

ERITROPOYETINA HUMANA RECOMBINANTE HIPOSIALILADA, MÉTODOS DE PURIFICACIÓN Y USOS TERAPÉUTICOS DE ESTA

CAMPO DE LA TÉCNICA

- 5 La presente invención se relaciona con las ramas de la Biotecnología y la Medicina, especialmente con la obtención de una composición farmacéutica de eritropoyetina humana recombinante con un patrón de glicosilación que le confiere propiedades que permiten su uso en alteraciones del sistema nervioso.

ANTECEDENTES

- 10 La eritropoyetina (EPO) es una hormona de naturaleza glicoproteica formada por 166 aminoácidos y tiene un peso molecular de 30.4 kDa (Lanfranco, F y Strasburger, C. J. (2016) Sports Endocrinology 47: 115-27). La EPO se produce naturalmente en las células perisinusoidales del hígado en la etapa fetal y el período perinatal y en los fibroblastos intersticiales de los riñones en la edad adulta predominantemente. Esta
15 hormona estimula la producción de glóbulos rojos en la médula ósea y juega un papel importante en la respuesta del cerebro al daño neuronal (Sirén L. y cols. (2001) Proc Natl Acad Sci USA 98(7): 4044-9).

- La EPO es una molécula altamente glicosilada y su porción de carbohidratos contribuye al 40% de su peso molecular. Esta proteína contiene cuatro cadenas complejas de
20 oligosacáridos unidas a la cadena polipeptídica, tres de ellas en uniones del tipo N y una en una unión del tipo O, cuya ubicación ha sido bien descrita por diferentes autores Elliott, S. y cols. (2004) The Journal of Biological Chemistry, 279(16): 16854-16862; Watson y cols. (1994) Glycobiology 4(2): 227-237). Los oligosacáridos con uniones del tipo N pueden contener un número variable de residuos terminales de ácido siálico y
25 son críticos para la secreción, la estabilidad molecular, la unión al receptor y la actividad *in vivo* (Egrie, J. y Browne, J. (2001) Br. J. Cáncer, 84(1): 3-10; Goldwasser y cols. (1974) J. Biol. Chem 249: 4202-4206).

- Durante la última década del pasado siglo y las que transcurren del presente, se ha acumulado un elevado número de evidencias sobre las propiedades neuroprotectoras
30 de la EPO humana recombinante (EPOhr). En 1998 Sakanara y colaboradores en un modelo de isquemia global en gerbos, demostraron que después de la oclusión de la arteria carótida común, el suministro de EPOhr a través de los ventrículos laterales, producía una reducción del daño isquémico sobre las neuronas del hipocampo en CA1 (Sakanara, M. y cols. (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95: 4635-4640).

- 35 Los efectos citoprotectores de la EPO en el sistema nervioso central han sido demostrados por Maiese y colaboradores en el 2004 y posteriormente por Viviani y

colaboradores en el 2005. (Maiese, K. y cols. (2004) Trends in Pharmacological Sciences 25(11): 577-83; Viviani, D. y cols. (2005) Journal of Neurochemistry 93(2): 257-268). A pesar de toda la información acumulada en estudios no clínicos sobre esta EPO hematopoyética, los resultados alcanzados no se han podido reproducir en la clínica,
5 debido a los efectos adversos que se producen en los pacientes por el uso prolongado de la misma.

En adultos, la expresión del receptor de la EPO en el sistema nervioso se encuentra principalmente en neuronas, astrocitos y microglías, mientras que la EPO es producida por astrocitos (Nagai, A. y cols. (2001) Journal of Neuropathology & Experimental
10 Neurology, 60(4): 317-319, siendo esta última una EPO hiposialilada.

Es por ello que un número importante de investigadores se han dado a la tarea de modificar la EPOhr para lograr un fármaco con las mismas propiedades neuroprotectoras pero sin los efectos adversos provocados por la acción hematopoyética. Este es el caso de la EPO denominada AsialoEPO (US 2004/0122216),
15 la cual es obtenida mediante una desialilación enzimática total de la rhEPO y aunque tiene una alta afinidad por el receptor de esta, su vida media en el plasma es extremadamente corta, lo que limita su acción protectora. Otro ejemplo de modificación es la transformación de lisina en homocitrulina por la carbamilación de la proteína dando lugar a una EPO carbamylada a la que se llamó CEPO (Leist, M., Ghezzi, P., Grasso,
20 G., et al. (2004) 305(5681): 239-242). Aunque ambas EPOs no poseen efecto hematopoyético, en ensayos clínicos realizados con la CEPO, si bien no se observaron efectos adversos, tampoco fue demostrada su efectividad neuroprotectora.

En la solicitud de patente WO 2007/009404 se reivindica diferentes formulaciones nasales de una EPO de bajo contenido de ácido siálico, denominada más tarde como
25 NeuroEPO en una publicación de sus autores (Garcia, JC y Sosa, I. (2009) The Scientific World Journal, 9: 970-981.). En esta patente se reclama una EPOhr obtenida por un proceso de fermentación en fibra hueca y uno de purificación por intercambio iónico para separar las isoformas más ácidas (con mayor contenido de ácido siálico de las de menos contenido de ácido siálico). Dicha NeuroEPO presenta un perfil de 13 isoformas, de la
30 cuales comparte 9 con la EPOhr ácida denominada EPOCIM®.

Por primera vez, los inventores de la presente invención describen un proceso productivo de fermentación en tanque agitado (TA) combinado con un paso cromatográfico de purificación que emplea una columna monolítica como intercambiador aniónico con un ligando amonio cuaternario Q, capaz de aumentar la
35 expresión de las isoformas de EPOhr sin modificaciones químicas y genéticas adicionales que tienen un perfil de punto isoelectrico entre 4,25 y 5,85. Dichas isoformas

presentan una estructura terciaria asociada a glicosilación diferente a la NeuroEPO que proporciona una mayor efectividad en los mecanismos de neuroprotección y neurorestauración tanto *in vitro* como *in vivo*.

BREVE DESCRIPCION DE LA INVENCION

5 En una realización es objeto de la presente invención una composición farmacéutica caracterizada porque comprende como principio activo una EPOhr con un perfil de isoformas con punto isoelectrico comprendido entre 4,25 y 5,85. Dicho EPOhr tiene una microheterogeneidad de N-glicanos fucosilados formada por estructuras bi, tri y tetra-
10 antenarias, que presentan residuos de ácidos siálicos mono y bi-sialilados en un rango de 40-60% del total de glicanos, los trisialilados entre un 40-43% y los tetrasialilados entre 10-13% y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

Particularmente, el sitio de O-glicosilación en la serina 126 presenta 3 sialoformas entre 0 y 2 residuos de ácido siálico, la estructura monosialilada es la más abundante y comprende entre el 78 al 82% del total de glicanos y las estructuras asialiladas
15 representan entre el 6-10% del total de glicanos.

El sitio de N- glicosilación de la asparagina 83 comprende:

- estructuras biantenarias fucosiladas con 1 y 2 residuos de ácido siálico, donde dichas estructuras se encuentran en un rango entre el 8-12% del total de glicanos,
- 20 - estructuras triantenarias fucosiladas con 1, 2 y 3 residuos de ácido siálico estas estructuras constituyen del 17 al 21% del total de glicanos,
- estructuras tetraantenarias fucosiladas, que presentan entre 1 a 4 residuos de ácido siálico, dichas estructuras constituyen del 27-31% del total de glicanos y
- estructuras tetraantenarias fucosiladas con 1 y 2 N-acetil lactosamina que
25 presentan entre 1 a 4 residuos de ácido siálico, estas estructuras se encuentran en un rango del 38-42% del total de glicanos.

Como excipientes farmacéuticamente aceptables para la composición farmacéutica que se reclama en la presente invención se encuentran polímeros bioadhesivos como hidroximetilcelulosa, hidroxipropilcelulosa y metilcelulosa, sin restringirse a estos y
30 estabilizantes de proteínas como L-triptófano, L-leucina, clorhidrato de L-arginina y clorhidrato de L-histidina.

La estructura anteriormente descrita de las isoformas de EPOhr que forman parte de las composiciones farmacéuticas objeto de la presente invención le proporciona a las mismas una mayor efectividad en los mecanismos de neuroprotección y
35 neurorestauración tanto *in vitro* como *in vivo*.

En otra realización es objeto de la presente invención un método para la obtención de una EPOhr no modificada donde tiene lugar un proceso de fermentación en TA en modo perfusión a una temperatura en el rango de 34 ± 2 °C, con un medio de cultivo libre de proteínas con pH en el rango de 7,2-7,3, este medio se suplementa con glutamina hasta
5 una concentración final de 8-12 mmol/L. Este método emplea además un proceso de purificación donde tiene un paso cromatográfico con columna monolítica como intercambiador aniónico con un ligando amonio cuaternario Q, como tampón de equilibrio se utiliza una solución de Tris 20 mmol/L HCl 10 mmol/L a pH 7,9-8,10 y conductividad 1,35-1,65 mS/cm y como tampón de elución el acetato de sodio 50
10 mmol/L pH 4,3-4,5 y conductividad 2-3,5 mS/cm.

Con el método descrito en la presente solicitud se obtiene una composición farmacéutica con un incremento de isoformas con bajo contenido de ácido siálico que tienen una estructura terciaria asociada a glicosilación diferente a la NeuroEPO lo que les proporciona una mayor efectividad en los mecanismos de neuroprotección y
15 neurorestauración tanto *in vitro* como *in vivo*.

Además es objeto de la presente invención el uso de la composición farmacéutica que se aquí descrita para el tratamiento de la demencia, ictus, parkinson, ataxia, traumas craneo-encefálicos, glaucoma, autismo, hipoxia del recién nacido, esclerosis múltiple, esclerosis lateral amiotrófica y daño neurológico inducido por trauma, intoxicación o
20 radiaciones. Particularmente, se describe un método para el tratamiento con esta composición farmacéutica en un sujeto que lo necesite donde se lleva a cabo la administración de la misma desde una a tres veces por semana en períodos desde seis hasta 12 meses en un rango de administración de 0,1 mg a 4 mg en un volumen de 1mL.

25 DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

Composiciones farmacéuticas

La EPOhr objeto de la presente invención se caracteriza por tener con un perfil de punto isoeléctrico comprendido entre 4,25 y 5,85; tiene similar estructura secundaria y terciaria de proteína no asociada a la glicosilación que la EPOhr, al igual que mantiene la misma
30 estructura terciaria asociada a la glicosilación con un sitio de O-glicosilación en la Serina 126 y tres sitios de N-glicosilación en las Asparagina 24, 38 y 83. La composición de carbohidratos de la EPOhr aquí descrita es lo que la hace diferente de otras EPOhr. La microheterogeneidad de N-glicanos fucosilados está comprendida por estructuras bi, tri y tetra-antenarias que presentan residuos de ácidos siálicos mono y bi-sialilados en un
35 rango entre el 40-60% del total de carbohidratos, preferentemente en un intervalo entre

43-50%, los trisialilados se encuentran entre el 40-43% y los tetrasialilados en un rango del 10-13% de los carbohidratos totales.

Particularmente, el sitio de O-glicosilación en la serina 126 presenta 3 sialoformas entre 0 y 2 residuos de ácido siálico, la estructura monosialilada es la más abundante y
5 comprende entre el 78 al 82% del total de glicanos y las estructuras asialiladas representan entre el 6-10% del total de glicanos.

El sitio de N- glicosilación de la asparagina 83 comprende:

- 10 - estructuras biantenarias fucosiladas con 1 y 2 residuos de ácido siálico, donde dichas estructuras se encuentran en un rango entre el 8-12% del total de glicanos,
- estructuras triantenarias fucosiladas con 1, 2 y 3 residuos de ácido siálico estas estructuras constituyen del 17 al 21% del total de glicanos,
- estructuras tetraantenarias fucosiladas, que presentan entre 1 a 4 residuos de ácido siálico, dichas estructuras constituyen del 27-31% del total de glicanos y
15 - estructuras tetraantenarias fucosiladas con 1 y 2 N-acetil lactosamina que presentan entre 1 a 4 residuos de ácido siálico, estas estructuras se encuentran en un rango del 38-42% del total de glicanos.

Los términos EPOhr hiposialilada, EPO HS o isoformas básicas son utilizados en la presente invención intercambiamente y se refieren a las composiciones
20 farmacéuticas que tienen las características antes descritas y que les hemos denominado comúnmente NeuroEPO plus.

Las composiciones farmacéuticas objeto de la presente invención tienen como principio activo isoformas hiposialiladas de la EPOhr. Estas isoformas hiposialiladas se obtienen a través del proceso descrito en la presente invención, dicho proceso no implica la
25 modificación química y/o genética de la EPOhr para obtenerlas. Las isoformas de EPOhr que forman parte del principio activo de dichas composiciones farmacéuticas presentan una estructura terciaria asociada a glicosilación diferente a la NeuroEPO que proporciona una mayor efectividad en los mecanismos de neuroprotección y neurorestauración tanto *in vitro* como *in vivo*.

30 Las composiciones farmacéuticas objeto de la presente invención se emplean por la vía de administración nasal u oftálmica y se encuentran en forma de soluciones acuosas cuya forma terminada son gotas nasales, "spray" nasal o colirios. Dichas formulaciones farmacéuticas comprenden a la EPOhr hiposialilada como principio activo y opcionalmente excipientes y/o estabilizantes farmacéuticamente adecuados.

35 Los excipientes y/o estabilizantes farmacéuticamente aceptables son no tóxicos para los receptores a las dosis y concentraciones empleadas y pueden incluir polímeros bioadhesivos como hidroximetilcelulosa, hidroxipropilcelulosa y metilcelulosa;

estabilizantes de proteínas como L-triptófano, L-leucina, clorhidrato de L-arginina y/o clorhidrato de L-histidina y sus sales.

Aplicación terapéutica y métodos de tratamiento

- La presente invención brinda composiciones farmacéuticas útiles en el tratamiento de
- 5 alteraciones del sistema nervioso como pueden ser: enfermedades cerebrovasculares, psiquiátricas y neurodegenerativas. Particularmente, dichas enfermedades pueden ser: demencia, ictus, parkinson, ataxia, traumas craneo-encefálicos, glaucoma, autismo, hipoxia del recién nacido, esclerosis múltiple, esclerosis lateral amiotrófica y daño neurológico inducido por trauma, intoxicación o radiaciones.
- 10 La invención incluye un método que comprende administrar a un sujeto que lo necesite la rhEPO hiposialilada desde una a tres veces por semana en períodos desde seis hasta 12 meses. Dicha administración se realizará por vía intranasal (IN), lentamente, por instilación del fármaco en la mucosa. La dosis de administración se encuentra entre 0,1 mg - 4 mg, preferentemente entre 0,5 mg -1 mg. El volumen máximo de administración
- 15 es 1 mL; 0,5 mL por cada fosa nasal, llegando a una dosis total por día de 3 mL. Dicho volumen se puede distribuir en volúmenes menores con intervalos de tiempo de 5-15 minutos entre cada aplicación, preferentemente cada 15 minutos.

Método de obtención de las isoformas hiposialiladas de la EPOhr

- El método que se reclama en la presente invención está compuesto de diferentes etapas y emplea líneas celulares que se describen a continuación:
- 20

Líneas celulares

- Las líneas celulares que se pueden emplear para llevar a cabo el método objeto de la presente invención son las mismas que se han reportado para la producción de EPOhr. Entre las líneas más usadas se encuentran: CHO, COS, BHK, Namalwa, HeLa, Hep3B,
- 25 HepG2, preferentemente para el desarrollo de la presente invención se emplea la línea celular CHO.

Proceso de Fermentación

- El proceso de fermentación de la presente invención se realiza usando la tecnología de TA. Este proceso consta de varias etapas, en la primera se lleva a cabo la
- 30 descongelación de un ampulla del banco de trabajo hasta la temperatura ambiente (18-24°C). Posteriormente ocurre la etapa de expansión donde las células se llevan hasta una concentración celular y viabilidad celular que garantice la inoculación del fermentador semilla con el objetivo de incrementar la biomasa.

Una vez alcanzada una densidad celular $\geq 1 \times 10^6$ células/mL, se comienza la fermentación con diferentes modos de operación. Dichos modos pueden ser: cultivo por lote, cultivo continuo con o sin retención de biomasa.

- 5 Para la obtención de las isoformas hiposialiladas es importante en esta etapa de fermentación garantizar una temperatura en el rango de 34 ± 2 °C y el pH en el rango de $6,8 \pm 0,4$.

Las células crecen en un medio de cultivo libre de proteínas y con una concentración final de glutamina en el rango de 8-12 mmol/L.

Proceso de Purificación

- 10 El proceso de purificación de la EPOhr hiposialilada comprende los siguientes pasos cromatográficos:

Primeramente, se realiza una cromatografía de pseudo-afinidad en ligando coloreado. El objetivo de este paso es la captura de la EPOhr y la eliminación parcial de los principales contaminantes presentes en el sobrenadante (SN). Posteriormente, se realiza una cromatografía de filtración en gel para realizar un cambio de tampón de la proteína a la solución de aplicación para el siguiente paso cromatográfico.

- 15 Luego ocurre una cromatografía de pseudo-afinidad por quelatos metálicos. Este paso tiene como objetivo la captura de la EPOhr y la eliminación total de la fracción de contaminantes que no fueron removidos en los pasos anteriores del proceso. Nuevamente ocurre una cromatografía de filtración en gel para realizar un cambio de tampón a la solución de aplicación del siguiente paso cromatográfico.

- 20 Como etapa crítica del proceso productivo tiene lugar posteriormente una cromatografía de intercambio aniónico con ligando amonio cuaternario Q. En este paso cromatográfico se emplean las columnas monolíticas. El objetivo de esta cromatografía es la separación de las isoformas hiposialiladas (biológicamente activas) de las ácidas, la retención de ADN y la concentración del producto. Aquí se garantiza la obtención de las isoformas hiposialiladas sin contaminación o mezcla con las isoformas ácidas.

- 25 Por último tiene lugar nuevamente una cromatografía de filtración en gel con el objetivo de realizar un cambio de tampón y que la proteína quede en forma de materia prima activa.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1. Perfil de isoformas: A) Definición de corte de las isoformas; B) SN generado en los cultivos en las condiciones de temperatura y pH evaluadas.

- Figura 2.** Proporción de isoformas hiposialiladas para los cultivos en las condiciones de temperatura y pH evaluadas.

Figura 3. Proporción de isoformas hiposialiladas para cada uno de los cultivos en las condiciones evaluadas a escala piloto.

Figura 4. Intensidad relativa de isoformas menos ácidas para el SN.

5 **Figura 5.** Influencia del pH y conductividad de la fase móvil en la capacidad de adsorción estática en el ligando Amonio cuaternario Q de las isoformas de EPOhr: (A) hiposialiladas (básicas), (B) ácidas.

Figura 6. Curvas de ruptura A): Matriz cromatográfica "Q SFF", B): Columna monolítica "CIM QA".

10 **Figura 7.** Influencia del pH del tampón de elución en el rendimiento de isoformas básicas y ácidas.

Figura 8. Distribución de las isoformas hiposialiladas de la EPOhr a escala productiva.

Figura 9. Estudio de los N-glicanos de la EPOhr hiposialilada por cromatografía de líquidos de interacción hidrofílica zwitteriónica acoplada a la espectrometría de masas.

15 **Figura 10.** Electroferograma de iones extraídos (EIE) de las glicoformas observadas del glicopéptido O126 de EPOhr hiposialilada producto de la digestión con de: a) tripsina y neuraminidasa y b) tripsina.

Figura 11. EIE de las glicoformas observadas del glicopéptido N83 producto de la digestión con tripsina y neuraminidasa.

20 **Figura 12.** EIE de las glicoformas observadas del glicopéptido N83 de EPOhr hiposialilada producto de la digestión con de: a) tripsina y neuraminidasa y b) tripsina.

Figura 13: Perfil de viabilidad celular del cultivo de astrocitos a las 24 y 48h posteriores al daño celular con dimetilsulfóxido (DMSO) al 8% y tratamiento posterior con EPOhr hiposialilada.

Figura 14. Gráfico de Kaplan-Meier, viabilidad durante los 7 días de observación.

25 **Figura 15.** Estado neurológico de los animales a las 24 horas del infarto.

Figura 16. Efecto de la aplicación de diferentes isoformas de EPOhr sobre el número de reticulocitos en el modelo de ratón normocitémico.

30 La presente invención queda aún más elaborada con los siguientes ejemplos y dibujos. Sin embargo, estos ejemplos no deberían ser interpretados como una limitación del ámbito de la invención.

EJEMPLOS

Ejemplo 1. El pH y la temperatura influyen sobre el perfil de isoformas de la EPOhr a escala de laboratorio.

35 A partir de la línea celular CHO transfectada con el gen de la EPO humana se obtuvo un banco celular semilla el cual se adaptó a crecer en suspensión en un medio libre de

proteínas. La completa adaptación a este medio de cultivo se obtuvo después de 37 generaciones que representaban 25 días de cultivo.

- Para evaluar el desempeño de la línea celular en presencia de diferentes condiciones de pH y temperatura se realizó un diseño experimental donde se combinaron ambas variables. Las condiciones experimentales se muestran en la Tabla 1. El pH del cultivo fue controlado con la adición de hidróxido de sodio 0,5 mol/L.

Tabla 1. Condiciones experimentales para evaluar la influencia de las variables pH y temperatura sobre el perfil de isoformas de la EPOhr.

Concentración celular inicial (cél/mL)	0,3x10 ⁶
Viabilidad celular (%)	>90
Tiempo de cultivo (días)	7
Temperatura de incubación (°C)	35 37
Volumen de trabajo (mL)	300
pH	7,2 7,3 7,5

- Se determinó por isoelectroenfoque el perfil de isoformas de EPOhr correspondiente a las muestras de SN generado en los cultivos en las diferentes condiciones evaluadas. Se empleó una mezcla de anfolinas con un intervalo de pH de 2 a 5 y de 3 a 10, como control se empleó un material de referencia interno de EPOCIM[®]. El porcentaje de intensidad de cada una de la isoformas en las muestras se analizó por densitometría, empleado el programa *Gene Tools*. Se definieron como isoformas ácidas las que se encuentran entre los valores de pH 2,80 y 4,25 y como isoformas básicas las que están entre 4,25 a 6,55 (Figura 1A).

- En la Figura 1B se observa que el perfil de isoformas estuvo fuertemente influenciado por la temperatura. Independientemente del pH, cuando se compararon las muestras de SN correspondientes a cada condición a la temperatura de 37°C con el control se observan las 7 isoformas ácidas. Por su parte, a los 35 °C se observó una pérdida de isoformas ácidas que fue más acentuada para las condiciones que presentaron pH 7,2 y 7,3.

- La Figura 2 muestra que en las condiciones de pH 7,2 y 7,3 y temperatura 35 °C el 100% de las isoformas obtenidas correspondió a las isoformas básicas.

Ejemplo 2. El pH y la temperatura influyen sobre el perfil de isoformas de la EPOhr a escala piloto.

Se evaluó el impacto de las mejores condiciones de cultivo obtenidas a escala de laboratorio (Temperatura 35 °C, pH 7,2 y 7,3) en un ambiente más controlado y favorable para el cultivo celular. A partir del banco celular semilla descrito en el Ejemplo 1 se diseñaron cuatro corridas de fermentación empleando un biorreactor tipo TA (Infors-AGCH 4103, Bottmingen), de volumen efectivo 3,5 L. Las condiciones de operación se muestran en la Tabla 2. Se partió de una viabilidad celular mayor de 90% en todas las condiciones evaluadas.

Tabla 2. Condiciones de operación correspondientes a cada corrida de fermentación.

Parámetros	Condición 1	Condición 2	Condición 3	Condición 4
Xv inicial (cél/mL)	0,5x10 ⁶	1,76x10 ⁶	1,08x10 ⁶	2,31x10 ⁶
Temperatura operación (°C)	37	35	35	37
pH	7,41	7,2	7,3	-
Volumen de trabajo (L)	1,5	3	3	3
Tiempo de cultivo total (días)	5	7	7	7
Flujo de aire (mL/min)	15	15	15	15
Velocidad de agitación (rpm)	150	150	150	150
Velocidad de dilución (vvd)	-	0,3	0,3	0,3

Se tomaron muestras al final de cada fermentación y mediante la técnica de isoelectroenfoque se determinaron los perfiles de isoformas de las muestras de SN generado en los cultivos para las condiciones evaluadas en el biorreactor. Una vez obtenidos estos perfiles se empleó el programa *Gene Tools* y partiendo de la imagen correspondiente al gel de isoelectroenfoque se determinó la intensidad de cada banda presente en el gel y la proporción correspondiente a las isoformas hiposialiladas para cada condición evaluada.

Como se observa en la Figura 3 para las condiciones de cultivo 2 y 3 (35 °C, pH 7,2 y 7,3) la proporción de isoformas hiposialiladas fue superior a las condiciones 1 y 4. Con estos resultados se corroboró lo obtenido a escala de laboratorio, es decir al modificar las condiciones de operación pH 7,2-7,3 y temperatura 35 °C se modifica el perfil de isoformas de la EPOhr, lográndose mayor intensidad en aquellas con valores de pH entre 4,25 y 5,85.

Ejemplo 3. Al aumentar la concentración de glutamina en el medio de cultivo se favorece la expresión de isoformas básicas de la EPOhr.

- Con el propósito de evaluar si el aumento de la concentración de glutamina en el medio de cultivo tenía un efecto sobre el aumento de las isoformas hiposialiladas se evaluó el desempeño de la línea celular CHO productora de EPOhr. Se empleó un banco celular semilla en presencia de diferentes concentraciones de glutamina en el medio de cultivo, se realizó una adaptación al cultivo por 15 días. Se partió de una concentración celular de $0,5 \times 10^6$ cel/mL en un volumen final de 300 mL de medio de cultivo, empleando botellas rotatorias que se mantuvieron en incubadoras de 37 °C y velocidad de agitación de 600 rpm. Las concentraciones finales de glutamina en el medio de cultivo fueron: 8, 12 y 16 mmol/L, como control se empleó un medio de cultivo con 6 mmol/L de glutamina. Se evaluó por densitometría la intensidad relativa de isoformas hiposialiladas en los SN de los cultivos después de siete días de tratamiento con las diferentes concentraciones de glutamina.
- En la Figura 4 se observa que con las tres variantes evaluadas se obtuvieron valores superiores de proporción de isoformas hiposialiladas con respecto al control, por lo que con el aumento en la concentración de glutamina en el medio de cultivo se favorece la obtención de isoformas hiposialiladas en el SN. El mayor valor de dichas isoformas se obtuvo con 8 mmol/L de glutamina (87%).

Ejemplo 4. El pH y la conductividad influyen en la adsorción de las isoformas ácidas y básicas en el intercambiador aniónico fuerte acuaternario Q a escala de laboratorio.

- Con el objetivo de determinar las condiciones de pH y conductividad que propician la mayor adsorción de las isoformas ácidas en el intercambiador aniónico fuerte amonio cuaternario Q; se evaluaron las soluciones tampón: fosfato de sodio 20 mmol/L (dibásico anhidro y monobásico dihidratado) y Tris 20mmol/L HCl 10 mmol/L. Las soluciones tampón se estudiaron a diferentes valores de pH y conductividad, el pH entre 6 y 8 y la conductividad entre 1,5 y 5 mS/cm.
- En las condiciones de pH 6 y conductividad 1,50 mS/cm es donde las isoformas ácidas muestran su mayor adsorción al intercambiador. Por su parte, la adsorción de las isoformas hiposialiladas (básicas) se maximiza a pH 8 y conductividad 1,50 mS/cm. Estos resultados se muestran en la Figura 5.

Ejemplo 5. La matriz aniónica fuerte Q que utiliza la tecnología por columnas monolíticas tiene mejor desempeño para la separación de las isoformas de EPOhr en comparación con la que emplea la tecnología convencional de geles cromatográficos a escala de laboratorio.

La capacidad dinámica (Q) se determinó realizando dos curvas de ruptura para cada una de las tecnologías en estudio, empleando dos de las velocidades de flujo lineal recomendadas por el fabricante de cada tecnología (100 cm/h y 600 cm/h para la tecnología por geles cromatográficos (Q SFF) y para la columna monolítica (CIM QA) 156 cm/h y 624 cm/h). La solución de equilibrio utilizada para los experimentos con la tecnología convencional y para la tecnología por columnas monolíticas, fue el tampón Tris-HCL pH 8 con conductividad 1,5 mS/cm, según los resultados obtenidos en el Ejemplo 4.

Se aplicó la muestra de EPOhr a las columnas y a la salida de las mismas se tomaron muestras a diferentes tiempos. A cada muestra se le determinó la concentración de proteínas (C) por espectrofotometría. Con los valores conocidos de C para cada una de las muestras, se calculó la fracción de proteína no adsorbida como C/C_0 . Para cada tiempo se calculó la carga, que es la masa de proteína aplicada a la columna por unidad de volumen del gel dada en mg de EPOhr/ mL de matriz Q.

En la Figura 6 se representan gráficamente los valores de C/C_0 vs capacidad dinámica para obtener las curvas de ruptura para las velocidades de flujo especificadas, permitiendo conocer la Q del gel para una fracción de proteína no adsorbida $C/C_0 = 0,1$. En la Figura 6A se muestra la curva de ruptura obtenida para la tecnología convencional por geles cromatográficos donde la menor velocidad fue la que tuvo la mayor capacidad dinámica. En la Figura 6B se observa que la columna monolítica para las dos velocidades de flujo lineal ensayadas tiene capacidades dinámicas muy parecidas, por lo que se puede operar a mayores velocidades de flujo, sin experimentar variaciones en la capacidad dinámica de la matriz.

En la Tabla 3 se muestran los valores de Q obtenidos en las distintas mediciones realizadas.

Tabla 3. Valores de Q para cada una de las velocidades estudiadas en las columnas Q SFF y CIM QA.

Columna	Velocidad de flujo (cm/h)	Q (EPOhr/mL de gel)
Q SFF	100	7,82
	600	5,58
CIM QA	156	8,25
	624	7,79

Al comparar los resultados de los estudios de Q realizados para los intercambiadores aniónicos fuertes en lecho empacado y la tecnología de columnas monolíticas se obtiene que, ambas tecnologías tienen similar Q a la menor velocidad lineal estudiada. Sin embargo, a la mayor velocidad lineal la columna monolítica tiene una capacidad

5 dinámica de adsorción 1, 40 veces mayor que la de la matriz cromatográfica tradicional evaluada. Por lo que la columna monolítica ofrece la posibilidad de incrementar el flujo de operación del proceso sin afectar la capacidad de procesamiento de la masa de EPOhr a purificar.

Ejemplo 6. Al disminuir el pH se favorece la elución de las isoformas hiposialiladas de EPOhr en la columna monolítica a escala de laboratorio.

Los ensayos experimentales se realizaron utilizando las columnas Q SFF y CIM QA. La solución de equilibrio empleada para ambas tecnologías fue el tampón Tris-HCl pH 8 con conductividad de 1,5 mS/cm, según el Ejemplo 4. La velocidad lineal de trabajo de la columna Q SFF fue de 600 cm/h y la de la columna monolítica fue de 624 cm/h. Para

15 los experimentos se utilizó el producto obtenido de la columna cromatográfica de exclusión molecular "Sephadex" G-25, luego de haberse realizado el cambio de tampón a la solución de equilibrio en cuestión. Para la elución de las isoformas básicas se realizaron varias corridas con la columna monolítica de intercambio aniónico empleando el tampón acetato de sodio 50 mmol/L Tween 20 al 0.01% a los valores de pH: 4,41;

20 4,81; 5,06; 5,20.

Los recobrados obtenidos en la elución de las isoformas hiposialiladas (básicas) y las isoformas ácidas para cada corrida se muestran en la Figura 7. Del análisis de estos resultados se determina que a medida que se incrementa el pH de la solución tampón de elución de las isoformas básicas disminuye el rendimiento de las mismas, por lo que

25 se selecciona para la elución el tampón 50 mmol/L acetato de sodio a pH 4,41.

Ejemplo 7. El proceso de obtención de la EPOhr hiposialilada a escala productiva es consistente en separación de isoformas y grado de pureza.

A partir del banco celular semilla descrito en el Ejemplo 1 se realizó una corrida de fermentación para la que se partió de una viabilidad celular mayor de 90%. Esta etapa

30 de fermentación tuvo lugar a una temperatura de 35°C, se empleó un medio de cultivo libre de proteínas y se suplementó hasta una concentración final de 8 mmol/L de glutamina, el pH del medio se mantuvo entre 7,2 y 7,3.

Una vez realizadas cuatro cosechas se pasó a la etapa de purificación donde para el paso crítico se empleó el intercambiador aniónico con ligando cuaternario Q utilizando

35 columna monolítica. Se empleó como tampón de equilibrio una solución de Tris-HCl a

pH 8 y conductividad de 1,5 mS/cm y para la elución se utilizó el tampón acetato de sodio 50 mmol/L pH 4,41.

- Se determinó el perfil de isoformas de los cuatro lotes de materia prima activa obtenidos después del proceso de purificación mediante la técnica de isoelectroenfoque. Se empleó una mezcla de anfolinas con un intervalo de pH de 2 a 5 y de 3 a 10, como control se empleó un material de referencia interno de EPOCIM[®]. La Figura 8 muestra la consistencia en la separación de las isoformas donde se observa un perfil de isoformas configurado por seis mayoritarias de las cuales se comparten solo dos con el control.
- Se determinó además el contenido de ácido siálico de las isoformas purificadas según el procedimiento para la determinación de esta molécula en la Farmacopea Europea 8.0 (2014) y la pureza por HPLC en fase reversa. En la Tabla 4 se muestran los resultados del contenido de ácido siálico y pureza obtenidos.

- Tabla 4.** Resultados del contenido de ácido siálico y pureza de la EPOhr hiposialilada.

Producto	Ácidosiálico (moles ácido siálico/ mol de proteína)	HPLC-RP (%)
Lote 1	5,1	96,24
Lote 2	5,5	98,03
Lote 3	6,5	98,38
Lote 4	6,9	98,29

- Para los cuatro lotes el contenido de ácido siálico fue menor de 10 moles de ácido siálico/molécula de proteína y la pureza fue superior a un 95% por lo que el proceso de obtención de la EPOhr hiposialilada garantiza obtener isoformas en un rango de punto isoeléctrico entre 4,25 y 5,85, diferente al observado para la NeuroEPO.

Ejemplo 8. La estructura terciaria asociada a glicosilación de la EPOhr hiposialilada muestra una microheterogeneidad característica.

Análisis de glicanos

- Para el estudio del perfil de los N-glicanos de la EPOhr hiposialilada la misma se sometió a un proceso de desnaturalización y digestión enzimática con PNGasa F. Una vez liberados los N-glicanos, se purificaron mediante extracción en fase sólida utilizando cartuchos "Hypercarbhypersep" (Mancera-Arteu, M. y cols. (2016) Anal Chim Acta, 940:

92–103. Posteriormente se derivatizaron de acuerdo al procedimiento de Giménez y colaboradores en 2015. (Gimenez, E y cols. (2015) Anal Chim Acta, 866: 59–68).

Se realizó una cromatografía de líquidos capilar de interacción hidrofílica zwitteriónica acoplada a la espectrometría de masas siguiendo la metodología descrita por Mancera-

5 Arteu, M. y cols. (2016) Anal Chim Acta, 940: 92–103.

En la Figura 9 se muestran los espectros de masas de tres de los glicanos detectados en la EPOhr hiposialilada. Como se puede observar el glicano 3Ant2SiA1Fuc corresponde al de mayor representación, mientras que el 4Ant4SiA1Fuc se encuentra disminuido.

10 La Tabla 5 muestra los porcentos de área relativa de glicanos por estructura.

Tabla 5. Porcientos de área relativa de glicanos por estructura.

Glicanos	Área (%) **
Estructuras biantenarias	10,3
Estructuras triantenarias	17,2
Estructuras tetraantenarias	72,5

En la Tabla 6 se muestran los glicanos detectados con las correspondientes áreas relativas, masa molecular monoisotópica experimental (Mexp) y error de masa. Se

15 puede observar que existen un número significativo de glicanos con estructuras menos sialiladas.

Tabla 6. N-glicanos detectados en la EPOhr hiposialilada por cromatografía de líquidos capilar de interacción hidrofílica zwitteriónica acoplada a la espectrometría de masas.

Glicanos		Área	Área (%) *	Área (%) **	Mexp[Da]	Error
2 Ant	2Ant1SiA1Fuc	608.586	2,91	10,3	2154,8011	9,39
	2Ant2SiA1Fuc	2.321.812	11,31		2445,8983	8,34
3 Ant	3Ant1SiA1Fuc	448.587	2,18	17,2	2519,9309	6,25
	3Ant2SiA1Fuc	1.872.328	8,98		2811,0307	7,25
	3Ant3SiA1Fuc	2.562.955	12,46		3102,1243	6,58
4 Ant	4Ant1SiA1Fuc	589.168	2,94	30,1	28885,0669	8,01
	4Ant2SiA1Fuc	2.122.871	10,03		3176,1571	6,09
	4Ant3SiA1Fuc	4.243.325	20,74		3467,2550	5,60
	4Ant4SiA1Fuc	1.575.249	7,80		3758,2975	5,11
4Ant 1LacAc	4Ant1LacNAc1 SiA1Fuc	205.545	1,01	35,0	3250,1917	5,45
	4Ant1LacNAc2 SiA1Fuc	1.506.731	3,67		3541,2889	5,75
	4Ant1LacNAc3 SiA1Fuc	807.621	7,01		3832,3847	3,44
	4Ant1LacNAc4 SiA1Fuc	8.539.613	3,00		4123,4849	4,12

4Ant 2LacAc	4Ant2LacNAc2 SiA1Fuc	185.318	0,88	3,32	3906,4126	1,11
	4Ant2LacNAc3 SiA1Fuc	433.265	2,06		4197,4971	5,26
	4Ant2LacNAc4 SiA1Fuc	322.987	1,59		4488,5519	6,33
4Ant 3LacAc	4Ant3LacNAc1 SiA1Fuc	68.423	0,32	4,081	3980,5185	24,3
	4Ant3LacNAc2 SiA1Fuc	1.092.708	0,3		4271,4698	16,70
	4Ant3LacNAc3 SiA1Fuc	83.360	0,38		4562,5930	13,0
	4Ant3LacNAc4 SiA1Fuc	95.315	0,43		4853,6515	16,6

* Representa el área relativa respecto al total de glicanos detectados. ** Representa el área relativa por antenas respecto al total de glicanos detectados.

- Como se puede ver en la Tabla 6, los glicanos con estructuras más sialiladas (cuatro moléculas de ácido siálico) tienen una relación baja. En cambio se detectan estructuras con una molécula de ácido siálico, que no han sido detectadas en otras EPOhr, como es el caso de 3Ant1SiA1Fuc, 4Ant1SiA1Fuc, 4Ant1LacNAc1SiA1Fuc y 4Ant3LacNAc1SiA1Fuc. El glicano 4Ant3Sia1Fuc, es abundante en la EPOhr hiposialilada. Asimismo, se puede apreciar que el porciento del área relativa por antenas respecto al total de glicanos detectados es diferente a otras EPOhr y que las estructuras con uno o dos residuos de ácido siálico representan más del 50% del área relativa por antenas.

Análisis de glicopéptidos

- Para detectar todas las glicoformas presentes en los glicopéptidos O₁₂₆ y N₈₃, se sometió la EPOhr hiposialilada y la EPOhr-CRS (producto de referencia de Farmacopea), a digestión con tripsina y neuraminidasa (EPOhr HS-TN). De cada glicoforma detectada, se estudiaron todas las sialoformas a partir del análisis del digestato con tripsina (EPOhr HS-T). Las muestras se analizaron mediante espectrometría de masas de acuerdo al procedimiento descrito en Giménez, E. y cols. (2011) Rapid Commun Mass Spectrom, 25: 2307–2316.
- Las Figuras 10A y B muestran los EIEs de las glicoformas detectadas del glicopéptido O₁₂₆ en el digesto EPOhr HS-TN y EPOhr HS-T, respectivamente. En el primero se observa un único pico que corresponde a la glicoforma O₁₂₆/0SiA, ya que la neuraminidasa produce una desialilación completa del glicopéptido, de manera que todas las sialoformas se convierten en una única glicoforma. En cambio, cuando se digiere únicamente con tripsina, se observan tres sialoformes con 0, 1 y 2 moléculas de ácido siálico.

En la Tabla 7 se muestran las sialoformas del O₁₂₆ detectadas con las correspondientes áreas relativas, masa molecular monoisotópica experimental (M_{exp}) y error de masa.

Tabla 7. Glicoformas detectadas del glicopéptido O₁₂₆ de la EPOhr hiposialilada y de CRS digeridas con tripsina.

EPOhr-CRS-T				
Glicopéptido O ₁₂₆	t _R [min]	Área rel[%]	M _{exp} [Da]	Error[ppm]
OSiA	12,1	1,61	1829,9169	15,0
1SiA	14,6	60,4	2121,0166	15,0
2SiA	18,4	38,0	2412,1175	15,0
EPO hiposialilada-T				
Glicopéptido O ₁₂₆	t _R [min]	Área rel[%]	M _{exp} [Da]	Error[ppm]
OSiA	14,0	8,88	1829,9173	15,2
1SiA	17,2	80,5	2121,0173	15,3
2SiA	22,1	10,7	2412,1215	17,1

5

Los resultados obtenidos ponen de manifiesto que la sialoforma más abundante es la que contiene una molécula de ácido siálico. El porcentaje de área relativa tanto de las asialiladas, como de las que tienen un solo ácido siálico se encuentra en mayor proporción en relación a las descritas en otras EPOhr, encontrándose en la proporción de ambas sialoformas diferencias con la CRS.

10

En el caso del glicopéptido N₈₃, al analizar el digesto EPOhr HS-TN se detectaron seis picos, correspondientes a seis glicoformas diferentes sin ácido siálico. En la Figura 11 se muestran los EIEs obtenidos y en la Tabla 8 se muestran las glicoformas detectadas. Los resultados obtenidos demuestran que en el sitio N₈₃ existe un porcentaje mayor de estructuras tetranatenarias complejas desialiladas.

15

Tabla 8. Glicoformas detectadas del glicopéptido N₈₃ de la EPO HS-TN

Glicopéptido N ₈₃	t _R [min]	Area _{rel} [%]	M _{exp} [Da]	Error [ppm]
2Ant0SiA1Fuc	15,4	17,12	4126,9263	13,0
3Ant0SiA1Fuc	15,7	27,33	4492,0674	13,9
4Ant0SiA1Fuc	15,9	24,30	4857,1996	12,9
4Ant1LacNAc0SiA1	16,2	12,50	5222,3335	12,3
4Ant2LacNAc0SiA1	16,4	6,75	5587,3257	13,6
4Ant3LacNAc0SiA1	15,9	12,0	5952,6219	14,8

En la Figura 12A se observa que no hay separación entre las diferentes estructuras tetrantenarias en el digesto EPOhr HS-TN. En cambio, cuando se analizan las glicoformas sialiladas del digesto EPOhr HS-T, se observa una clara separación entre ellas, teniendo una intensidad superior las que presentan tres residuos de ácido siálico (Figura 12B). Estos resultados concuerdan con el estudio de los glicanos.

En la Tabla 9 se muestran todas las sialoformas detectadas y las correspondientes áreas relativas, masas moleculares experimentales monoisotópica (M_{exp}) y el error de la masa.

Tabla 9. Glicoformas detectadas del glicopéptido N83 de los digestos con tripsina y tripsina/neuroaminidasa.

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

Cuando la proteína se digiere únicamente con tripsina, se corrobora que la EPOhr hiposialilada se caracteriza por tener estructuras menos sialiladas (por ejemplo, el 2Ant1SiA1Fuc o 3Ant1SiA1Fuc). Al verificar el porcentaje de áreas relativas de las estructuras mono y bisialiladas los resultados muestran que estas representan aproximadamente el 60%.

Las estructuras tetraantenarias en el glicopéptido N₈₃, representan un porcentaje mayoritario respecto a las otras glicoformas, donde las que presentan dos residuos de ácido siálico se encuentran en mayor proporción.

Ejemplo 9. La EPOhr hiposialilada tiene un efecto restaurador sobre los astrocitos frente a la citotoxicidad del DMSO.

Se empleó la línea celular de astrocitos PG4 en medio de cultivo DMEM alto en glucosa suplementado con 3,7g/L de NaHCO_3 y suero fetal bovino (SFB) al 10%. Las células se incubaron durante mantuvieron 24h a una temperatura de 37°C en una atmósfera de 5% de CO_2 /95% de aire. Transcurrido este tiempo se extrajo el SN y las células se sometieron a un daño provocado con DMSO al 8% y nuevamente se realizó una incubación de 24h. Posteriormente, se retiró el SN y se adicionó medio de cultivo DMEM al 2% con diferentes concentraciones de EPOhr hiposialilada (1,25; 2,5; 5 y 10 ng/mL). A las 24h y 48h se adicionó el reactivo Alamar Blue, se incubó por 6h y se realizó una lectura a 540/630nm. Todas las incubaciones fueron realizadas a una temperatura de 37°C en una atmósfera de 5% de CO_2 / 95% de aire.

En la Figura 13 se puede observar como a las diferentes concentraciones 1,25; 2,5; 5 y 10 ng/mL de EPOhr hiposialilada, las células son capaces de recuperar su viabilidad, siendo la mejor condición el empleo de 1,25 ng/mL de EPOhr hiposialilada, lo que demuestra su capacidad restauradora para los astrocitos.

Ejemplo 10. La EPOhr hiposialilada tiene mejor actividad neuroprotectora que la NeuroEPO.

Se emplearon Gerbos de Mongolia en los que se aplicó la metodología descrita por Kahn K. en 1972, para desarrollar el modelo de isquemia unilateral permanente (Kahn K. (1972) Minneap 22: 510-515). Posteriormente, los animales se distribuyeron al azar en cinco grupos experimentales:

Grupo 1: Vehículo 10 μL del vehículo

Grupo 2: Tratados con 0,142 mg/kg de EPOhr hiposialilada

Grupo 3: Tratados con 0,0142 mg/kg de EPOhr hiposialilada

Grupo 4: Tratados con 0,142 mg/kg de NeuroEPO

Grupo 5: Tratados con 0,0142 mg/kg de NeuroEPO

Cada tratamiento se administró por vía IN, tres veces al día durante cuatro días. Los animales fueron se evaluaron durante los 4 primeros días de tratamiento, así como los 3 días de recuperación siguientes.

Los resultados muestran como de manera significativa hubo una mayor supervivencia de los animales tratados con la EPOhr hiposialilada en las dosis de 0,142 y 0,0142 mg/kg al compararse con el vehículo, mientras que la NeuroEPO solo disminuyó la mortalidad de manera significativa en la dosis 0,142 mg/kg y no así en la 0,0142 (Figura 14).

- La evaluación neurológica mostró el efecto neuroprotector de la EPOhr hiposialilada (NeuroEPO plus) al disminuir significativamente los valores de la escala neurológica en los animales tratados con esta en las dosis empleadas, al compararlas con el grupo placebo y con los grupos tratados con NeuroEPO, donde solo la dosis de 0,142 mg/kg
- 5 logró igual resultado que los obtenidos por la EPOrh hiposialilada. (Figura 15). (Prueba estadística Duncan, letras iguales $p>0.05$; letras distintas $p<0.05$).

Ejemplo 11 La EPOhr hiposialilada no aumenta el recuento de reticulocitos en el modelo de ratón normocitémico.

- Ratones hembra B6D2F1 se distribuyeron al azar en 6 grupos experimentales de 6
- 10 animales cada uno y recibieron una dosis única de tratamiento de la siguiente forma:
- Grupo 1: 0,003 mg/mL de material de referencia de trabajo EPOhr en un volumen de 200 μ L por vía subcutánea (SC).
- Grupo 2: 0,006 mg/mL de EPOhr hiposialilada en un volumen de 200 μ L por vía SC.
- Grupo 3: 0,5 mg/mL de EPOhr hiposialilada en un volumen de 120 μ L por vía IN.
- 15 Grupo 4: 1 mg/mL de EPOhr hiposialilada en un volumen de 120 μ L por vía IN.
- Grupo 5: 2 mg/mL de EPOhr hiposialilada en un volumen de 120 μ L por vía IN.
- Grupo 6: Control, 200 μ L excipiente por vía SC.

- En la Figura 16 se muestran los resultados del recuento de reticulocitos. No se obtuvieron diferencias significativas entre los animales del grupo control y los grupos
- 20 que fueron tratados con EPOhr hiposialilada tanto por vía SC como IN. El recuento de reticulocitos de los animales tratados con el material de referencia de trabajo de EPOhr fue significativamente mayor que en los animales del grupo control y los tratados con EPOhr hiposialilada, en cualquiera de las dos vías empleadas. (Prueba Duncan, letras iguales $p>0,05$; letras distintas $p<0,05$).
- 25 Los resultados demostraron que la EPO hiposialilada no aumenta el recuento de reticulocitos aun en la dosis mayor establecida para este ensayo, lo que pone en evidencia que no presenta efecto hematopoyético.

REIVINDICACIONES

5

1. Una composición farmacéutica caracterizada porque comprende como principio activo una eritropoyetina humana recombinante (EPOhr) con un perfil de punto isoeléctrico comprendido entre 4,25 y 5,85.
2. La composición farmacéutica de la reivindicación 1 caracterizada porque la
10 microheterogeneidad de N-glicanos fucosilados formada por estructuras bi, tri y tetra-antenarias, que presentan residuos de ácidos siálicos mono y bi-sialilados en un rango de 40-60% del total de glicanos, trisialilados entre un 40-43% y tetrasialilados entre 10-13% y un excipiente farmacéuticamente aceptable.
3. La composición farmacéutica de la reivindicación 1 caracterizada porque el sitio
15 de O-glicosilación en la serina 126 presenta 3 sialoformas entre 0 y 2 residuos de ácido siálico, donde la estructura monosialilada es la más abundante y comprende entre el 78-82% del total de glicanos y glicanos y las estructuras asialiladas representan entre el 6-10% del total de glicanos.
4. La composición farmacéutica de la reivindicación 1 caracterizada porque el sitio
20 de N- glicosilación de la asparagina 83 comprende:
 - Estructuras biantenarias fucosiladas con 1 y 2 residuos de ácido siálico, dichas estructuras constituyen del 8-12% del total de glicanos,
 - estructuras triantenarias fucosiladas con 1, 2 y 3 residuos de ácido siálico dichas estructuras constituyen del 17-21% del total de glicanos,
 - 25 - estructuras tetraantenarias fucosiladas, que presentan entre 1 a 4 residuos de ácido siálico, dichas estructuras constituyen del 27-31% del total de glicanos y
 - estructuras tetraantenarias fucosiladas con 1 y 2 N-acetil lactosamina que presentan entre 1 a 4 residuos de ácido siálico, dichas estructuras se
30 encuentran entre el 38-42% del total de glicanos.
5. La composición farmacéutica de la reivindicación 1 caracterizada porque el excipiente farmaceuticamente aceptable comprende polímeros bioadhesivos y estabilizantes de proteínas.
6. La composición farmacéutica de la reivindicación 5 caracterizada porque los
35 polímeros bioadhesivos se seleccionan del grupo que comprende:
 - hidroximetilcelulosa,

- hidroxipropilcelulosa y
 - metilcelulosa.
7. La composición farmacéutica de la reivindicación 5 caracterizada porque los estabilizantes de proteínas se seleccionan del grupo que comprende:
- 5
- L-triptófano,
 - L-leucina,
 - clorhidrato de L-arginina y
 - clorhidrato de L-histidina.
8. Un método para la obtención de una EPOhr sin modificaciones químicas y genéticas adicionales y con un perfil de punto isoeléctrico comprendido entre
- 10
- 4,25 y 5,85, caracterizado porque el proceso de fermentación tiene lugar en tanque agitado y en el proceso de purificación se emplea un paso cromatográfico con columna monolítica como intercambiador aniónico con un ligando amonio cuaternario Q.
- 15
9. El método de la reivindicación 8 caracterizado porque el proceso de fermentación de la EPOhr en tanque agitado se lleva a cabo a una temperatura de 35°C, con un medio de cultivo libre de proteínas con pH en el rango de 7,2-7,3, dicho medio se suplementa con glutamina hasta una concentración final en el rango de 8-12 mmol/L.
- 20
10. El método de las reivindicaciones 8 caracterizado porque en el proceso de purificación se emplea como tampón de equilibrio una solución de Tris 20 mmol/L HCl 10 mmol/L a pH 8 y conductividad 1,5 mS/cm y como tampón de elución el acetato de sodio 50 mmol/L pH 4,41.
11. La composición farmacéutica cuyo principio activo es la EPOhr hiposialilada
- 25
- obtenida por el método de las reivindicaciones 8-10.
12. Uso de la composición farmacéutica de las reivindicaciones 1-7 y 11 para el tratamiento de la demencia, ictus, parkinson, ataxia, traumas craneo-encefálicos, glaucoma, autismo, hipoxia del recién nacido, esclerosis múltiple, esclerosis lateral amiotrófica y daño neurológico inducido por trauma, intoxicación o
- 30
- radiaciones.
13. Un método para el tratamiento de un sujeto que lo necesite que comprende la administración de la composición farmacéutica de las reivindicaciones 1-7 y 11 desde una a tres veces por semana en períodos desde seis hasta 12 meses en un rango de administración de 0,1 mg a 4 mg en un volumen de 1mL.
- 35