макаренко Игорь Евгеньевич (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Общество с ограниченной ответственностью
"ГЕРОФАРМ" (RU)(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: RU 2703458 C1, 17.10.2019. CN
1134539 C, 14.01.2004. WO 2010099019 A1
02.09.2010. Зотова И.И., Грицаев С.В., Шилова
Е.Р., Потихонова Е.А., Абдулкадыров К.М.,
Чечеткин А.В. Агонисты рецептора
тромбопоэтина в лечении первичной
иммунной тромбоцитопении: эффективность
и безопасность в повседневной клинической
практике одного медицинского центра // (см.
прод.)(54) ТЕСТ-СИСТЕМА И СПОСОБЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ
АГОНИСТОВ РЕЦЕПТОРА ТРОМБОПОЭТИНА ЧЕЛОВЕКА

(57) Реферат:

Изобретение относится к области биотехнологии. Описана тест-система для определения биологической активности искусственных агонистов рецептора тромбопоэтина человека, включающая клетки линии 32D clone 3 трансформированные вектором, содержащим нуклеотидную последовательность, кодирующую человеческий рецептор

тромбопоэтина. Технический результат заключается в возможности использования данной тест-системы для определения биологической активности и иммуногенности искусственных агонистов рецептора тромбопоэтина человека при разработке новых лекарственных препаратов. 3 н. и 6 з.п. ф-лы, 3 ил., 2 табл., 3 пр.

(56) (продолжение):

Вестник гематологии. 2015. N. 4.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.

G01N 33/50 (2006.01)*C12N 15/09* (2006.01)*C12N 15/63* (2006.01)*C12N 15/85* (2006.01)(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

G01N 33/50 (2023.08); *G01N 33/5002* (2023.08); *C12N 15/85* (2023.08); *C12N 15/79* (2023.08)(21)(22) Application: **2023103087, 13.02.2023**(24) Effective date for property rights:
13.02.2023Registration date:
27.12.2023

Priority:

(22) Date of filing: **13.02.2023**(45) Date of publication: **27.12.2023** Bull. № 36

Mail address:

**191119, Sankt-Peterburg, ul. Zvenigorodskaya, 9,
OOO "GEROFARM"**

(72) Inventor(s):

**Saparova Valeriya Byashimovna (RU),
Afanasyeva Alina Nikolaevna (RU),
Shitikova Viktoriya Olegovna (RU),
Makarenko Igor Evgenevich (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Obshchestvo s ogranichennoj otvetstvennostyu
"GEROPHARM" (RU)**(54) **TEST SYSTEM AND METHODS OF DETERMINING BIOLOGICAL ACTIVITY OF HUMAN THROMBOPOETIN RECEPTOR AGONISTS**

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology.

SUBSTANCE: following is described: a test system for determining the biological activity of artificial agonists of the human thrombopoietin receptor, including cells of the 32D clone 3 line transformed with a vector containing a nucleotide sequence encoding the

human thrombopoietin receptor.

EFFECT: possibility of using this test system to determine the biological activity and immunogenicity of artificial human thrombopoietin receptor agonists in the development of new medicinal products.

9 cl, 3 dwg, 2 tbl, 3 ex

RU 2 810 503 C1

RU 2 810 503 C1

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Изобретение относится к области биотехнологии, а именно к тест-системе для определения биологической активности искусственных агонистов рецептора тромбопоэтина человека.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Идиопатическая тромбоцитопеническая пурпура (ИТП), или первичная иммунная тромбоцитопения - это заболевание, представляющее собой изолированную иммуноопосредованную тромбоцитопению с количеством тромбоцитов в периферической крови менее 100×10^9 /л, возникающую и/или сохраняющуюся без каких-либо явных причин, с геморрагическим синдромом различной степени выраженности или без него (STASI R. et al., Idiopathic thrombocytopenic purpura: current concepts in pathophysiology and management, Thrombosis and haemostasis, 2008, V. 99, N. 01, p.4-13).

Наиболее частыми клиническими проявлениями заболевания являются спонтанный или посттравматический кожный геморрагический синдром, петехии и экхимозы на слизистых, носовые и десневые кровотечения, мено- и метроррагии, реже кровотечения из желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) и гематурия. Частота жизнеугрожающих событий, таких как субарахноидальные кровоизлияния, как правило, не превышает 0,5% (КОВАЛЕВА Л. Г. и др., Клинико-статистические данные и оценка различных методов терапии идиопатической тромбоцитопенической пурпуры, Терапевтический архив, 2011, V. 83, N. 4, с.60-65). Как и другие нарушения свертываемости крови, ИТП характеризуется значительной потерей трудоспособности, ухудшением качества жизни, повышенным риском смертности, а также частыми госпитализациями, что образует экономическое бремя для пациентов, систем здравоохранения и общества.

Основная цель терапии ИТП - купирование геморрагического синдрома путем нормализации или повышения тромбоцитов до безопасного уровня, обеспечивающего нормальное существование пациента без спонтанной кровоточивости и без снижения качества жизни; таким уровнем считается количество тромбоцитов от $50,0 \times 10^9$ /л и выше (STASI R. et al., 2008).

В настоящее время на территории Российской Федерации зарегистрировано всего 2 препарата, относящихся к этой группе - Энплейт (Nplate, AMGEN EUROPE, B.V.) и Револейд (Revolade, NOVARTIS PHARMA, AG). Действующее вещество препарата Энплейт - ромиплостим - было многократно проверено на эффективность и показало свою терапевтическую активность при лечении идиопатической тромбоцитопенической пурпуры. Это позволило пациентам получать современную терапию, улучшающую качество жизни (KUTER D. J. et al., Romiplostim in adult patients with newly diagnosed or persistent immune thrombocytopenia (ITP) for up to 1 year and in those with chronic ITP for more than 1 year: a subgroup analysis of integrated data from completed romiplostim studies, British journal of haematology, 2019, V. 185, N. 3, p.503-513).

Ромиплостим представляет собой белковую конструкцию, содержащую четыре связывающих TPO-R (тромбопоэтиновый рецептор, MPL) домена TPO с высокой аффинностью к TPO-R и один Fc-домен IgG1 (BUSSEL J. B. et al., A review of romiplostim mechanism of action and clinical applicability, Drug Design, Development and Therapy, 2021, p.2243-2268). Ромиплостим связывается и активирует TPO-R на предшественниках мегакариоцитов в костном мозге. Он связывается так же, как эндогенный TPO, и может вытеснять TPO из связи с рецептором. Ромиплостим, аналогично TPO, активирует многие из тех же путей, что приводит к устойчивому повышению количества тромбоцитов (BUSSEL J. B. et al., 2021).

Однако этот препарат производится за пределами РФ, что повышает его стоимость

для потребителя, а при создании биоаналога используются более новые технологии, что в конечном счёте влияет на стоимость их производства (WOLFF-HOLZ E. et al., Evolution of the EU biosimilar framework: past and future, *BioDrugs*, 2019, V. 33, N. 6, p.621-634). Поскольку при ИТП приём стимуляторов тромбопоэза требуется постоянно (СУНЦОВА Е. В. и др., Применение ромиплостима при впервые выявленной иммунной тромбоцитопении у детей, *Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии*, 2020, V. 19, N. 1, с.18-26), их наличие и экономическая доступность являются жизненно важными для пациентов. Создание биоаналога ромиплостима позволит повысить доступность лечения на территории РФ.

При этом, при создании биоаналогов или улучшении известных терапевтических средств важным элементом являются способы определения их биологической активности *in vitro*, позволяющие отбирать наиболее эффективные варианты на ранних этапах разработки.

Следовательно, разработка новых методов определения биологической активности *in vitro* потенциальных терапевтических средств поможет оптимизировать процесс разработки биоаналогов ромиплостима, и ускорить обеспечение пациентов с ИТП современной терапией.

Важное условие создания современных клеточных тест-систем - выбор клеток, которые способны синтезировать молекулы, специфичные для клинических проявлений заболевания.

Одним из подходов для определения биологической активности *in vitro* ромиплостима или его биоаналогов может быть использование клеток млекопитающих, экспрессирующих экзогенный hTPOR.

На сегодняшний день наиболее часто используемыми системами для доставки ДНК в клетки являются методы на основе вирусов. Аденовирусные и лентивирусные векторные системы, вероятно, являются наиболее эффективными переносчиками генов, которые могут обеспечить высокую эффективность трансдукции, интеграцию в геном клетки-хозяина и высокий уровень экспрессии генов (BLESCH A., Lentiviral and MLV based retroviral vectors for ex vivo and in vivo gene transfer, *Methods*, 2004, V. 33, N. 2, p.164-172).

Однако использование вирусных векторных систем осложняется различными негативными эффектами, в том числе внутриклеточным переносом, потенциальными мутациями и генетическими изменениями из-за интеграции (HACEIN-BEY-ABINA S. et al., A serious adverse event after successful gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency, *New England journal of medicine*, 2003, V. 348, N. 3, p. 255-256; LI Z. et al., Murine leukemia induced by retroviral gene marking, *Science*, 2002, V. 296, N. 5567, p.497-497), что может препятствовать использованию модифицированных клеток в тест-системах для разработки терапевтических средств.

Для предотвращения проявления подобных нежелательных эффектов были разработаны невирусные методы трансфекции. Обычно используемые невирусные системы трансфекции, включая реагенты для липофекции/полифекции, микроинъекцию, генную пушку и электропорацию, гораздо менее эффективны по сравнению с вирусной трансдукцией и часто вызывают высокую смертность клеток из-за токсичности. Нуклеофекция - метод невирусной трансфекции, специально разработанный для первичных клеток и клеточных линий, трудно поддающихся трансфекции. Нуклеофекция объединяет электрические параметры и решения клеточного типа для доставки плазмидной ДНК, олигонуклеотидов, а также миРНК непосредственно в ядро клетки. Следовательно, такая трансфекция клеток не зависит от клеточного деления, и высокая

эффективность трансфекции может быть достигнута в свежих или иммортализованных первичных клетках (GRESCH O. et al., New non-viral method for gene transfer into primary cells, Methods, 2004, V. 33, N. 2, p.151-163).

Эта технология была успешно применена для трансфекции НК- и моноцитарных клеточных линий, первичным миообластам, а также к эмбриональным и нейральным стволовым клеткам (QUENNEVILLE S. P. et al., Nucleofection of muscle-derived stem cells and myoblasts with ϕ C31 integrase: stable expression of a full-length-dystrophin fusion gene by human myoblasts, Molecular Therapy, 2004, V. 10, N. 4, p.679-687; BALASUBRAMANIYAN V. et al., Transient expression of Olig1 initiates the differentiation of neural stem cells into oligodendrocyte progenitor cells, Stem Cells, 2004, V. 22, N. 6, p.878-882; LAKSHMIPATHY U. et al., Efficient transfection of embryonic and adult stem cells, Stem cells, 2004, V. 22, N. 4, p.531-543).

Таким образом, клетки, трансфецированные плазмидной ДНК, обеспечивающей экспрессию рецептора тромбопоэтина человека, посредством нуклеофекции, могут быть использованы в тест-системе для определения биологической активности новых искусственных агонистов рецептора тромбопоэтина человека и при проведении исследований их иммуногенности.

КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Все термины и сокращения, используемые в настоящей заявке, употребляются в том же значении, как это принято в данной области техники, и понятны специалистам.

Настоящее изобретение относится к тест-системе для определения биологической активности искусственных агонистов рецептора тромбопоэтина человека.

Термины «белок», «пептид» и «полипептид» использованы взаимозаменяемо.

Для целей настоящего изобретения, термин «искусственный агонист» подразумевает молекулу небелковой или белковой природы, в том числе, но не ограничиваясь, химическое соединение, сконструированный пептид, полипептид, белок, антитело или его фрагмент, конъюгат, белковую конструкцию, а также природный агонист рецептора, полученный рекомбинантным путем или методами химического синтеза, в том числе методами твердофазного синтеза, и др.

Термин «биологическая активность искусственных агонистов рецептора тромбопоэтина человека» в настоящем описании означает биологические свойства, характерные для агонистов рецептора тромбопоэтина человека, а именно специфичное связывание с рецепторами тромбопоэтина человека, что приводит к активации JAK/STAT-сигнального пути и устойчивому повышению количества тромбоцитов (см., например, BUSSEL J. B. et al., 2021).

Применение термина «содержат», «содержащие», «содержит», «включает», «включающий» или «включают» на протяжении всего текста и формулы изобретения данной заявки подразумевает включение приведенного числа или стадии или группы чисел или стадий, но не исключение какого-либо другого числа или стадии или стадии или группы чисел или стадий.

Термин «вектор», использованный в данном описании, относится к молекуле нуклеиновой кислоты, обладающей способностью репродуцировать другую нуклеиновую кислоту, с которой она соединена. Термин включает в себя вектор как самореплицирующуюся нуклеиновокислотную структуру, в том числе «клонированный вектор», а также вектор, встроенный в геном клетки хозяина, в которую он введен. Некоторые векторы способны направлять экспрессию нуклеиновых кислот, с которыми они функционально связаны. Такие векторы называются в данном описании «экспрессирующими векторами».

Термины «клетка-хозяин», «линия клеток хозяина» и «культура клеток хозяина» используются взаимозаменяемо и относятся к клеткам, в которые введена экзогенная нуклеиновая кислота, включая потомство таких клеток. Клетки хозяина включают «трансформанты» и «трансфицированные клетки», которые включают первичную трансфицированную клетку и ее потомство безотносительно числа пересевов. Потомство может быть не полностью идентичным родительской клетке по составу нуклеиновых кислот, а может содержать мутации. Мутантное потомство, которое обладает той же функцией или биологической активностью, по которой проводят скрининг или отбирают первоначально трансфицированную клетку, включено в данное изобретение.

Термин «приведение в контакт», используемый в соответствии со способом согласно настоящему изобретению, означает приведение клеток и соответствующих антител в физическую близость с обеспечением физического и/или химического взаимодействия. Подходящие условия, обеспечивающие специфическое взаимодействие, хорошо известны специалистам в данной области техники. Очевидно, указанные условия будут зависеть от антител и клеток, применяемых в способе согласно настоящему изобретению, и могут быть модифицированы обычным способом специалистом в данной области техники. Более того, время, достаточное для обеспечения взаимодействия, также может быть сразу определено квалифицированным специалистом.

ВАРИАНТЫ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение относится к тест-системе для определения биологической активности искусственных агонистов рецептора тромбопоэтина человека.

В одном из воплощений настоящего изобретения, тест-система включает в себя клетку, экспрессирующую рекомбинантный человеческий рецептор тромбопоэтина с SEQ ID NO:1 (hTPOR).

В одном из воплощений настоящего изобретения hTPOR-экспрессирующие клетки представляют собой клетки мыши (*Mus musculus*).

В одном из воплощений настоящего изобретения hTPOR-экспрессирующие клетки представляют собой клетки линии 32D clone 3.

В одном из воплощений настоящего изобретения, экспрессия hTPOR в клетках тест-системы достигается путем нуклеофекции клеток-хозяев вектором, обеспечивающим экспрессию hTPOR.

Специалистам в данной области известно множество методик осуществления нуклеофекции клеток млекопитающих (см., например, CHICAYBAM L. et al., An efficient electroporation protocol for the genetic modification of mammalian cells, *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 2017, V. 4, p.99). Для целей настоящего изобретения могут быть использованы такие системы для нуклеофекции как Амаха или иные.

Настоящее изобретение также относится к способу определения биологической активности *in vitro* искусственных агонистов рецептора тромбопоэтина человека

Биологическая активность, в соответствии с настоящим описанием, может быть исследована различными, хорошо известными способами, включая, например, эксперименты по конкурентному связыванию с hTPOR или вестерн-блоттинг.

В одном из воплощений настоящего изобретения специфическое связывание с hTPOR может быть обнаружено на основании пролиферации hTPOR-экспрессирующих клеток.

Настоящее изобретение также относится к способу определения антител к искусственным агонистам рецептора тромбопоэтина человека в плазме крови человека.

В одном из воплощений настоящего изобретения специфическое связывание с hTPOR может быть обнаружено по отсутствию пролиферации hTPOR-экспрессирующих клеток в присутствии антител к искусственным агонистам рецептора тромбопоэтина человека.

Специалисту в данной области также хорошо известны множество методик анализа жизнеспособности и пролиферации клеток, в том числе посредством люминесцентного теста - путем измерения уровня люминесценции клеток при добавлении люминесцентного сигнала, каждая из которых может быть использована в предложенном изобретении.

5 Для целей настоящего изобретения могут быть использованы такие системы определения жизнеспособности клеток как CellTiter-Glo или иные (см., например, АФАНАСЬЕВА А. Н. и др., Выбор оптимального метода детекции жизнеспособности клеточных культур для тестов на пролиферативную активность и цитотоксичность, Лабораторные животные для научных исследований, 2021, N. 2, с.16-24).

10 В предпочтительном варианте осуществления, настоящее изобретения относится к тест-системе для определения биологической активности искусственных агонистов рецептора тромбопоэтина человека, включающей клетки линии 32D clone 3 трансфецированные вектором, содержащим нуклеотидную последовательность, кодирующую человеческий рецептор тромбопоэтина (SEQ ID NO:1) посредством нуклеофекции.

В одном из предпочтительных вариантов осуществления, настоящее изобретения относится к способу определения биологической активности *in vitro* искусственных агонистов рецептора тромбопоэтина человека, включающему:

а) Приведение вышеуказанной тест-системы в контакт с искусственным агонистом рецептора тромбопоэтина человека;

б) анализ пролиферации клеток посредством люминесцентного теста.

В одном из предпочтительных вариантов осуществления, настоящее изобретения относится к способу определения антител к искусственным агонистам рецептора тромбопоэтина человека в плазме крови человека, включающему:

а) приведение тест-системы по п.1 в контакт с искусственным агонистом рецептора тромбопоэтина человека;

б) анализ пролиферации клеток посредством люминесцентного теста.

В одном из предпочтительных вариантов осуществления изобретения, искусственный агонист рецептора тромбопоэтина человека представляет собой белок.

30 В одном из предпочтительных вариантов осуществления изобретения, искусственный агонист рецептора тромбопоэтина человека представляет собой ромиплостим.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

Фигура 1. Зависимость уровня пролиферации hTPOR-экспрессирующих клеток линии 32D clone 3 от концентрации ромиплостима, данные представлены в виде Mean RLU $\pm$ SD.

Фигура 2. Специфичность ответа hTPOR-экспрессирующих клеток линии 32D clone 3. На графике представлена зависимость уровня пролиферации hTPOR-экспрессирующих клеток от концентрации исследуемого объекта, данные представлены в виде Mean $\pm$ SD.

40 Фигура 3. График зависимости RLU от концентрации gNABs с константной концентрацией ромиплостима 1 нг/мл.

ОСУЩЕСТВЛЕНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Пример 1. Получение hTPOR-экспрессирующих клеток.

45 Для получения hTPOR-экспрессирующих клеток были использованы клетки линии лимфобластов мыши (*Mus musculus*) 32D clone3 (ATCC; кат. CRL-11346), которые были трансфецированы вектором, содержащим мРНК, кодирующую полную последовательность человеческого рецептора тромбопоэтина (SEQ ID NO:1) и клонированную в сайты KpnI и XbaI вектора pCMV3 (Sino Biological; кат. HG10443-UT).

Доставка вектора в ядро была произведена методом нуклеофекции на приборе Nucleofector 2b Device с помощью набора реагентов Amaxa Cell Line Nucleofector Kit V (Lonza VCA-1003). Каждая тестовая пробирка для нуклеофекции содержала 1×10^6 клеток, 2 мкг вектора экспрессии hTPOR-R и 100 мкл раствора Cell Line Nucleofector Solution V.

После нуклеофекции клетки инкубировались в CO₂-инкубаторе при температуре 37°C, в атмосфере 5% CO₂. После 48 часов к клеткам был добавлен селективный антибиотик гигромицин В. Селекция проводилась на шестой день в присутствии 0,6 мг/мл гигромицина, селективную среду заменяли каждые 48 часов.

Пример 2. Определение биологической активности ромиплостима.

Для подтверждения возможности использования предложенной тест-системы для определения биологической активности искусственных агонистов рецептора тромбопоэтина человека в качестве агониста hTPOR использовался ромиплостим, биологическая активность и терапевтическая эффективность которого широко известна из уровня техники.

Культивирование hTPOR-экспрессирующих клеток осуществляли в среде RPMI 1640 + 2 mM L-глутамин с содержанием 1,5 г/л бикарбоната натрия, 4,5 г/л глюкозы, 10 mM ХЕПЕС и 1 mM пирувата натрия (далее RPMI Basal) с добавлением 10% FBS, 5 нг/мл IL-3 и 0,3 мг/мл Гигромицин В.

Для целей определения биологической активности ромиплостима брали клетки, прошедшие логарифмическую фазу роста, но не вышедшие на плато, а также использовали среду без IL-3 и Гигромицин В, т.к. эти растворы влияют на пролиферативную активность.

Изначально готовили 10-ти кратные разбавления объекта испытания (далее ОИ) в среде RPMI Basal + 10% FBS. Для этого производили 2 независимых предразбавления до концентрации 5000 нг/мл для стандартного образца (далее СО) и внутреннего контрольного образца (далее ВКО). В качестве СО и ВКО выступала одна серия препарата Энплейт. В качестве ОИ выступала серия плацебо, содержащее раствор вспомогательных веществ препарата ромиплостим.

Затем из каждого разбавления СО, ВКО и ОИ с концентрацией 5000 нг/мл в микроцентрифужной пробирке готовили разбавления с концентрацией 100 нг/мл (данная концентрация 10-ти кратная и вносилась в лунки) по схеме 20 мкл образца + 980 мкл RPMI Basal + 10% FBS с осторожным вортексированием.

Из растворов СО, ВКО и ОИ с концентрацией 100 нг/мл готовили серийные разведения в RPMI Basal+ 10% FBS до концентраций: 33; 11; 4; 2; 0,93; 0,46; 0,23; 0,08; 0,03; 0,01 нг/мл. Приготовленные 10х растворы образцов вносили в лунки планшета по 10 мкл. Затем готовили клеточную суспензию hTPOR-экспрессирующих клеток линии 32D clone3 с концентрацией 55 555 клеток/мл и вносили в лунки по 90 мкл.

На следующий день после посева клеток добавляли реагент CellTiter-Glo в объеме, равном объему среды для культивирования клеток, присутствующему в каждой лунке. Содержимое лунок смешивали на орбитальном планшетном шейкере в течение 2 минут, чтобы вызвать лизис клеток. Инкубировали планшет при комнатной температуре в течение 10 минут, чтобы стабилизировать люминесцентный сигнал. Затем записывали свечение, используя gain 3000; программу Ultra Glo; время регулирования 0.1; интервал измерений 0.40; время для нормализации результатов 5.00. Непосредственно перед снятием свечения устанавливали в мультимодальном микропланшетном ридере CLARIOstar опцию шейкирования на 500 rpm в течение 30 сек. Результаты представлены на Фиг.1.

Оценивали уровень пролиферативной активности hTPOR-экспрессирующих клеток

в исследуемых концентрационных точках. Для плацебо использовали разведения, идентичные разведениям ромиплостима каждой концентрации. Результаты нормализовали по шкале от 0 до 100 %, где за 0% принимался уровень пролиферации клетками без внесения исследуемых объектов, а за 100 % - максимальный уровень пролиферации в ответ на стимуляцию ромиплостимом. Графическое представление полученных данных представлено на Фигуре 2, численные значения приведены в таблице 1.

Раствор Концентрация, нг/мл	Концентрация, нг/мл										
	0,001	0,003	0,01	0,02	0,05	0,1	0,2	0,4	1,1	3,3	10
	Пролиферативная активность, % (Mean, n=8)										
Ромиплостим	-0,2	0,1	2,3	7,6	13,4	26,9	44,1	70,6	91,9	101,5	102,1
Плацебо	-0,62	-1,16	-0,43	-0,42	0,02	0,27	0,02	-0,18	-0,11	-0,26	-0,58

Таблица 1. Пролиферативная активность hTPOR-экспрессирующих клетками линии 32D clone3 в зависимости от концентрации ромиплостима.

Из приведенных выше данных видно, что в максимальной концентрации значение пролиферативной активности для раствора Плацебо Ромиплостим составляет -0,26% от максимального значения, а для Энплейт это 101,5%. Таким образом значения для Плацебо в 309 раз отличаются от таковых для растворов, имеющих в составе лекарственное вещество (ромиплостим).

Таким образом, ответ тест-системы hTPOR-экспрессирующих клеток линии 32D clone3 специфичен по отношению к ромиплостиму, что подтверждает возможность её использования для определения биологической активности искусственных агонистов рецептора тромбопоэтина человека.

Пример 3. Определение антител к ромиплостиму

Ромиплостим проявляет свою активность за счет связывания с тромбопоэтиновым рецептором, которое ведет к активации MAPK каскада и активной пролиферации клеток с накоплением АТФ. Как было показано выше, интенсивность люминесцентного сигнала при анализе пропорциональна функциональной активности ромиплостима в исследуемом образце. В присутствии нейтрализующих антител к ромиплостиму (rNABs) количество свободного ромиплостима снижается, приводя к снижению пролиферации и концентрации АТФ. Таким образом, интенсивность люминесценции обратно пропорциональна количеству нейтрализующих антител в исследуемом образце.

Рассев клеток, внесение ромиплостима и rNABs проводили в один день. Готовили раствор препарата ромиплостим с концентрацией 1 нг/мл в среде RPMI Basal + 10% FBS, раствор вносили в лунки 96- луночного планшета в объеме 10 мкл. Затем из стокового раствора rNABs с концентрацией 2 160 мкг/мл готовили серийные разведения в RPMI Basal + 10% FBS или пулированной плазме крови человека до концентраций: 50 000, 25 000, 12 500, 5 000, 2 500, 1 000, 500, 250, 100, 10 нг/мл - данные концентрации 10-кратные вносились в лунки в объеме 10 мкл для получения калибровочной кривой. Тестовые образцы плазмы предварительно разводили в 4 раза средой RPMI Basal.

Планшеты с раствором ромиплостим + rNABs инкубировали в течение 1 часа на шейкере при 37°C, 200 об/мин.

По завершении инкубации, вносили в лунки по 80 мкл с уже добавленным раствором ромиплостима и нейтрализующих антител к ромиплостиму в раститровке концентраций и снимали хемилюминесценцию с помощью набора CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay (Promega, G7571).

Результаты приведены в Таблице 2 (CV - коэффициент вариации, Mean - среднее арифметическое, RLU - относительная единица люминесценции).

Концентрация гNABs, нг/мл	RLU			Mean, ОП	CV%
1	162225	169187	162600	164671	2%
10	155937	159737	165950	160541	3%
25	155737	154575	153800	154704	1%
50	122250	138112	132737	131033	6%
100	72150	81537	81087	78258	7%
250	33987	36200	40662	36950	9%
500	23812	24662	26837	25104	6%
1250	22462	21687	23962	22704	5%
2500	22137	21712	23312	22387	4%
5000	20850	22762	22450	22021	5%

Таблица 2. Пролиферативная активность hTPOR-экспрессирующих клетками линии 32D clone3 в зависимости от концентрации нейтрализующих антител к ромиплостиму.

Для метода определения концентрации нейтрализующих антител к ромиплостиму в плазме крови человека определена нелинейная зависимость на всем диапазоне концентраций гNABs от 1 до 5000 нг/мл. Полученные данные моделируются функцией, являющейся нелинейной комбинацией параметров модели и зависящей от одной и более независимых переменных. Линейный диапазон методики от 25 до 1250 нг/мл.

С помощью метода наименьших квадратов была выбрана 4-х параметрическая кривая как функция, наиболее близко описывающая зависимость результатов теста от концентрации антител. На Фигуре 3 представлены результаты в виде графика зависимости RLU от концентрации гNABs с константной концентрацией ромиплостима 1 нг/мл, приведен коэффициент детерминации.

Таким образом, предложенная методика является линейной, специфичной, высокоточной, правильной и селективной методикой определения нейтрализующих антител к ромиплостиму в плазме крови человека, что подтверждает возможность её использования для определения нейтрализующих антител к искусственным агонистам рецептора тромбопоэтина человека в образцах плазмы крови человека при проведении клинических исследований иммуногенности.

```

<?xml version="1.0" encoding="UTF-8"?>
<!DOCTYPE ST26SequenceListing PUBLIC "-//WIPO//DTD Sequence Listing
1.3//EN" "ST26SequenceListing_V1_3.dtd">
<ST26SequenceListing dtdVersion="V1_3" fileName="Тест-система и
способы определения биологической активности агонистов рецептора
тромбопоэтина человека.xml" softwareName="WIPO Sequence"
softwareVersion="2.2.0" productionDate="2023-01-19">
  <ApplicantFileReference>00000001</ApplicantFileReference>
  <ApplicantName languageCode="ru">ООО
  &quot;ГЕРОФАРМ&quot;</ApplicantName>
  <ApplicantNameLatin>ООО &quot;GEROPHARM&quot;</ApplicantNameLatin>
  <InventionTitle languageCode="ru">Тест-система и способы определения
биологической активности агонистов рецептора тромбопоэтина
человека</InventionTitle>
  <SequenceTotalQuantity>1</SequenceTotalQuantity>
  <SequenceData sequenceIDNumber="1">
    <INSDSeq>
      <INSDSeq_length>1908</INSDSeq_length>
      <INSDSeq_moltype>RNA</INSDSeq_moltype>
      <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>

```

```

<INSDSeq_feature-table>
<INSDFeature>
  <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
  <INSDFeature_location>1..1908</INSDFeature_location>
5  <INSDFeature_qual>
    <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>mRNA</INSDQualifier_value>
    </INSDQualifier>
10  <INSDQualifier id="q2">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>Homo sapiens</INSDQualifier_value>
    </INSDQualifier>
  </INSDFeature_qual>
15 </INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>atgccctcctgggcccctcttcatggtcacctcctgcctcctcctggccc
ctcaaacctggcccaagtcagcagccaagatgtctccttgctggcatcagactcagagcccctgaagtg
tttctcccgaacatttgaggacctcacttgcttctgggatgaggaagaggcagcgcccagtgggacatac
20 cagctgctgtatgcctacccgcgggagaagccccgtgcttgccccctgagttcccagagcatgccccact
ttggaacccgatacgtgtgccagtttccagaccaggaggaagtgcgtctcttctttccgctgcacctctg
ggtgaagaatgtgttcctaaaccagactcggactcagcgagtcctctttgtggacagtgtaggcctgccg
gctccccccagtatcatcaaggccatgggtgggagccagccaggggaacttcagatcagctgggaggagc
cagctccagaaatcagtgatttcctgaggtacgaactccgctatggccccagagatcccaagaactccac
25 tgggtcccacggtcatacagctgattgccacagaaacctgctgccctgctctgcagaggcctcactcagcc
tctgctctggaccagtctccatgtgctcagcccacaatgccctggcaagatggaccaaagcagacctccc
caagtagagaagcttcagctctgacagcagaggggtggaagctgcctcatctcaggactccagcctggcaa
ctcctactggctgcagctgcgcagcgaacctgatgggatctccctcgggtggctcctggggatcctgggtcc
ctccctgtgactgtggacctgcctggagatgcagtggcacttggaactgcaatgctttaccttggaacctga
30 agaattgtacctgtcaatggcagcaacaggaccatgctagctcccaaggcttcttctaccacagcagggc
acggtgctgccccagagacaggtacccccatctgggagaactgcgaagaggaagagaaaaacaaatccagga
ctacagacccccacagttctctcgctgccacttcaagtcacgaaatgacagcattattcacatccttgtgg
aggtgaccacagccccgggtactgttcacagctacctgggctcccctttctggatccaccaggctgtgcg
cctccccaccccaaacttgcactggaggggagatctccagtgggcatctggaattggagtggcagaccca
35 tcgtcctgggcagcccaagagacctgttatcaactccgatacacaggagaaggccatcaggactggaagg
tgctggagccgcctctcggggcccgaggaggaccctggagctgcgcccgcgatctcgctaccgtttaca
gctgcgcgccaggctcaacggccccacctaaggtccctggagctcgtggtcggacccaactagggtg
gagaccgccaccgagaccgcctggatctccttggtgaccgctctgcatctagtgtggcctcagcgccg
tcctgggcctgctgctgctgaggtggcagtttcctgcacactacaggagactgaggcatgcctgtggcc
40 ctacttccagacctgcaccgggtcctaggccagtaccttagggacactgcagccctgagcccgcccaag
gccacagtctcagatacctgtgaagaagtggaaaccagcctccttgaaatcctccccaaagtccctcagaga
ggactcctttgcccctgtgttcctcccaggcccagatggactaccgaagattgcagccttcttgctggg
gaccatgcccctgtctgtgtgcccacccatggctgagtcagggctcctgctgtaccacccacattgccaac
cattcctacctaccactaagctattggcagcagccttaa</INSDSeq_sequence>
45 </INSDSeq>
  </SequenceData>
</ST26SequenceListing>

```

(57) Формула изобретения

1. Тест-система для определения биологической активности искусственных агонистов рецептора тромбопоэтина человека, включающая клетки линии 32D clone 3 трансфицированные вектором, содержащим нуклеотидную последовательность, кодирующую человеческий рецептор тромбопоэтина с SEQ ID NO:1.

2. Тест-система по п.1, где искусственный агонист рецептора тромбопоэтина человека представляет собой белок.

3. Тест-система по п.1, где искусственный агонист рецептора тромбопоэтина человека представляет собой ромиплостим.

4. Способ определения биологической активности *in vitro* искусственных агонистов рецептора тромбопоэтина человека, включающий:

а) приведение тест-системы по п.1 в контакт с искусственным агонистом рецептора тромбопоэтина человека;

б) анализ пролиферации клеток посредством люминисцентного теста.

5. Способ по п.4, где искусственный агонист рецептора тромбопоэтина человека представляет собой белок.

6. Способ по п.4, где искусственный агонист рецептора тромбопоэтина человека представляет собой ромиплостим.

7. Способ определения антител к искусственным агонистам рецептора тромбопоэтина человека в плазме крови человека, включающий:

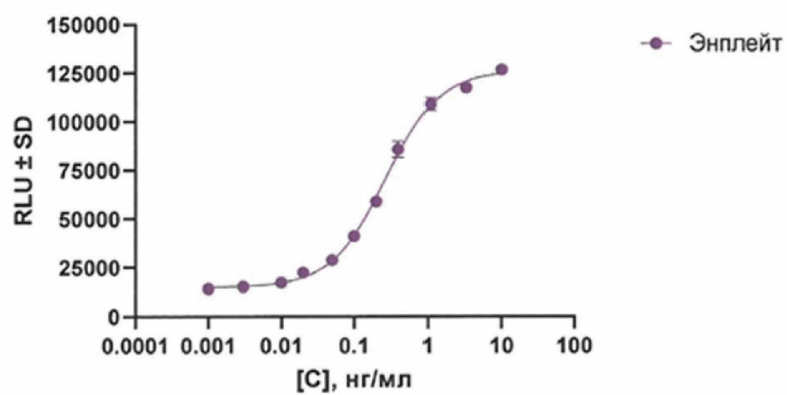
а) приведение тест-системы по п.1 в контакт с искусственным агонистом рецептора тромбопоэтина человека и образцом плазмы;

б) анализ пролиферации клеток посредством люминисцентного теста.

8. Способ по п.7, где искусственный агонист рецептора тромбопоэтина человека представляет собой белок.

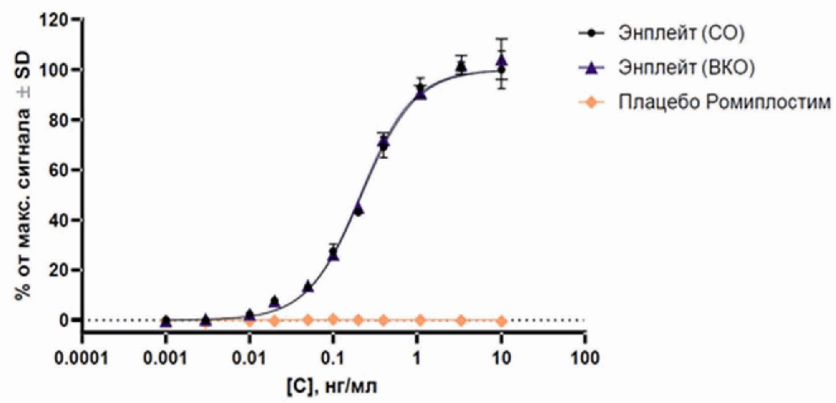
9. Способ по п.7, где искусственный агонист рецептора тромбопоэтина человека представляет собой ромиплостим.

1

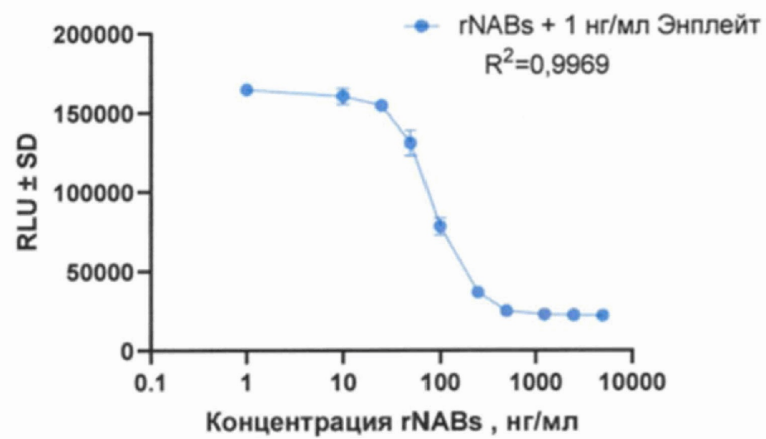


Фиг. 1

2



Фиг. 2



Фиг. 3