

## Záverečná karta projektu

Názov projektu Evidenčné číslo projektu **APVV-14-0474**

**Príprava erythropoetínu, terapeutického hormónu ovplyvňujúceho tvorbu červených krviniek, expresiou v eukaryotickom bunkovom systéme a jeho ďalšia purifikácia**

Zodpovedný riešiteľ **Ing. Ľudovít Škultéty, DrSc.**

Príjemca **Biomedicínske centrum SAV - Virologický ústav**

### Názov pracoviska, na ktorom bol projekt riešený

Biomedicínske centrum SAV - Virologický ústav, Dúbravská cesta 9, 845 05 Bratislava a Slovenská technická univerzita v Bratislave - Fakulta chemickej a potravinárskej technológie, Vazovova 5, 812 43 Bratislava

### Názov a štát zahraničného pracoviska, ktoré spolupracovalo pri riešení

Mikrobiologický ústav AVČR, v.v.i., Vídenská 1083, 142 20 Praha, Česká republika

### Udelené patenty/podané patentové prihlášky, vynálezy alebo úžitkové vzory, ktoré sú výsledkami projektu

Patentová prihláška sa pripravuje

### Najvýznamnejšie publikácie (knihy, články, prednášky, správy a pod.) zhrňujúce výsledky projektu – uveďte aj publikácie prijaté do tlače

ADAMÍKOVÁ, Jana - ANTOŠOVÁ, Monika - POLAKOVIČ, Milan. Chromatographic purification of recombinant human erythropoietin. In Biotechnology Letters. Vol. 41, iss. 4-5 (2019), s. 483-493. ISSN 0141-5492 (2017: 1.846 - IF, 3 - JCR Best Q, 0.621 - SJR, Q2 - SJR Best Q). V databáze: DOI: 10.1007/s10529-019-02656-8 ; CC: 000465556700003.

ADAMÍKOVÁ, Jana - WIŚNIEWSKI, Łukasz - MOLNÁR, Tomáš - BARTOŠOVÁ, Mária - ANTOŠOVÁ, Monika - FLORES-RAMÍREZ, Gabriela - ŠKULTÉTY, Ľudovít - POLAKOVIČ, Milan. Selection of adsorbents for recombinant human erythropoietin purification. In Separation and Purification Technology (2019). Vol. 228. Art. No. 115761. ISSN 1383-5866 (2018: 5.107 - IF, 12.5 - JCR Best Q, 1.158 - SJR, Q1 - SJR Best Q) V databáze: DOI: 10.1016/j.seppur.2019.115761

KURÁK, Tomáš - MOLNÁR, Tomáš - POLAKOVIČ, Milan. Adsorption of recombinant human erythropoietin and protein impurities on a multimodal chromatography membrane. In Chemical Papers. Vol. 73, iss. 7 (2019), s. 1805-1811. ISSN 2585-7290 (2017). V databáze: DOI: 10.1007/s11696-019-00743-8 ; CC: 000467058700023.

MOLNÁR, Tomáš - BARTOŠOVÁ, Mária - ANTOŠOVÁ, Monika - ŠKULTÉTY, Ľudovít - POLAKOVIČ, Milan. Cost-effective indirect ELISA method for determination of recombinant human erythropoietin in production streams. In Chemical Papers. Vol. 73, iss. 3 (2019), s. 713-718. ISSN 2585-7290 (2017). V databáze: DOI: 10.1007/s11696-019-00680-6 ; CC: 000459465100017.

OSTRIHOŇOVÁ, Marta - ADAMÍKOVÁ, Jana - MOLNÁR, Tomáš, - ANTOŠOVÁ, Monika -

### **Uplatnenie výsledkov projektu**

Počas riešenia projektu bol za poloprevádzkových podmienok pripravený prekursor výrobu rhEPO v množstve 2,5 mg, ktoré postačuje na prípravu viac ako 600 dávok 500 IU roztoku rhEPO. Tento dôležitý rastový faktor zodpovedá za kontrolu produkcie červených krviniek (erytrocytov). Je to hormón s antiapoptotickým účinkom, ktorý sa používa pri liečbe viacerých typov anémie. Je produkovaný v peritubulárnych bunkách kortexu obličiek a jeho syntéza je preto často narušená ich ochorením. Ovplyvniť ju ale môžu aj poruchy kostnej drene, nedostatok železa a vitamínov, alebo vedľajšie účinky pri podávaní niektorých liekov napr. cytostatik.

Dostupnosťou rekombinantných foriem EPO sa teda nesmierne vylepšil život pacientov s chronickým ochorením obličiek, ktoré patrí medzi kľúčové príčiny anémie. Súčasné poznatky z predklinických a klinických štúdií však naznačujú, že EPO je jedným z hormónov, ktorý pozitívne ovplyvňuje aj synaptickú konektivitu a neuronálnu plasticitu, a tým zlepšuje pamäť a ovplyvňuje náladu. Má teda veľmi širokú škálu použitia a dopyt po tomto prípravku je obrovský.

### **Súhrn výsledkov riešenia projektu a naplnenia cieľov projektu v slovenskom jazyku (max. 20 riadkov)**

Projekt bol zameraný na ciele aplikovaný výskum a vývoj technologického procesu produkcie biologicky aktívnej formy ľudského erythropoetínu. Na primárne klonovanie a charakterizáciu klonov sa použili štandardné metódy molekulárneho klonovania. Z viac ako 400 klonov buniek transfekovaných plazmidom nesúcim cDNA pre ľudské EPO sa nám podarilo vyselektovať vysoko-produkčný klon R pripravený z obličkových buniek HEK293 stabilne transfekovaných plazmidom pcDNA3.1-EPO. Tento systém sa vybral preto, aby sa zabezpečila správna potranslačná modifikácia, najmä glykozylácia pripraveného produktu. Po definovaní optimálnych podmienok maximálnej expresie sa vybrali vhodné adsorbenty na separáciu rhEPO a optimalizovali sa podmienky adsorpcie a desorpcie. Hoci multimodálne adsorbenty Capto MMC a Capto MMC ImpRes boli vysoko účinné, v jednom kroku sa nám nepodarilo odstrániť všetky kontaminujúce proteíny. Z toho dôvodu bol zavedený ďalší purifikačný krok. Použitím anexu Capto Q sme už ale väčšinu kontaminujúcich proteínov odstránili, čím sme dosiahli čistotu produktu vyššiu ako 90 %. V rámci riešenia projektu bola zavedená aj vhodná metóda monitorovania množstva rhEPO počas chromatografickej separácie založená na nepriamej ELISA.

Výsledky projektu viedli k publikovaniu 6 vedeckých prác v zahraničných karentovaných časopisoch, 2 vedeckých prác v domácich časopisoch registrovaných v databázach Web of Science, či SCOPUS, 9 vedeckých prác v zborníkoch v SR, 1 vedeckej práce v zborníku v zahraničí a množstva príspevkov na domácich a zahraničných konferenciách. Dosiahnuté výsledky sú teda v plnom súlade s cieľmi projektu stanovenými pred začiatkom riešenia.

### **Súhrn výsledkov riešenia projektu a naplnenia cieľov projektu v anglickom jazyku (max. 20 riadkov)**

The project was focused on applied research aiming to develop a technological process for the production of a biologically active form of human erythropoietin. Standard methods of molecular cloning were used for primary cloning and characterization of the clones. From over 400 clones of cells transfected with a plasmid carrying a cDNA of human EPO, we were able to select a highly productive clone R prepared from kidney HEK293 cells stably transfected with plasmid pcDNA3.1-EPO. This system was chosen to ensure proper post-translational modification, especially glycosylation of the prepared product. After defining optimal expression conditions, suitable adsorbents were selected to purify the rhEPO. The adsorption and desorption conditions were optimized. Although the multimodal adsorbents Capto MMC and Capto MMC ImpRes were highly effective, we were not able to remove all contaminating proteins in the first step. Therefore, another purification step had to be introduced. Using Capto Q anion exchange resin, most of the contaminating proteins were successfully removed, achieving a product purity of more than 90%. A suitable method for monitoring the quantity of EPO during chromatographic separation which is based on

indirect ELISA was also introduced within the project. The results of the project were partially presented in 6 scientific articles in international journals, 2 articles in domestic journals registered in the Web of Science or SCOPUS databases, 9 articles in proceedings published in SR, 1 article in proceedings published abroad and in many domestic and international conferences. Thus, the results achieved are entirely in line with the project objectives set before project implementation.