

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C07K 14/00

C07K 14/505



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 01822949.2

[43] 公开日 2004年6月16日

[11] 公开号 CN 1505638A

[22] 申请日 2001.12.28 [21] 申请号 01822949.2

[30] 优先权

[32] 2000.12.29 [33] US [31] 09/753,132

[32] 2000.12.29 [33] US [31] 60/259,245

[86] 国际申请 PCT/US2001/049479 2001.12.28

[87] 国际公布 WO2002/053580 英 2002.7.11

[85] 进入国家阶段日期 2003.8.29

[71] 申请人 肯尼思 S·沃伦协会有限公司

地址 美国纽约州

[72] 发明人 M·布赖恩斯 A·切拉米

C·切拉米

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 刘元金 徐雁漪

权利要求书 10 页 说明书 55 页 附图 15 页

[54] 发明名称 对促红细胞生成素应答性细胞、组织和器官的保护、恢复和增强

[57] 摘要

提供了几种方法和组合物，用于通过全身或局部给予促红细胞生成素受体活性调节剂，如促红细胞生成素或修饰的促红细胞生成素，来保护或促进包括人在内的哺乳动物中在体内、原位或来自体内的促红细胞生成素应答性细胞、组织、器官或身体某部分的功能或存活力。

ISSN 1008-4274

1. 选自如下种类的促红细胞生成素在制备药物组合物中的用途，该药物组合物用于保护、维持、促进或恢复哺乳动物促红细胞生成素应答性细胞及其相关细胞、组织和器官的功能或存活力：

- 5 i) 至少没有唾液酸部分的促红细胞生成素；
 ii) 至少没有 N-连接或 O-连接糖基的促红细胞生成素；
 iii) 通过将天然促红细胞生成素用至少一种糖苷酶处理而具有至少降低的糖基含量的促红细胞生成素；
 iv) 通过非哺乳动物细胞中表达重组促红细胞生成素而使促红
10 细胞生成素分子的糖基部分具有至少一种非哺乳动物糖基化模式的促红细胞生成素；
 v) 具有至少一个或几个被氧化糖基的促红细胞生成素；此被氧化的糖基也可被化学还原；
 vi) 具有至少一个或几个修饰的精氨酸残基的促红细胞生成素；
15 vii) 具有至少一个或几个修饰的赖氨酸残基或者具有对促红细胞生成素分子 N-末端氨基修饰的促红细胞生成素；
 viii) 具有至少一个修饰的酪氨酸残基的促红细胞生成素；
 ix) 具有至少一个修饰的天冬氨酸或谷氨酸残基的促红细胞生成素；
20 x) 具有至少一个修饰的色氨酸残基的促红细胞生成素；
 xi) 具有至少一个氨基被除去的促红细胞生成素；
 xii) 在促红细胞生成素分子中具有至少一个打开的脱氨酸键的促红细胞生成素；
 xiii) 被提供的具有对至少一个氨基酸至少一次取代的促红细胞
25 生成素；以及
 xiv) 被截短的促红细胞生成素。

2. 权利要求 1 的用途，其中所述的促红细胞生成素是脱唾液酸促红细胞生成素。

3. 权利要求 2 的用途，其中所述的脱唾液酸促红细胞生成素是人脱唾液酸促红细胞生成素。

4. 权利要求 1 的用途，其中所述的促红细胞生成素没有 N-连接的糖基。

5. 权利要求 1 的用途, 其中所述的促红细胞生成素没有 O-连接的糖基。
6. 权利要求 1 的用途, 其中所述的促红细胞生成素被用至少一种糖苷酶处理。
- 5 7. 权利要求 1 的用途, 其中所述的促红细胞生成素在昆虫或植物细胞中被表达。
8. 权利要求 1 的用途, 其中所述的促红细胞生成素是高碘酸氧化的促红细胞生成素。
9. 权利要求 8 的用途, 其中所述的高碘酸氧化的促红细胞生成素被氰基硼氢化钠化学还原。
- 10 10. 权利要求 1 的用途, 其中所述的促红细胞生成素在一个或几个精氨酸残基上包含 R-乙二醛部分, 其中 R 是芳基或烷基部分。
11. 权利要求 10 的用途, 其中所述的促红细胞生成素是苯基乙二醛-促红细胞生成素。
- 15 12. 权利要求 1 的用途, 其中所述的促红细胞生成素的精氨酸残基通过与选自 2, 3-丁二酮和环己二酮的邻二酮反应而被修饰。
13. 权利要求 1 的用途, 其中所述的促红细胞生成素的精氨酸残基与 3-脱氧葡萄糖醛酮反应。
14. 权利要求 1 的用途, 其中所述的促红细胞生成素分子具有至少一个生物素化的赖氨酸或 N-末端氨基。
- 20 15. 权利要求 14 的用途, 其中所述的促红细胞生成素分子是生物素化的促红细胞生成素。
16. 权利要求 1 的用途, 其中所述的促红细胞生成素是葡糖基赖氨酸促红细胞生成素或果糖基赖氨酸促红细胞生成素。
- 25 17. 权利要求 1 的用途, 其中所述的促红细胞生成素的赖氨酸残基被氨甲酰化。
18. 权利要求 1 的用途, 其中所述的促红细胞生成素的赖氨酸残基被酰化。
19. 权利要求 18 的用途, 其中所述的促红细胞生成素的赖氨酸残基被乙酰化。
- 30 20. 权利要求 18 的用途, 其中所述的促红细胞生成素的赖氨酸残基被琥珀酰化。

21. 权利要求 1 的用途, 其中所述的促红细胞生成素的赖氨酸残基被 2, 4, 6-三硝基苯磺酸钠或其另一种盐修饰。

22. 权利要求 1 的用途, 其中所述的促红细胞生成素的酪氨酸残基被硝化或碘化。

5 23. 权利要求 1 的用途, 其中所述的促红细胞生成素的天冬氨酸或谷氨酸残基与碳化二亚胺反应, 接着与胺反应。

24. 权利要求 23 的用途, 其中所述的胺是甘氨酸胺。

25. 权利要求 1 的用途, 其中所述的促红细胞生成素应答性细胞或组织是神经、视网膜、肌肉、心脏、肺、肝、肾、小肠、肾上腺皮质、肾上腺髓质、毛细血管内皮、睾丸、卵巢、胰腺或子宫内膜的细胞或组织。

26. 一种药物组合物, 包含保护、维持、促进或恢复促红细胞生成素应答性细胞的有效剂量的促红细胞生成素, 促红细胞生成素选自如下种类:

15 i) 至少没有唾液酸部分的促红细胞生成素;

ii) 至少没有 N-连接或 O-连接糖基的促红细胞生成素;

iii) 通过将天然促红细胞生成素用至少一种糖苷酶处理而具有至少降低的糖基含量的促红细胞生成素;

iv) 通过在非哺乳动物细胞中表达重组促红细胞生成素而使促红细胞生成素分子的糖基部分具有至少一种非哺乳动物糖基化模式的促红细胞生成素;

v) 具有至少一个或几个被氧化糖基的促红细胞生成素; 此被氧化的糖基也可被化学还原;

vi) 具有至少一个或几个修饰的精氨酸残基的促红细胞生成素;

25 vii) 具有至少一个或几个修饰的赖氨酸残基或者具有对促红细胞生成素分子 N-末端氨基修饰的促红细胞生成素;

viii) 具有至少一个修饰的酪氨酸残基的促红细胞生成素;

ix) 具有至少一个修饰的天冬氨酸或谷氨酸残基的促红细胞生成素;

30 x) 具有至少一个修饰的色氨酸残基的促红细胞生成素;

xi) 具有至少一个氨基被除去的促红细胞生成素;

xii) 在促红细胞生成素分子中具有至少一个打开的胱氨酸键的促

红细胞生成素；

xiii) 被提供的具有对至少一个氨基酸至少一次取代的促红细胞生成素；以及

xiv) 被截短的促红细胞生成素。

5 27. 权利要求 26 的药物组合物，其中所述的促红细胞生成素是脱唾液酸促红细胞生成素或苯基乙二醛-促红细胞生成素。

28. 促红细胞生成素在制备药物组合物中的用途，该药物组合物用于保护、维持、促进或恢复促红细胞生成素应答性细胞或其相关细胞、组织或器官的功能或存活力，其中所述的细胞、细胞、组织或
10 器官不是易兴奋的细胞、组织或器官，或者不是主要包含易兴奋的细胞或组织。

29. 权利要求 28 的用途，其中所述的促红细胞生成素是促红细胞生成素或天然促红细胞生成素，或者促红细胞生成素类似物、促红细胞生成素模拟物，以及促红细胞生成素片断、杂交的促红细胞生成素
15 分子、促红细胞生成素受体结合分子、促红细胞生成素激动剂、肾促红细胞生成素、脑促红细胞生成素、其寡聚体、其多聚体、其突变体、其同源物、其天然存在的形式、其合成形式、其重组形式、其糖基化变异体、其去糖基化变异体，或者其组合。

30. 权利要求 28 的用途，其中所述的促红细胞生成素是苯基乙二
20 醛-促红细胞生成素。

31. 一种用于保护、维持或促进从哺乳动物体内分离出的细胞、组织或器官的存活力的方法，包括将所述细胞、组织或器官暴露于包含促红细胞生成素的药物组合物。

32. 权利要求 31 的方法，其中所述的促红细胞生成素是促红细胞生成素或天然促红细胞生成素，或者促红细胞生成素类似物、促红细胞生成素模拟物，以及促红细胞生成素片断、杂交的促红细胞生成素
25 分子、促红细胞生成素受体结合分子、促红细胞生成素激动剂、肾促红细胞生成素、脑促红细胞生成素、其寡聚体、其多聚体、其突变体、其同源物、其天然存在的形式、其合成形式、其重组形式、其糖基化变异体、其去糖基化变异体，或者其组合。

33. 权利要求 32 的方法，其中所述的促红细胞生成素是
30 i) 至少没有唾液酸部分的促红细胞生成素；

- ii) 至少没有 N-连接或 O-连接糖基的促红细胞生成素;
- iii) 通过将天然促红细胞生成素用至少一种糖苷酶处理而具有至少降低的糖基含量的促红细胞生成素;
- iv) 通过非哺乳动物细胞中表达重组促红细胞生成素而使促红细胞生成素分子的糖基部分具有至少一种非哺乳动物糖基化模式的促红细胞生成素;
- v) 具有至少一个或几个被氧化糖基的促红细胞生成素; 此被氧化的糖基也可被化学还原;
- vi) 具有至少一个或几个修饰的精氨酸残基的促红细胞生成素;
- vii) 具有至少一个或几个修饰的赖氨酸残基或者具有对促红细胞生成素分子 N-末端氨基修饰的促红细胞生成素;
- viii) 具有至少一个修饰的酪氨酸残基的促红细胞生成素;
- ix) 具有至少一个修饰的天冬氨酸或谷氨酸残基的促红细胞生成素;
- x) 具有至少一个修饰的色氨酸残基的促红细胞生成素;
- xi) 具有至少一个氨基被除去的促红细胞生成素;
- xii) 在促红细胞生成素分子中具有至少一个打开的胱氨酸键的促红细胞生成素;
- xiii) 被提供的具有对至少一个氨基酸至少一次取代的促红细胞生成素; 或者
- xiv) 被截短的促红细胞生成素。

34. 权利要求 31 的方法, 其中所述的促红细胞生成素是人促红细胞生成素。

35. 权利要求 31 的方法, 其中所述的促红细胞生成素是苯基乙二醛-促红细胞生成素。

36. 选自如下种类的促红细胞生成素在制备用于恢复哺乳动物认知功能紊乱的药物组合物中的用途: 促红细胞生成素或天然促红细胞生成素, 或者促红细胞生成素类似物、促红细胞生成素模拟物, 以及促红细胞生成素片断、杂交的促红细胞生成素分子、促红细胞生成素受体结合分子、促红细胞生成素激动剂、肾促红细胞生成素、脑促红细胞生成素、其寡聚体、其多聚体、其突变体、其同源物、其天然存在的形式、其合成形式、其重组形式、其糖基化变体、其去糖基化

变异体，或者其组合。

37. 权利要求 36 的用途，其中认知功能紊乱是由如下疾病引起的损伤的结果：发作性失调、多发性硬化、中风、低血压、心跳停止、缺血、心肌梗塞、炎症、年龄相关的认知功能丧失、放射性伤害、大
5 脑性麻痹、神经性退化疾病、阿尔茨海默氏病、帕金森病、赖氏疾病、AIDS 痴呆、记忆丧失、肌萎缩性侧索硬化、酒精中毒、情绪失调、焦虑失调、注意力缺乏失调、孤独症、传染性海绵样脑病、脑或脊髓创伤或缺血、心肺旁路术、慢性心衰竭、斑点退化、糖尿病性神经病变、糖尿病性视网膜病、青光眼、视网膜缺血、或者视网膜创伤。

38. 权利要求 36 的用途，其中所述的促红细胞生成素是苯基乙二
10 醛-促红细胞生成素。

39. 权利要求 36 的用途，其中所述的促红细胞生成素是

i) 至少没有唾液酸部分的促红细胞生成素；

ii) 至少没有 N-连接或 O-连接糖基的促红细胞生成素；

15 iii) 通过将天然促红细胞生成素用至少一种糖苷酶处理而具有至少降低的糖基含量的促红细胞生成素；

iv) 通过非哺乳动物细胞中表达重组促红细胞生成素而使促红细胞生成素分子的糖基部分具有至少一种非哺乳动物糖基化模式的促红细胞生成素；

20 v) 具有至少一个或几个被氧化糖基的促红细胞生成素；此被氧化的糖基也可被化学还原；

vi) 具有至少一个或几个修饰的精氨酸残基的促红细胞生成素；

vii) 具有至少一个或几个修饰的赖氨酸残基或者具有对促红细胞生成素分子 N-末端氨基修饰的促红细胞生成素；

25 viii) 具有至少一个修饰的酪氨酸残基的促红细胞生成素；

ix) 具有至少一个修饰的天冬氨酸或谷氨酸残基的促红细胞生成素；

x) 具有至少一个修饰的色氨酸残基的促红细胞生成素；

xi) 具有至少一个氨基被除去的促红细胞生成素；

30 xii) 在促红细胞生成素分子中具有至少一个打开的脱氨酸键的促红细胞生成素；

xiii) 被提供的具有对至少一个氨基酸至少一次取代的促红细胞

生成素；以及

xiv) 被截短的促红细胞生成素。

40. 一种用于促进一种分子转胞吞跨越哺乳动物中的内皮细胞屏障的方法，包括对所述哺乳动物给予包含与选自如下种类的促红细胞生成素结合的该分子的组合物：

i) 至少没有唾液酸部分的促红细胞生成素；

ii) 至少没有 N-连接或 O-连接糖基的促红细胞生成素；

iii) 通过将天然促红细胞生成素用至少一种糖苷酶处理而具有至少降低的糖基含量的促红细胞生成素；

iv) 通过非哺乳动物细胞中表达重组促红细胞生成素而使促红细胞生成素分子的糖基部分具有至少一种非哺乳动物糖基化模式的促红细胞生成素；

v) 具有至少一个或几个被氧化糖基的促红细胞生成素；此被氧化的糖基也可被化学还原；

vi) 具有至少一个或几个修饰的精氨酸残基的促红细胞生成素；

vii) 具有至少一个或几个修饰的赖氨酸残基或者具有对促红细胞生成素分子 N-末端氨基修饰的促红细胞生成素；

viii) 具有至少一个修饰的酪氨酸残基的促红细胞生成素；

ix) 具有至少一个修饰的天冬氨酸或谷氨酸残基的促红细胞生成素；

x) 具有至少一个修饰的色氨酸残基的促红细胞生成素；

xi) 具有至少一个氨基被除去的促红细胞生成素；

xii) 在促红细胞生成素分子中具有至少一个打开的胱氨酸键的促红细胞生成素；

xiii) 被提供的具有对至少一个氨基酸至少一次取代的促红细胞生成素；以及

xiv) 被截短的促红细胞生成素。

41. 权利要求 40 的方法，其中所述的结合是与所述分子结合位点的不稳定共价键、稳定共价键、或者非共价键结合。

42. 权利要求 40 的方法，其中所述的内皮细胞屏障选自血-脑屏障、血-眼屏障、血-睾屏障、血-卵巢屏障和血-胎盘屏障。

43. 权利要求 40 的方法，其中所述的分子是受体激动剂或拮抗剂

激素，神经营养因子，抗菌剂，放射性药物，反义寡核苷酸，抗体，免疫抑制剂或者抗癌药物。

44. 一种借助于转胞吞作用转运一种分子跨越内皮细胞屏障的组合物，包含与选自如下种类的促红细胞生成素结合的该分子：

- 5 i) 至少没有唾液酸部分的促红细胞生成素；
- ii) 至少没有 N-连接或 O-连接糖基的促红细胞生成素；
- iii) 通过将天然促红细胞生成素用至少一种糖苷酶处理而具有至少降低的糖基含量的促红细胞生成素；
- iv) 通过非哺乳动物细胞中表达重组促红细胞生成素而使促红
- 10 细胞生成素分子的糖基部分具有至少一种非哺乳动物糖基化模式的促红细胞生成素；
- v) 具有至少一个或几个被氧化糖基的促红细胞生成素；此被氧化的糖基也可被化学还原；
- vi) 具有至少一个或几个修饰的精氨酸残基的促红细胞生成素；
- 15 vii) 具有至少一个或几个修饰的赖氨酸残基或者具有对促红细胞生成素分子 N-末端氨基修饰的促红细胞生成素；
- viii) 具有至少一个修饰的酪氨酸残基的促红细胞生成素；
- ix) 具有至少一个修饰的天冬氨酸或谷氨酸残基的促红细胞生成素；
- 20 x) 具有至少一个修饰的色氨酸残基的促红细胞生成素；
- xi) 具有至少一个氨基被除去的促红细胞生成素；
- xii) 在促红细胞生成素分子中具有至少一个打开的胱氨酸键的促红细胞生成素；
- xiii) 被提供的具有对至少一个氨基酸至少一次取代的促红细胞
- 25 生成素；以及
- xiv) 被截短的促红细胞生成素。

45. 权利要求 44 的组合物，其中所述的结合是与所述分子结合位点的不稳定共价键、稳定共价键、或者非共价键结合。

46. 权利要求 44 的组合物，其中所述的分子是受体激动剂或拮抗

30 剂激素，神经营养因子，抗菌剂，放射性药物，反义寡核苷酸，抗体，免疫抑制剂或者抗癌药物。

47. 选自如下种类的促红细胞生成素与一种分子结合来制备药物

组合物的用途，该组合物借助于转胞吞作用转运该分子跨越内皮细胞屏障：

- i) 至少没有唾液酸部分的促红细胞生成素；
 - ii) 至少没有 N-连接或 O-连接糖基的促红细胞生成素；
 - 5 iii) 通过将天然促红细胞生成素用至少一种糖苷酶处理而具有至少降低的糖基含量的促红细胞生成素；
 - iv) 通过非哺乳动物细胞中表达重组促红细胞生成素而使促红细胞生成素分子的糖基部分具有至少一种非哺乳动物糖基化模式的促红细胞生成素；
 - 10 v) 具有至少一个或几个被氧化糖基的促红细胞生成素，此被氧化的糖基也可被化学还原；
 - vi) 具有至少一个或几个修饰的精氨酸残基的促红细胞生成素；
 - vii) 具有至少一个或几个修饰的赖氨酸残基或者具有对促红细胞生成素分子 N-末端氨基修饰的促红细胞生成素；
 - 15 viii) 具有至少一个修饰的酪氨酸残基的促红细胞生成素；
 - ix) 具有至少一个修饰的天冬氨酸或谷氨酸残基的促红细胞生成素；
 - x) 具有至少一个修饰的色氨酸残基的促红细胞生成素；
 - xi) 具有至少一个氨基被除去的促红细胞生成素；
 - 20 xii) 在促红细胞生成素分子中具有至少一个打开的脱氨酸键的促红细胞生成素；
 - xiii) 被提供的具有对至少一个氨基酸的至少一次取代的促红细胞生成素；以及被截短的促红细胞生成素。
48. 权利要求 47 的用途，其中所述的结合是与所述分子结合位点的不稳定共价键、稳定共价键、或者非共价键结合。
- 25 49. 权利要求 47 的用途，其中所述的分子是受体激动剂或拮抗剂激素，神经营养因子，抗菌剂，放射性药物，反义寡核苷酸，抗体，免疫抑制剂或者抗癌药物。
50. 一种包含高碘酸氧化的促红细胞生成素的组合物。
 - 30 51. 一种包含葡糖基赖氨酸促红细胞生成素的组合物。
 52. 一种包含果糖基赖氨酸促红细胞生成素的组合物。
 53. 一种包含 3-脱氧葡糖醛酮促红细胞生成素的组合物。

-
54. 一种包含氨甲酰化脱唾液酸促红细胞生成素的组合物。
 55. 一种包含生物素化脱唾液酸促红细胞生成素的组合物。
 56. 一种包含琥珀酰化脱唾液酸促红细胞生成素的组合物。
 57. 一种包含乙酰化脱唾液酸促红细胞生成素的组合物。

5

对促红细胞生成素应答性细胞、组织
和器官的保护、恢复和增强

5 根据 35 U. S. C. §119 (e) (1) 的规定要求专利保护 2000 年 12 月 29 日提交的临时申请 no. 60/259, 245 的优先权, 该申请在此被全文引入作为参考。

发明背景

多年来, 促红细胞生成素的唯一清楚的生理作用是控制红细胞的生成。最近, 几方面的证据暗示, 作为细胞因子超家族的一员, 促红细胞生成素通过与促红细胞生成素受体 (促红细胞生成素-R) 的相互作用为媒介发挥其它重要的生理功能。这些作用包括有丝分裂、调节进入平滑肌细胞和神经细胞的钙流以及对中间代谢的影响。据信, 促红细胞生成素提供补偿性应答来改善缺氧的细胞的微环境, 并调节由代谢应激反应引起的程序性细胞死亡。虽然研究已经确定颅内注射的促红细胞生成素可保护神经细胞免受缺氧性神经损伤, 但是颅内给药对于治疗用途来说是一条不切实际的和无法接受的给药路径, 尤其对正常个体来说。另外, 对贫血病人给予促红细胞生成素的先前研究已经断定, 外周给药的促红细胞生成素不能转运到脑中 (Marti et al., 10 1997, *Kidney Int.* 51:416-8; Juul et al., 1999, *Pediatr. Res.* 46: 543-547; Buemi et al., 2000, *Nephrol. Dial. Transplant.* 15: 422-433.)。 15 20

已经描述了各种修饰形式的促红细胞生成素, 它们具有用来提高其分子促红细胞生成活性的活性, 例如在美国专利 5, 457, 089 和美国专利 4, 835, 260 中描述的在羧基末端具有改变的氨基酸的促红细胞生成素。每个分子带有不同数量唾液酸残基的促红细胞生成素异构型, 例如披露于美国专利 5, 856, 292 的; 披露于美国专利 4, 703, 008 中的多肽; 披露在美国专利 5, 767, 078 中的激动剂; 在美国专利 5, 773, 569 和 5, 830, 851 中披露的结合于促红细胞生成素受体的肽; 以及披露于 25 30 美国专利 5, 835, 382 中的小分子模拟物。

本发明的目标在于使用促红细胞生成素来保护、维持、增强或修复在原位的和来自体内的促红细胞生成素应答性细胞和相关细胞、组织

和器官，以及输送促红细胞生成素或者携带结合的分子跨越内皮细胞屏障以便保护和增强远离血管系统的红细胞生成素应答性细胞和相关细胞、组织以及器官。

发明概述

5 在一方面，本发明的目的在于使用促红细胞生成素来制备药物组合物用于保护、维持、增强或修复促红细胞生成素应答性哺乳动物细胞及其相关细胞、组织和器官的功能或存活力。在一个特别的方面，这些促红细胞生成素应答性哺乳动物细胞及其相关细胞、组织和器官由于紧密内皮细胞屏障而远离血管系统。在另一个特别的方面，这些细
10 胞、组织、器官或其它身体部分分离自哺乳动物体，如计划用于移植的部分。作为非限制性实例，促红细胞生成素应答性细胞或组织可以是神经、视网膜、肌肉、心脏、肺、肝、肾、小肠、肾上腺皮质、肾上腺髓质、毛细管内皮、睾丸、卵巢、胰腺或子宫内膜的细胞或组织。这些促红细胞生成素应答性细胞的例子仅仅是例证性的。一方面，这
15 些促红细胞生成素应答性细胞及其相关细胞、组织和器官不是易兴奋的细胞、组织或器官，或者不是主要由易兴奋的细胞或组织构成。在一个特定的实施方案，使用上述促红细胞生成素衍生物的哺乳动物细胞、组织或器官是在不利于该细胞、组织或器官存活的至少一种状态
20 下已消耗了或将要消耗一段时间的细胞组织或器官。这样的条件包括原位创伤性缺氧或代谢功能紊乱、外科手术引起的原位组织缺氧或代谢功能紊乱、或者原位毒物暴露，后者可能与化学治疗或放射治疗有关。在一个实施方案中，不利条件是用于某些外科手术的心肺分流术（心肺机）导致的结果。

25 促红细胞生成素适用于治疗性或预防性处理主要具有神经性或精神性症状的人 CNS 疾病或外周神经系统疾病，以及眼科疾病、心血管疾病、心肺疾病、呼吸道疾病、肾、泌尿和生殖系统疾病、胃肠道疾病以及内分泌和代谢紊乱。

30 本发明还涉及包含特定促红细胞生成素衍生物的药物组合物，用于对哺乳动物，特别是人给药。这种药物组合物可以配方成口服、鼻饲或非肠道给药，或者灌注液的形式，用于维持来自体内的细胞、组织或器官存活力。

适用于前述目的的促红细胞生成素衍生物可以是任何天然促红细

胞生成素，或者促红细胞生成素类似物、促红细胞生成素模拟物，以及促红细胞生成素片断、杂交的促红细胞生成素分子、促红细胞生成素受体结合分子、促红细胞生成素激动剂、肾促红细胞生成素、脑促红细胞生成素、其寡聚物、其多聚物、其突变体、其同类物、其天然产生的形式、其合成形式、其重组形式、其糖基化变异体、其去糖基化变异体，或者其组合。能够有益于促红细胞生成素应答性细胞的任何形式的促红细胞生成素都包括在本发明的这个方面中。

适用于前述目的和药物组合物的其它促红细胞生成素衍生物包括，天然促红细胞生成素以及与天然促红细胞生成素相比被至少一处修饰而改变的促红细胞生成素，优选地是与天然的人促红细胞生成素相比。至少一处修饰可以是促红细胞生成素分子至少一个氨基酸的修饰，或者促红细胞生成素分子至少一个糖基的修饰。当然，适用于该目的的促红细胞生成素分子与天然分子相比可以有许多修饰，例如对分子氨基酸部分的多处修饰，对分子糖基部分的多处修饰，或者对分子氨基酸部分的至少一处修饰和对分子糖基部分的至少一处修饰。经修饰的促红细胞生成素分子保持其保护、维持、增强或修复促红细胞生成素应答性哺乳动物细胞的功能或存活力的能力，而与天然分子相比，与前述理想的特点不相关的促红细胞生成素分子的其它性质可能不存在。在优选的实施方案中，促红细胞生成素衍生物是非促红细胞生成的。

在一个实施方案中，本发明的促红细胞生成素至少没有唾液酸部分。在优选的实施方案中，修饰的促红细胞生成素是脱唾液酸促红细胞生成素，以及最优选的是人脱唾液酸促红细胞生成素。在另一个实施方案中，修饰的促红细胞生成素具有 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 或 13 个唾液酸部分。

在第二个实施方案中，修饰的促红细胞生成素至少没有 N-连接或没有 O-连接的糖基。

在本发明的第三个实施方案中，修饰的促红细胞生成素通过用至少一种糖苷酶处理带有其天然糖基的促红细胞生长素而具有至少降低的糖基含量。

在第四个实施方案中，通过非哺乳动物细胞中表达重组促红细胞生成素，修饰的促红细胞生成素分子的糖基部分具有至少一种非哺乳

动物糖基化模式。在优选的实施方案中，修饰的促红细胞生成素是在昆虫细胞或植物细胞中表达的。

5 在第五个实施方案中，修饰的促红细胞生成素具有至少一个或几个被氧化的糖基，该氧化的糖基也可被化学还原。在一个优选的实施方案中，修饰的促红细胞生成素是高碘酸氧化的促红细胞生成素；在另一个优选的实施方案中，该高碘酸氧化的促红细胞生成素是用硼氢化物如硼氢化钠或氰基硼氢化钠化学还原的。

10 在第六个实施方案中，用于前述用途的修饰促红细胞生成素具有至少一个或几个修饰的精氨酸残基。在一个实施方案中，修饰的促红细胞生成素在一个或几个精氨酸残基上包含乙二醛部分，如芳基乙二醛或烷基乙二醛部分。在另一个实施方案中，至少一个精氨酸残基通过与邻二酮诸如但不限于 2,3-丁二酮或环己二酮反应而被修饰。

15 在第七个实施方案中，修饰的促红细胞生成素包含至少一个或几个修饰的赖氨酸，或者修饰促红细胞生成素分子的 N-末端氨基，如由于赖氨酸残基或 N-末端氨基与氨基修饰试剂反应而引起的修饰。修饰的赖氨酸残基进一步可被化学还原。在一个优选的实施方案中，促红细胞生成素是通过一个或几个赖氨酸基团被生物素化或氨甲酰化。在另一个优选的实施方案中，赖氨酸与醛或还原性糖反应形成亚胺，可通过用诸如氰基硼氢化钠还原形成 N-烷基赖氨酸例如葡萄糖基赖氨酸而使
20 赖氨酸稳定，或者在还原糖的情况下，可以通过 Amadori 或 Heyns 重排形成 α -脱氧- α -氨基糖例如 α -脱氧- α -果糖赖氨酸而使其稳定。在另一个优选的实施方案中，赖氨酸基团被氨甲酰化（氨基甲酰化），例如通过与氰酸盐离子反应，分别与烷基-异氰酸盐、芳基异氰酸盐或芳基-异硫氰酸盐反应，被烷基-氨甲酰化、芳基氨甲酰化或芳基-硫氨
25 甲酰化，或者它可被活性烷基羧酸或芳基羧酸衍生物酰基化，如通过与乙酐、琥珀酸酐或邻苯二甲酸酐反应。至少一个赖氨酸基团也可通过与三硝基苯磺酸或者优选其盐反应而被三硝基苯基修饰。在另一个实施方案中，赖氨酸残基可通过与乙二醛衍生物反应而被修饰，如与乙二醛、甲基乙二醛或 3-脱氧葡萄糖醛酮反应形成相应的 α -羧烷基衍生物。
30 物。

在第八个实施方案中，促红细胞生成素的至少一个酪氨酸残基可通过亲电子试剂如通过硝化或碘化在芳环位置被修饰。

在第九个实施方案中,促红细胞生成素的至少一个天冬氨酸或谷氨酸残基可被修饰,例如通过与碳化二亚胺反应,接着与胺诸如但不限于甘氨酸反应。

5 在第十个实施方案中,促红细胞生成素的至少一个色氨酸残基被修饰,例如通过与 *n*-溴琥珀酰亚胺或 *n*-氯琥珀酰亚胺反应。

在第十一个实施方案中,提供了一种被修饰的促红细胞生成素分子,至少一个促红细胞生成素氨基已被除去,例如通过与茚三酮反应,接着通过与硼氢化物反应而还原得到的羰基。

10 在第十二个实施方案中,提供了一种修饰的促红细胞生成素,在该促红细胞生成素分子中具有打开的至少一个胱氨酸键,是通过与还原剂例如二硫苏糖醇反应,接着使得到的巯基与碘乙酰胺、碘乙酸或另一个亲电子试剂反应以防止二硫键的重新形成。

15 在第十三个实施方案中,提供了一种修饰的促红细胞生成素,使用分子生物学技术,以许多氨基酸中的任何一个,例如亮氨酸至少一次取代促红细胞生成素的至少一个赖氨酸、精氨酸、色氨酸、酪氨酸或半胱氨酸残基。

在第十四个实施方案中,对修饰的促红细胞生成素进行了有限的化学蛋白质水解,蛋白水解作用对准特定的残基,例如在色氨酸残基后裂解。在此将这样得到的促红细胞生成素片段包括在内。

20 如上所述,适用于本发明目的的促红细胞生成素可能具有至少一个前述的修饰,但是也可以具有上述修饰的不止一个。作为具有对分子糖基部分的一个修饰和对氨基酸部分的一个修饰的被修饰促红细胞生成素的一个例子,修饰的促红细胞生成素可以是脱唾液酸促红细胞生成素,并具有其赖氨酸残基被生物素化或氨甲酰化。本发明也包括几个组合物,包括药物组合物,其含有一个或几个前述的促红细胞生成素。

30 本发明的另一个方面,提供了一种方法,用于通过给予有效量的任何一种或几种前述的促红细胞生成素,来保护、维持、增强或修复促红细胞生成素应答性哺乳动物细胞及其相关细胞、组织或器官的功能或存活力。在该方法的一个特别的方面,促红细胞生成素应答哺乳动物细胞及其相关细胞、组织或器官由于紧密的内皮细胞屏障而远离血管系统。在另一个特别的方面,这些细胞、组织、器官或其它身体部

分是从哺乳动物体分离出的，例如计划用于移植的部分。作为非限制性例子，促红细胞生成素应答性细胞或组织可以是神经元、视网膜、肌肉、心脏、肺、肝、肾、小肠、肾上腺皮质、肾上腺髓质、毛细血管内皮、睾丸、卵巢、或者子宫内膜的细胞或组织。这些促红细胞生成素应答性细胞的例子仅仅是例证性的。在一个特别的实施方案中，这些促红细胞生成素应答性细胞或其相关细胞、组织和器官不是易兴奋的细胞、组织或器官，或者不是主要由易兴奋的细胞或组织构成。在另一个特定的实施方案中，使用上述促红细胞生成素衍生物的哺乳动物细胞、组织或器官是在不利于该细胞、组织或器官存活的至少一种状态下已消耗了或将要消耗一段时间的细胞组织或器官。这样的条件可以包括原位创伤性组织缺氧或代谢功能紊乱、外科手术引起的原位组织缺氧或代谢功能紊乱、或者原位毒物暴露，后者可能与化学治疗或放射治疗有关。在一个实施方案中，本发明要防护的不利条件来自心肺分流术。

在本发明的另一分方面，前述的任何促红细胞生成素以及任何其它的促红细胞生成素分子包括天然的人促红细胞生成素都可用来制备用于细胞、组织和器官的体内治疗的药物组合物，目的在于保护、维持、增强或修复促红细胞生成素应答性哺乳动物细胞及其相关细胞、组织和器官的功能或存活力。这种体内治疗是有用的，例如用于保存移植用的细胞、组织或器官，无论是自体移植或是异体移植。这些细胞、组织或器官可浸浴在包含促红细胞生成素的溶液中，或者将这种灌注液通过血管系统或其他其它途径输入进器官中，以便在这些细胞、组织或器官尚未与供体或受体血管系统结合期间维持细胞的功能。灌注液可以给予器官采集前的供体，以及已采集的器官和受体。而且，任何促红细胞生成素的上述用途在细胞、组织或器官与个体的血管系统分离时是有效的，这样基本上以体内状态存在了一段时间，术语“分离”是指限制或夹住细胞、组织、器官或身体一部分的血管系统或通向它们的血管系统，例如可在外科手术中进行，特别是包括心肺旁路外科手术；细胞、组织、器官或身体一部分的血管系统分流术；从哺乳动物身体取出细胞、组织、器官或身体的一部分，这可以在异体移植前或自体移植前以及自体移植过程中进行；或者是细胞、组织、器官或身体一部分的创伤性切除手术。这样，本发明的这个方面在原位

和来自体内两种情况下都适合用促红细胞生成素输液。在来自体内的情况下，促红细胞生成素可被置于细胞、组织或器官保存溶液中。对于二者，促红细胞生成素的施用可以通过连续输液、脉动输液、浸入、浸泡、注射或导管导入进行。

5 还有另一方面，本发明涉及一种方法，用于保护、维持、增强或恢复哺乳动物细胞、组织、器官或身体一部分的生存力，它们包含促红细胞生成素应答性细胞或组织，其中该细胞、组织、器官或身体一部分是从哺乳动物体分离的。该方法包括至少将分离的哺乳动物细胞、组织、器官或身体一部分暴露于可有效保护、维持、增强或恢复上述
10 生存力的某一数量的促红细胞生成素一段时间。在非限制性的例子中，“分离”是指限制或夹住细胞、组织、器官或身体一部分的血管系统或通向它们的血管系统，诸如可在外科手术中进行，特别是包括心肺旁路外科手术；细胞、组织、器官或身体一部分的血管系统分流术；从哺乳动物身体取出细胞、组织、器官或身体一部分，这可以在
15 异体移植前或自体移植前以及自体移植过程中进行；或者是细胞、组织、器官或身体一部分的创伤性切除手术。这样，本发明的这个方面在原地和来自体内两种情况下都适合用促红细胞生成素输液。在来自体内的情况下，促红细胞生成素可被置于细胞、组织或器官保存溶液中。对于二者，促红细胞生成素的施用可以通过连续输液、脉动输液、
20 浸入、浸泡、注射或导管导入进行。

在上述的分离或来自体内的实施方案中，适用的促红细胞生成素可以是上述促红细胞生成素的任何一种，包括任何天然的促红细胞生成素，或者促红细胞生成素类似物、促红细胞生成素模拟物，以及促红细胞生成素片断、杂交促红细胞生成素分子、促红细胞生成素受体结合分子、促红细胞生成素激动剂、肾促红细胞生成素、脑促红细胞生成素、其寡聚体、其多聚体、其突变体、其同源物、其天然产生的形式、其合成形式、其重组形式、其糖基化变异体、其去糖基化变异体，
25 或者其组合。能够有益于促红细胞生成素应答性细胞的任何形式的促红细胞生成素都包括在本发明的这个方面中。其它促红细胞生成素包括但不限于脱唾液酸促红细胞生成素、N-去糖基化促红细胞生成素、
30 O-去糖基化促红细胞生成素、具有低糖基含量的促红细胞生成素、具有改变的糖基化模式的促红细胞生成素、具有被氧化然后被还原糖基

的促红细胞生成素、芳基乙二醛修饰的促红细胞生成素、烷基乙二醛修饰的促红细胞生成素、2,3-丁二酮修饰的促红细胞生成素、环己二酮修饰的促红细胞生成素、生物素化的促红细胞生成素、N-烷基-赖氨酰-促红细胞生成素、葡糖基赖氨酸促红细胞生成素、 α -脱氧- α -果糖赖氨酸促红细胞生成素、氨甲酰化促红细胞生成素、乙酰化促红细胞生成素、琥珀酰化促红细胞生成素、 α -羧烷基促红细胞生成素、硝化促红细胞生成素、碘化促红细胞生成素，根据此处的讲述还可列举一些代表性的但非限制性的例子。人促红细胞生成素是优选的；天然的人促红细胞生成素是最优选的。在另一个实施方案中，人脱唾液酸促红细胞生成素是优选的。在另一个实施方案中，人苯基乙二醛促红细胞生成素是优选的。

作为非限制性的例子，上述来自体内的促红细胞生成素应答性细胞或组织可以是或者包含神经元、视网膜、肌肉、心脏、肺、肝、肾、小肠、肾上腺皮质、肾上腺髓质、毛细血管内皮、睾丸、卵巢、或者子宫内膜的细胞或组织。这些促红细胞生成素应答性细胞的例子仅仅是例证性的。

所有上述方法和用途都优选地适用于人类，但是对任何哺乳动物也是同样有用的，诸如但不限于宠物、驯养动物、家畜和观赏动物。上述药物组合物的给药途径包括口腔、静脉内、鼻腔、体表、腔内、呼吸道或非肠道给药，后者包括静脉内、动脉内、皮下、肌内、腹膜内、粘膜下或真皮内给药。对来自体内用途，输注液或浸泡溶液是优选的。这包括对血管系统分离的部分原位输液。

在本发明的另一方面，上述促红细胞生成素的任何一种在制备用于恢复功能紊乱的细胞、组织或器官的药物组合物中是有用的，在造成功能紊乱的疾病或状态发作之后给药。作为非限制性的例子，给予含有促红细胞生成素的药物组合物恢复了曾遭受脑创伤的动物的认知功能，甚至在创伤已经消退很长时间（例如三天、五天、一周、一个月或更久）之后给药也可以。适用于这些应用的促红细胞生成素包括上述特定的促红细胞生成素的任何一种，或任何天然的促红细胞生成素，或者促红细胞生成素类似物、促红细胞生成素模拟物，以及促红细胞生成素片断、杂交的促红细胞生成素分子、促红细胞生成素受体结合分子、促红细胞生成素激动剂、肾促红细胞生成素、脑促红细胞

生成素、其寡聚体、其多聚体、其突变体、其同源物、其天然产生的形式、其合成形式、其重组形式、其糖基化变体、其去糖基化变体，或者其组合。能够有助于促红细胞生成素应答性细胞的任何形式的促红细胞生成素都包括在本发明的这个方面中。适用于上述目的和
5 药物组合物的其它促红细胞生成素衍生物，包括天然促红细胞生成素以及天然促红细胞生成素相比被至少一种修饰而改变的促红细胞生成素，优选地是与天然的人促红细胞生成素相比。至少一种修饰可以是对促红细胞生成素分子的至少一个氨基酸的修饰，或者对促红细胞生成素分子的至少一个糖基的修饰。当然，适用于该目的的促红细胞生成素分子与天然分子相比可以具有许多修饰，例如对分子氨基酸部分的多处修饰，对分子糖基部分的多处修饰，或者对分子氨基酸部分的至少一处修饰和对分子糖基部分的至少一处修饰。修饰的促红细胞生成素分子保持其保护、维持、增强或恢复促红细胞生成素应答性哺乳动物细胞的功能或存活力的能力，而相比于天然分子，与上述的理想特征无关的促红细胞生成素分子的其它特性可以没有。人促红细胞生成素是优选的；天然的人促红细胞生成素是最优选的。在另一个实施方案中，人脱唾液酸促红细胞生成素是优选的。

在另一个实施方案中，本发明提供了一种方法，使用上述促红细胞生成素来恢复功能紊乱的细胞、组织或器官，在造成功能紊乱的疾病
20 或状态开始发作之后给药。作为非限制性的例子，施用含有促红细胞生成素的药物组合物的方法恢复了曾遭受脑创伤的动物的认知功能，甚至在创伤已经消退很长时间（例如三天、五天、一周、一个月或更久）之后给药也可以。适用于这些方法的促红细胞生成素包括上述特定的促红细胞生成素的任何一种，或任何天然的促红细胞生成素，或者促红细胞生成素类似物、促红细胞生成素模拟物，以及促红细胞生成素片断、杂交的促红细胞生成素分子、促红细胞生成素受体结合分子、促红细胞生成素激动剂、肾促红细胞生成素、脑促红细胞生成素、其寡聚物、其多聚物、其突变体、其同源物、其天然产生的形式、其合成形式、其重组形式、其糖基化变体、其去糖基化变体，或者
25 其组合。能够有助于促红细胞生成素应答性细胞的任何形式的促红细胞生成素都包括在本发明的这个方面中。适用于上述目的和药物组合物的其它促红细胞生成素衍生物包括天然促红细胞生成素以及天然

促红细胞生成素相比被至少一种修饰而改变的促红细胞生成素，优选地是天然的人促红细胞生成素相比。至少一种修饰可以是对促红细胞生成素分子的至少一个氨基酸的修饰，或者对促红细胞生成素分子的至少一个糖基的修饰。当然，适用于该目的的促红细胞生成素分子与天然分子相比可以具有许多修饰，例如对分子氨基酸部分的多处修饰，对分子糖基部分的多处修饰，或者，对分子氨基酸部分的至少一处修饰和对分子糖基部分的至少一处修饰。修饰的促红细胞生成素分子保持其保护、维持、增强或恢复促红细胞生成素应答性哺乳动物细胞的功能或存活力的能力，而相比于天然分子，与上述的理想特征无关的促红细胞生成素分子其它特性可以没有。人促红细胞生成素是优选的；天然的人促红细胞生成素是最优选的。在另一个实施方案中，人脱唾液酸促红细胞生成素是优选的。

在本发明更进一步的一个方面，提供了一种方法，用于促进一种分子转胞吞 (transcytosis) 跨越哺乳动物中的内皮细胞屏障，是通过给予与一种促红细胞生成素相结合的该分子的组合物，其中的促红细胞生成素包括例如：至少不含唾液酸部分的促红细胞生成素；至少没有 N-连接或没有 O-连接糖基的促红细胞生成素；通过用至少一种糖苷酶处理天然促红细胞生成素，而具有至少降低的糖基含量的促红细胞生成素；通过在非哺乳动物细胞中表达重组促红细胞生成素，而使被修饰的促红细胞生成素分子的糖基部分具有至少一种非哺乳动物糖基化模式的促红细胞生成素；具有至少一个或几个氧化糖基的促红细胞生成素，该氧化糖基也可被化学还原；具有至少一个或几个修饰的精氨酸残基的促红细胞生成素；具有至少一个或几个修饰的赖氨酸残基，或者促红细胞生成素分子的 N-末端氨基修饰的促红细胞生成素；具有至少一个修饰的酪氨酸残基的促红细胞生成素；具有至少一个修饰的天冬氨酸或谷氨酸残基的促红细胞生成素；具有至少一个修饰的色氨酸残基的促红细胞生成素；具有至少一个氨基被除去的促红细胞生成素；具有至少打开促红细胞生成素分子中至少一个胱氨酸键的促红细胞生成素；被提供的具有对至少一个氨基酸一次取代的促红细胞生成素；或者一种截短的促红细胞生成素。

在要被转运的分子和促红细胞生成素之间的连接可以是，例如，不稳定的共价键，稳定的共价键，或者是与此分子结合部位的非共价连

接。内皮细胞屏障可以是血-脑屏障、血-眼屏障、血-睾屏障、血-卵巢屏障和血-胎盘屏障。适合于用本发明的方法转运的分子包括激素例如生长激素，抗生素和抗癌制剂。

在本发明更进一步的一个方面，是提供了一种组合物，用来促进一种分子转胞吞跨越哺乳动物中的内皮细胞屏障，所述组合物包含与促红细胞生成素结合的该分子，此促红细胞生成素包括例如：至少不含唾液酸部分的促红细胞生成素；至少没有 N-连接或没有 O-连接糖基的促红细胞生成素；通过用至少一种糖苷酶处理天然促红细胞生成素，而具有至少降低的糖基含量的促红细胞生成素；通过在非哺乳动物细胞中表达重组促红细胞生成素，而使被修饰的促红细胞生成素分子的糖基部分具有至少一种非哺乳动物糖基化模式的促红细胞生成素；具有至少一个或几个氧化糖基的促红细胞生成素，该氧化糖基也可被化学还原；具有至少一个或几个修饰的精氨酸残基的促红细胞生成素；具有至少一个或几个修饰的赖氨酸残基或者促红细胞生成素分子的 N-末端氨基修饰的促红细胞生成素；具有至少一个修饰的酪氨酸残基的促红细胞生成素；具有至少一个修饰的天冬氨酸或谷氨酸残基的促红细胞生成素；具有至少一个修饰的色氨酸残基的促红细胞生成素；具有至少一个氨基被除去的促红细胞生成素；具有至少打开促红细胞生成素分子中至少一个胱氨酸键的促红细胞生成素；被提供具有对至少一个氨基酸一次取代的促红细胞生成素；或者一种截短的促红细胞生成素。

其连接可以是，例如，不稳定的共价键，稳定的共价键，或者是与此分子结合部位的非共价连接。内皮细胞屏障可以是血-脑屏障、血-眼屏障、血-睾屏障、血-卵巢屏障和血-胎盘屏障。适合于用本发明的方法转运的分子包括激素例如生长激素，抗生素和抗癌制剂。

在本发明更进一步的一个方面，上述促红细胞生成素的任何之一在制备药物组合物中是有用的，该药物组合物可用来促进一种分子转胞吞跨越哺乳动物中的内皮细胞屏障，所述组合物包含与促红细胞生成素结合的该分子，此促红细胞生成素包括例如，至少不含唾液酸部分的促红细胞生成素；至少没有 N-连接或 O-连接糖基的促红细胞生成素；通过用至少一种糖苷酶处理天然促红细胞生成素而具有至少降低的糖基含量的促红细胞生成素；通过在非哺乳动物细胞中表达重组促

红细胞生成素而使被修饰的促红细胞生成素分子的糖基部分具有至少一种非哺乳动物糖基化模式的促红细胞生成素；具有至少一个或几个氧化糖基的促红细胞生成素，该氧化糖基也可被化学还原；具有至少一个或几个修饰的精氨酸残基的促红细胞生成素；具有至少一个或几个修饰的赖氨酸残基或者促红细胞生成素分子的 N-末端氨基修饰的促红细胞生成素；具有至少一个修饰的酪氨酸残基的促红细胞生成素；具有至少一个修饰的天冬氨酸或谷氨酸残基的促红细胞生成素；具有至少一个修饰的色氨酸残基的促红细胞生成素；具有至少一个氨基被除去的促红细胞生成素；具有至少打开促红细胞生成素分子中至少一个肽键的促红细胞生成素；被提供的具有对至少一个氨基酸一次取代的促红细胞生成素；或者一种截短的促红细胞生成素。

其连接可以是，例如，不稳定的共价键，稳定的共价键，或者是与此分子结合部位的非共价连接。内皮细胞屏障可以是血-脑屏障、血-眼屏障、血-睾屏障、血-卵巢屏障和血-胎盘屏障。适合于用本发明的方法转运的分子包括激素例如生长激素，抗生素和抗癌制剂。

参考下面的附图和详细描述，本发明的这些方面以及其它方面将得到更好的理解。

附图简述

图 1 描述非经肠道注射给药的促红细胞生成素转运进入脑脊液。

图 2 显示在暂时的血管闭塞后，促红细胞生成素保护心肌免受缺血性损伤。

图 3 显示促红细胞生成素对准备移植的心脏维持其功能。

图 4 比较促红细胞生成素和脱唾液酸促红细胞生成素对血清饥饿的 P19 细胞存活力的体外功效。

图 5 是比较促红细胞生成素和脱唾液酸促红细胞生成素对血清饥饿的 P19 细胞存活力的体外功效的另一次实验。

图 6 比较促红细胞生成素和苯基乙二醛修饰的促红细胞生成素对血清饥饿的 P19 细胞存活力的体外功效。

图 7 显示促红细胞生成素和脱唾液酸促红细胞生成素在大鼠病灶性脑缺血模型中的保护作用。

图 8 显示比较人促红细胞生成素和人脱唾液酸促红细胞生成素对缺血性中风模型中大脑中部动脉闭塞功效的剂量响应。

图 9 显示生物素化促红细胞生成素和脱唾液酸促红细胞生成素在 P19 试验中的效果。

5 图 10 显示碘化促红细胞生成素在 P19 试验中的活性。

图 11 描述促红细胞生成素在大鼠青光眼模型中的治疗效果。

图 12 显示促红细胞生成素在大鼠青光眼模型中对视网膜功能保护的程

10 度。
图 13 描述在创伤后五天开始给予促红细胞生成素，大脑创伤后认知功能的恢复。

图 14 描述在创伤后 30 天开始给予促红细胞生成素，大脑创伤后认知功能的恢复。

图 15 描述人脱唾液酸促红细胞生成素在脑中毒的 kainate 模型中的功效。

15

发明详述

“促红细胞生成素应答性细胞”是指一种哺乳动物细胞，通过暴露于促红细胞生成素，其功能或生存力可以被维持、促进、增强、再生或者处于其它有利的方式。这种细胞的非限制性的例子包括神经、视网

20 膜、肌肉、心脏、肺、肝、肾、小肠、肾上腺皮质、肾上腺髓质、毛细血管内皮、睾丸、卵巢和子宫内膜的细胞。而且，这些促红细胞生成素应答性细胞和由促红细胞生成素对它提供的益处可以被延伸来提供间接地保护或增强不是直接促红细胞生成素应答性的其它细胞，或者包含这种非促红细胞生成素应答性细胞的组织或器官。这些间接受

25 益于促红细胞生成素应答性细胞增强作用的其它细胞、组织或器官，作为细胞、组织或器官的一部分，被称为“相关的”细胞、组织或器官。这样，在此所述的促红细胞生成素的益处可作为组织或器官中少量或小部分促红细胞生成素应答性细胞存在的结果而被提供，例如，此类组织中存在的易兴奋性组织或神经组织，或者睾丸中制造睾丸激

30 素的间质细胞。在一个方面，促红细胞生成素应答性细胞或其相关细胞、组织或器官不是易兴奋细胞、组织或器官，或者主要不是包含易兴奋性细胞或组织。

本发明的方法可对处在广范围的各种正常和不利状态下的哺乳动物体内的细胞、组织和器官提供局部或全身性保护或增强，或者保护那些预定移植到另一个哺乳动物体的细胞、组织或器官。此外，还可提供功能障碍恢复或更新。如上所述，促红细胞生成素跨越紧密的内皮细胞屏障并对远离血管系统的促红细胞生成素应答性细胞（以及其它类型的细胞）行使积极效果的能力，为预防和治疗否则将对动物包括人引起重大细胞和组织损伤的广范的多种状态和疾病提供了潜在的可能性，并且将使那些在传统上危险大于益处而迄今未能尝试的外科手术获得成功。为最终利益而诱发的有目的性不利状态的持续时间和程度，通过利用本发明可得以实现，例如大剂量化学治疗、放射治疗、延长来自体内移植体的存活以及延长外科手术引发缺血的时间。然而，本发明不限于此，但是作为一个方面它包括几种方法或组合物，其中的靶标性促红细胞生成素应答细胞由于内皮细胞屏障或内皮紧密连接而远离血管系统。总起来说，本发明的目的在于任何促红细胞生成素应答性细胞和相关的细胞、组织和器官，它们可从暴露于促红细胞生成素而受益。而且，通过暴露于促红细胞生成素，细胞、组织或器官的功能障碍可以在急性不利事件（如创伤）后恢复或更新。

因此，本发明普遍性目的在于使用促红细胞生成素来制备药物组合物，用于上述目的，其中细胞的功能被维持、促进、增强、再生或者以其它任何方式受益。本发明也涉及用于维持、促进、增强或再生细胞功能的方法，如所述是通过对哺乳动物给予有效量的促红细胞生成素。本发明进一步还涉及用于维持、促进、增强或再生来自体内的细胞功能的方法，是通过将细胞、组织或器官暴露于促红细胞生成素。本发明还涉及一种用于器官或组织保存的含有促红细胞生成素的灌注组合物。

本发明的各种方法都利用一种药物组合物，它包含至少一种有效剂量的促红细胞生成素，以特定的暴露途径和持续时间，对哺乳动物体内的或从其中取出的促红细胞生成素应答性细胞施加积极的效应或益处。当计划治疗的目标细胞、组织或器官需要促红细胞生成素以便跨越内皮细胞屏障时，该药物组合物中包含的促红细胞生成素的浓度，是在跨越内皮细胞屏障后能够对促红细胞生成素应答性细胞施加理想的效果的浓度。能与促红细胞生成素受体相互作用并调节受体活性的

分子，在此被称为促红细胞生成素或促红细胞生成素受体的活性调节剂，此分子适用于本发明的范围。如上所述，这些分子可以是，例如，促红细胞生成素分子的天然存在形式，合成的或重组的形式，或者如这里所述的，是其它一些分子，它们除了调节促红细胞生成素应答性细胞的活性外，可以不必以任何方式与促红细胞生成素相似。

促红细胞生成素是一种糖蛋白激素，在人体中它具有约 34 kDa 的分子量。其成熟的蛋白质包含 165 个氨基酸，其糖基残基构成分子约 40% 的重量。适用于本发明实施的促红细胞生成素形式，包括以下的人和其哺乳动物促红细胞生成素相关分子的天然存在的、合成的和重组的形式：促红细胞生成素、脱唾液酸促红细胞生成素、去糖基化促红细胞生成素、促红细胞生成素类似物、促红细胞生成素模拟物、促红细胞生成素片断、杂交的促红细胞生成素分子、促红细胞生成素受体结合分子、促红细胞生成素激动剂、肾促红细胞生成素、脑促红细胞生成素、其寡聚物和多聚物、其突变体及其同源物。此外，适用于本发明实施的促红细胞生成素形式还包括表现出功能等价的基因产物的蛋白质。这种等价的促红细胞生成素的基因产物包括突变促红细胞生成素，其可以包含缺失，包括内部缺失，添加，包括产生融合蛋白的添加，或者是此氨基酸序列中和/或其附近的氨基酸残基的保守性取代，但是它导致“沉默”的改变，其中该改变可产生功能性等价的促红细胞生成素。这样的氨基酸取代可以在所涉及残基的极性、电荷、可溶性、疏水性、亲水性和/或两亲性性质相似性的基础上进行。例如，非极性（疏水性）氨基酸包括丙氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、色氨酸和甲硫氨酸；极性电中性氨基酸包括甘氨酸、丝氨酸、苏氨酸、半胱氨酸、酪氨酸、天冬酰胺和谷氨酰胺；正电性（碱性）氨基酸包括精氨酸、赖氨酸和组氨酸；以及负电性（酸性）氨基酸包括天冬氨酸和谷氨酸。按另一种方式，非保守性氨基酸取代，以及较大的插入和缺失可用来产生功能改变的促红细胞生成素突变体。这样的突变体可用来按需要的方式改变促红细胞生成素的性质。例如，在一个实施方案中，适用于本发明实施的促红细胞生成素可以是这样一种突变的促红细胞生成素，此突变体在影响受体结合的促红细胞生成素的四个功能域内改变了一个或多个氨基酸：VLQRY 和/或 TKVNFYAW 和/或 SGLRSLTTL 和/或 SNFLRG。在另一个实施方案中，

可以使用在其分子周围区域内包含突变的促红细胞生成素这种突变影响此分子的动力学或受体结合性质。

术语“促红细胞生成素”和“一种促红细胞生成素”可以可交换地或结合地使用，而各种类似物、片断、杂交分子、激动剂、突变体以及上述的其它形式将这些变异体包括在促红细胞生成素的糖基化的范围5 和部位之内。包括天然的、去糖基化的、脱唾液酸的以及其它部分糖基化的促红细胞生成素形式。这些变异体的非限制性的例子被披露于 Tsuda 等，1990，欧洲生物化学杂志 188:405-411，在此引入作为参考。细菌、酵母、昆虫、植物、哺乳动物，包括人。此外，多种宿10 主系统可用于表达和生产重组促红细胞生成素，包括但不限于细菌、酵母、昆虫、植物和哺乳动物，包括人的细胞系统。例如，在细菌中生产的重组促红细胞生成素没有糖基化或唾液酸化产物，可用于生产促红细胞生成素的非糖基化形式。另一方面，重组促红细胞生成素可在其它进行糖基化的系统中生产，例如植物中，还包括人的细胞。

15 如上所述，本发明包括能够对促红细胞生成素应答性细胞施加积极活性的任何以及所有的促红细胞生成素受体活性调节剂分子，而不管该分子与促红细胞生成素的任何结构关系。

此外，促红细胞生成素本身可被修饰以使其活性适合于某一特定的组织或几种组织。几种非限制性策略，可被实施来获得这种需要的组20 织特异性。包括缩短循环半衰期从而减少促红细胞生成素可与红细胞前体相互作用时间的修饰，或者修饰促红细胞生成素分子的一级结构。降低循环半衰期的一种方法是去除或者修饰糖基化部分，促红细胞生成素有三个 N-连接的和一个 O-连接的糖基化部分。这种糖基化促红细胞生成素变异体可通过许多方式产生。例如，终止糖链末端的唾25 液酸，可通过作用于连接唾液酸与糖链的化学键的特异性唾液酸酶而除去。另外，糖基化结构可通过使用裂解特定键的其它酶以不同的方式被除去。修饰一级结构的技术有很多种，包括取代特定的氨基酸的，氨基酸的化学修饰，或者加入干扰促红细胞生成素与其任何受体相互作用的其它结构。促红细胞生成素这些形式的用途完全包括在本发明30 内。在优选的实施方案中，本发明的非促红细胞生成的促红细胞生成素的半衰期与天然促红细胞生成素相比缩短了约 90%。

这些分子中的一些将仍然在其它组织或器官中模拟促红细胞生成

素本身的作用。例如，包含天然促红细胞生成素的 31-47 氨基酸序列的 17-聚体，对于促红细胞生成是失活的，但是在体外对神经细胞是完全有活性的 (Campana & O'Brien, 1998: *Int. J. Mol. Med.* 1: 235-41)。

5 而且，有望适用于在此所述用途的衍生的促红细胞生成素分子可通过如下方法产生：胍基化、脒基化、氨甲酰化（氨基甲酰化）、三硝基苯基化、乙酰化、琥珀酰化、硝化，或者修饰精氨酸、赖氨酸、酪氨酸、色氨酸或半胱氨酸残基或者羧基，在其它方法中，例如借助于分子生物学技术有限的蛋白质水解、除去氨基，和/或诱变取代精氨酸、赖氨酸、酪氨酸、色氨酸或半胱氨酸残基，以便产生对特定的器官和组织保持足够水平的活性，但对其它器官和组织如红细胞无活性的促红细胞生成素，(例如 Satake 等; 1990, *Biochim. Biophys. Acta* 1038: 125-9; 在此全文引入作为参考)。如下所述的一个非限制性的例子是，通过与乙二醛如苯基乙二醛反应来修饰促红细胞生成素的精氨酸残基 (根据 Takahashi, 1977, *J. Biochem.* 81: 395-402 的方案)。
10 如下面可见，这种促红细胞生成素分子完全保留了其亲神经性效应。这种促红细胞生成素分子被全部包括在所述的各种用途和组合物中。

在这里提供了合成和重组的分子，例如脑促红细胞生成素和肾促红细胞生成素、重组的哺乳动物促红细胞生成素形式，以及其天然存在的、肿瘤衍生的和重组的异构型，例如重组表达的分子和那些以同源重组制备的分子。而且，本发明还包括含有结合促红细胞生成素受体肽的分子，以及拥有促红细胞生成素部分或全部结构和/或生物性质的重组构建体或其它分子，包括促红细胞生成素或其片断的片断和多聚体。
20 这里的促红细胞生成素包括具有改变的促红细胞生成素受体结合活性的分子，优选具有增强的受体亲和力，尤其是与增强跨越内皮细胞屏障有关的能力。含有增加或减少的糖基化位点数量的分子的突变体包括在内。如上所述，术语“促红细胞生成素”和“模拟物”及其它术语在此替换地使用，是指与促红细胞生成素有关的促红细胞生成素应答性细胞保护和增强的分子，以及能够跨越内皮细胞屏障的分子。
25 30

而且，这里还包括由转基因动物生产的分子。应该指出，这里包括

的促红细胞生成素分子不必在结构上或者以任何其它方式与促红细胞生成素相似，只要具有与促红细胞生成素受体相互作用或调节促红细胞生成素受体活性，或者激活促红细胞生成素活化的信号级联的能力，如这里所述的。

5 作为非限制性的例子，适用于本发明实施的促红细胞生成素形式包括促红细胞生成素突变体，例如它在羧基末端具有改变的氨基酸，被披露于美国专利 5,457,089 和美国专利 4,835,260；每个分子带有不同数量唾液酸残基的脱唾液酸促红细胞生成素和促红细胞生成素异构型，例如披露于美国专利 5,856,298 的；还有披露于美国专利
10 4,703,008 的多肽；披露于美国专利 5,767,078 的激动剂；如披露于美国专利 5,773,569 和 5,830,851 的结合于促红细胞生成素受体的肽；如披露于美国专利 5,835,382 的激活促红细胞生成素受体的小分子模拟物；以及披露于 WO 9505465, W09718318 和 W09818926 的促红细胞生成素相似物。所有上述引证在此被引入达到的程度使这些公开
15 内容运用于本发明制备这些类型促红细胞生成素的各种替换的形式或方法。

促红细胞生成素可从商业渠道获得，例如，使用 PROCRIT 商标的可从 Ortho Biotech Inc., Raritan, NJ 获得，以及使用 EPOGEN 商标的可从 Amgen, Inc., Thousand Oaks, CA 获得。

20 促红细胞生成素和类促红细胞生成素分子的活性（以活性单位表示）传统上被定义为其在啮齿动物模型中刺激红细胞生成的效力（这是由促红细胞生成素的国际标准衍生的）。常规促红细胞生成素（分子量约 34,000）的一个单位（U）是大约 8 ng 蛋白（1 mg 蛋白是约 125,000U）。然而，由于促红细胞生成作用的效果在这里对所期望的
25 活性来说是次要的，而且不一定是本发明某些促红细胞生成素的可检测特性，因此基于促红细胞生成活性的活性定义是不适合的。这样，如在这里使用的，促红细胞生成素或促红细胞生成素相关分子的活性单位，被定义为在神经或其它促红细胞生成素应答性细胞体系中引发
30 出同样的活性所需的蛋白的量，如在同样的体系中由 WHO 国际标准的促红细胞生成素所引发的。按照这里的指导，本领域技术人员容易确定非促红细胞生成的促红细胞生成素或相关分子的活性单位。

为对适用于这里的上述促红细胞生成素的修饰作进一步阐述，下面

的论述将扩展到本发明的各种促红细胞生成素。

本发明的促红细胞生成素可以至少没有唾液酸部分,被称为脱唾液酸促红细胞生成素。优选地,本发明的促红细胞生成素是人脱唾液酸促红细胞生成素。在另一实施方案中,本发明的促红细胞生成素可以
5 至少有 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 或 13 个唾液酸残基。它可通过使用唾液酸酶使促红细胞生成素脱唾液酸来制备,例如在来自 ProZyme Inc., San Leandro, California 的唾液酸酶 A 的厂商包装中所描述的。典型地, PROZYME®GLYCOPRO®测序级 SIALYDASE ATM (N-乙酰神经酰胺糖水解酶, EC 3.2.1.18) 被用来从糖和糖蛋白复合
10 体如促红细胞生成素中切除所有非还原态的末端唾液酸残基。它也将如此切除分枝的唾液酸(连接到内部残基的)。唾液酸酶是从 *Arthrobacter ureafaciens* 的克隆中分离出的。

促红细胞生成素可具有至少降低数量的 N-连接糖基。要除去 N-连接的糖基,可用胼处理促红细胞生成素,例如按照披露于 Hermentin
15 等, 1996, *Glycobiology* 6(2):217-30 的方法进行。如上所述,促红细胞生成素具有三个 N-连接的糖基部分;本发明包括那些具有两个、一个或没有 N-连接糖基的促红细胞生成素。

通过使用至少一种糖苷酶处理天然促红细胞生成素,本发明的促红细胞生成素可以具有至少降低的糖基含量。例如,可以按照: Chen 和
20 Evangelista, 1998, *Electrophoresis* 19(15): 2639-44 中的方法进行。此外,按照描述于 Hokke 等, 1995, *Eur. J. Biochem.* 228(3): 981-1008 中的方法,可达到除去 O-连接糖基的目的。

通过非哺乳动物细胞中表达重组促红细胞生成素,促红细胞生成素分子的糖基部分可以具有至少一种非哺乳动物糖基化模式。优选
25 地,促红细胞生成素是在昆虫或植物细胞中被表达。作为非限制性的例子,使用腺病毒表达体系在昆虫细胞中表达促红细胞生成素,可以按照如下文献的方法进行: Quelle 等, 1989, *Blood* 74(2): 652-657。另一个方法披露于美国专利 5,637,477。在植物体系中的表达可以按照如下文献的方法进行: Matsumoto 等, 1993, *生物科学、生物技术、
30 生物化学* 57(8):1249-1252。另一方面,在细菌中的表达将产生非糖基化形式的促红细胞生成素。这些仅仅是适用于产生本发明促红细胞生成素的例证性方法,并没有任何方式的限制。

本发明的促红细胞生成素可以具有至少一个或几个氧化糖基,这些氧化糖基也可被化学还原。例如,促红细胞生成素可以是高碘酸氧化的促红细胞生成素;此高碘酸氧化的促红细胞生成素也可用硼氢化盐例如硼氢化钠或氰基硼氢化钠进行化学还原。促红细胞生成素的高碘酸氧化例如可按照如下文献中所述的方法进行: Linsley 等, 1994, Anal. Biochem. 219(2):207-17。高碘酸氧化后的化学还原可按照如下文献中的方法进行: Tonelli 和 Meints, 1978, J. Supramol. Struct. 8(1):67-78。

用于上述用途的促红细胞生成素可以具有至少一个或几个修饰的精氨酸残基。例如,修饰的促红细胞生成素可以在一个或几个精氨酸残基上包含 R-乙二醛部分,在此 R 可以是芳基、杂环芳基、低级烷基、低级烷氧基、或环烷基、或 α -脱氧糖酮基。如这里使用的,术语低级“烷基”意指直链或支链的饱和脂肪族烃基团,优选含有 1-6 个碳原子。这种基团的代表是甲基、乙基、异丙基、异丁基、丁基、戊基、和己基等。术语“烷氧基”意指如上述定义的低级烷基通过氧原子与分子的其余部分相连。烷氧基的例子包括甲氧基、乙氧基、丙氧基、和异丙氧基等。术语“环烷基”是指具有三个到约 8 个原子的环状烷基,包括例如环丙基、环丁基、和环己基等。术语芳基是指苯基和萘基。术语杂环芳基是指包含 4-10 个环原子和 1-3 个杂原子的杂环基,杂原子选自氧、氮和硫。例子包括但不限于异唑基、苯基异唑基、咪唑基、嘧啶基、喹啉基、四氢喹啉基、吡啶基、咪唑基、吡咯烷基、1,2,4-三唑基、噻唑基和噻吩基等。R 基团可被取代,例如 3-脱氧葡萄糖醛酮的 4-三羟基丁基。R-乙二醛化合物的典型例子是乙二醛、甲基乙二醛、3-脱氧葡萄糖醛酮和苯基乙二醛。优选的 R-乙二醛化合物是甲基乙二醛或苯基乙二醛。使用苯基乙二醛进行这种修饰的例证性的方法可在如下文献中找到:Werber 等, 1975, Isr. J. Med. Sci. 11(11):1169-70。

在进一步的实例中,至少一个精氨酸残基通过与邻二酮例如 2,3-丁二酮或环己二酮反应而被修饰,优选地在大约 50 毫摩尔硼酸盐缓冲液 pH 8-9 中进行。使用 2,3-丁二酮的后一种修饰程序可按照如下文献进行: Riordan 等, 1973, Biochemistry 12(20): 3915-3923; 以及使用环己二酮的程序可按照如下文献进行: Patthy 等, 1975, J.

Biol. Chem. 250(2): 565-9.

本发明的促红细胞生成素可包含至少一个或几个修饰的赖氨酸残基或者对促红细胞生成素分子 N-末端氨基的修饰，象来自赖氨酸残基与氨基修饰试剂反应的修饰。在另一个实施方案中，赖氨酸残基可通过与乙二醛衍生物反应而被修饰，例如与乙二醛、甲基乙二醛和 3-脱氧葡萄糖醛酮反应而形成 α -羧烷基衍生物。与乙二醛反应形成羧甲基赖氨酸的例子是在如下文献中: Glomb 和 Monnier, 1995, J. Biol. Chem. 270(17): 10017-26, 或者使用甲基乙二醛形成 (1-羧乙基) 赖氨酸的例子是: 在如下文献中 Degenhardt 等, 1998, Cell. Mol. Biol. (Noisy-le-grand) 44(7): 1139-45. 修饰的赖氨酸残基可进一步被化学还原。例如, 此促红细胞生成素可经过赖氨酸基团被生物素化, 例如根据实施例 5 所述的方法, 其中先使 D-生物素- ϵ -氨基己酸-N-羧基琥珀酰亚胺酯与促红细胞生成素反应, 随后在 Centricon 10 柱上通过凝胶过滤除去未反应的生物素, 其披露于: Wojchowski 和 Caslake, 1989, Blood 74(3): 952-8. 在本文中, 作者使用了三种不同的方法生物素化促红细胞生成素。其中任何一种方法都可用于制备此处使用的促红细胞生成素。生物素可以被加入到 (1) 唾液酸部分, (2) 羧基部分, (3) 氨基部分。

在另一个优选的实施方案中, 赖氨酸可以与醛或还原糖反应形成亚胺, 可通过例如以氰基硼氢化钠还原形成 N-烷基赖氨酸如葡萄糖基赖氨酸而使其稳定化, 或者在还原糖的情况下, 可以通过 Amadori 或 Heyns 重排形成 α -脱氧- α -氨基糖例如 α -脱氧- α -果糖赖氨酸而被稳定。作为例子, 通过与 0.5 M 葡萄糖在磷酸钠缓冲液 pH 7.4 下保温 60 天制备果糖赖氨酸修饰的蛋白质的方法披露于: Makita 等, 1992, J. Biol. Chem. 267: 5133-5138. 在另一个实施例中, 赖氨酸基团可被氨甲酰化, 如通过与氰酸盐反应, 或者与烷基或芳基异氰酸盐或异硫氰酸盐反应被烷基或芳基氨甲酰化或硫氨甲酰化, 或者它可被活性烷基或芳基羧酸衍生物酰基化, 如通过与乙酐或琥珀酸酐或邻苯二甲酸酐反应。范例是用 4-硫代苯基异硫氰酸盐或用乙酐修饰赖氨酸基团, 两者都如下列文献中所述: Gao 等, 1994, 美国国家科学院学报 91(25): 12027-30. 赖氨酸基团也可通过与三硝基苯磺酸或者优选其盐反应而被三硝基苯基修饰。这种方法在下面实施例 5 中被描述。

促红细胞生成素的至少一个酪氨酸残基可通过亲电子试剂如通过硝化或碘化在芳环位置被修饰。作为非限制性的例子,可使促红细胞生成素与四硝基甲烷反应(Nestler 等, 1985, J. Biol. Chem. 260(12): 7316-21;)或者如实施例 5 描述的被碘化。

5 促红细胞生成素的至少一个天冬氨酸或谷氨酸残基可通过与碳化二亚胺反应, 然后与胺, 例如但不限于甘氨酸反应而被修饰。这种修饰的例子可在实施例 5 中找到。

在另一个实施例中, 促红细胞生成素的色氨酸残基可被修饰, 例如通过与 n-溴琥珀酰亚胺或 n-氯琥珀酰亚胺反应, 按照例如如下文献中所述方法进行: Josse 等, Chem Biol Interact 1999. 5. 14; 119-120。

10 在另一个实施例中, 可通过去除至少一个氨基, 来制备促红细胞生成素分子, 例如通过与茚三酮反应, 随后通过与硼氢化物反应还原得到的羰基而获得。

在更进一步的实施例中, 提供一种促红细胞生成素, 在该促红细胞生成素分子中具有打开的至少一个胱氨酸键, 是通过与还原剂例如二硫苏糖醇反应, 接着使得到的巯基与碘乙酰胺、碘乙酸或另一个亲电子试剂反应以防止二硫键的重新形成。

提供了一种具有至少一个取代的促红细胞生成素, 使用分子生物学技术, 以许多氨基酸中任何一个, 例如亮氨酸至少一次取代促红细胞生成素的至少一个赖氨酸、精氨酸、色氨酸、酪氨酸或半胱氨酸残基。

20 修饰的促红细胞生成素可通过对促红细胞生成素进行有限的化学蛋白水解而制备, 该蛋白水解对准特定的残基, 例如在色氨酸残基后裂解。在此将这样得到的促红细胞生成素片断包括在内。

如上所述, 适用于本发明目的的促红细胞生成素可具有至少一个前述修饰, 但是也可以具有上述修饰的不止一个。作为具有对分子糖基部分的一个修饰和对氨基酸部分的一个修饰的被修饰促红细胞生成素的一个例子, 修饰的促红细胞生成素可以是脱唾液酸促红细胞生成素, 并具有其赖氨酸残基被生物素化或氨甲酰化。

30 这样, 用于在此所述用途的各种促红细胞生成素分子以及包含它们的药物组合物都包括在内。这种促红细胞生成素分子包括但不限于脱唾液酸促红细胞生成素、N-去糖基化促红细胞生成素、O-去糖基化促红细胞生成素、具有低糖基含量的促红细胞生成素、具有改变的糖基

化模式的促红细胞生成素、具有被氧化然后被还原的糖基的促红细胞生成素、芳基乙二醛修饰的促红细胞生成素、烷基乙二醛修饰的促红细胞生成素、2,3-丁二酮修饰的促红细胞生成素、环己二酮修饰的促红细胞生成素、生物素化的促红细胞生成素、N-烷基化-赖氨酰-促红细胞生成素、葡糖基赖氨酸促红细胞生成素、 α -脱氧- α -果糖赖氨酸促红细胞生成素、氨甲酰化促红细胞生成素、乙酰化促红细胞生成素、琥珀酰化促红细胞生成素、 α -羧烷基促红细胞生成素、硝化促红细胞生成素、碘化促红细胞生成素，根据此处的讲述还可列举一些代表性的但非限制性的例子。优选的是基于人促红细胞生成素的上述修饰形式。

此外，上述促红细胞生成素的某些是新的，本发明涉及这些化合物以及包含它们的药物组合物。作为非限制性的例子，这些新的促红细胞生成素包括高碘酸氧化的促红细胞生成素、葡糖基赖氨酸促红细胞生成素、果糖赖氨酸促红细胞生成素、3-脱氧葡糖醛酮促红细胞生成素以及氨甲酰化的脱唾液酸促红细胞生成素。

各种宿主表达载体系统可用于生产本发明的促红细胞生成素和促红细胞生成素相关分子。这些宿主表达系统是一种媒介物，通过它可产生感兴趣的促红细胞生成素，并随后被纯化，但也是一种细胞，当用合适的核苷酸编码序列转化或转染时，它们可在原位表现出修饰的促红细胞生成素。这些体系包括但不限于细菌、昆虫、植物、哺乳动物包括人的宿主系统，例如但不限于，用包含修饰的促红细胞生成素产物编码序列的重组病毒表达载体（例如腺病毒）感染的昆虫细胞系统；用包含促红细胞生成素相关分子编码序列的重组病毒表达载体（例如花椰菜花叶病毒，CaMV；烟草花叶病毒，TMV）感染的或者用包含此序列的重组质粒表达载体（例如Ti质粒）转化的植物细胞系统；或者是它们哺乳动物细胞体系，包括人细胞体系（例如HT1080，COS，CHO，BHK，293，3T3）。具有包含来源于哺乳动物细胞基因组的启动子（例如金属硫蛋白启动子）或来自哺乳动物病毒的启动子（例如腺病毒晚期启动子；牛痘病毒7.5K启动子）的重组表达构建体。

此外，可以选择调节插入序列的表达的，或者以所期望的特定方式修饰和加工基因产物的宿主细胞株。对蛋白质产物的这种修饰（如糖基化）和加工（如裂解）对于蛋白质功能可能是重要的。不同宿主细

胞具有特征性的和特定的机制对蛋白质和基因产物进行翻译后加工和修饰。可以选择合适的细胞系或宿主系统来确保对被表达的外源蛋白质的正确修饰和加工。为此目的，可以使用真核宿主细胞，它具有对基因产物的初级转录物、糖基化和磷酸化作适当加工的细胞机器。这种哺乳动物宿主细胞，包括人宿主细胞，其包括但不限于 HT1080、CHO、5 VERO、BHK、HeLa、COS、MDCK、293、3T3 和 WI38。

为长期、高产量的产生重组蛋白，优选稳定的表达。例如，可以基因工程设计稳定表达促红细胞生成素相关分子基因产物的细胞系。不使用包含病毒复制起点的表达载体，而可以使用被合适的表达控制成分（例如启动子、增强子、序列、转录终止子、聚腺苷酸化位点等）10 以及可选择性标记控制的 DNA 转化宿主细胞。在引入外源 DNA 后，可使基因工程细胞在富养培养基中生长 1-2 天，然后转移到选择培养基中。重组质粒中的选择性标记赋予选择抗性，允许细胞将此质粒稳定地整合到它们的染色体中，并生长形成转化灶，转化灶本身又可被克隆并扩展为细胞系。这种方法可有利地用于工程设计表达促红细胞生成素相关分子基因产物的细胞系。这样工程设计的细胞系可能特别适合于筛选和估计影响促红细胞生成素相关分子基因产物的内源活性的化合物。

按另一种方式，通过将异源 DNA 调控成分插入到稳定的细胞系或克隆微生物的基因组中，以致使被插入的调控成分与内源性促红细胞生成素基因形成可操作连接，可修饰细胞系或微生物中内源性促红细胞生成素基因的表达特征。例如，一种在正常情况下是“转录沉默”的内源促红细胞生成素基因，即在正常情况下在某一细胞系中不表达的或者仅以非常低水平表达的促红细胞生成素基因，可以通过插入能够增强正常表达的基因产物在那种细胞系或微生物中表达的调控成分而被激活。可另一方面，转录沉默的内源促红细胞生成素基因，可通过插入可在交叉的细胞类型起作用的任一调控成分而被激活。

可将异源性调控成分插入到稳定的细胞系或克隆的微生物中，使它与内源性促红细胞生成素基因可操作地连接，是使用例如定向同源重组技术，这种技术是本领域技术人员熟知的，披露于例如授权给 Institut Pasteur 的法国专利 2646438，给 Chappel 的美国专利 4,215,051；给 Sherwin 等人的美国专利 5,578,461；以及由 Selden

等人提出的国际申请 PCT/US92/09627 (W093/09222); 和由 Skoultchi 等人提出的国际申请 PCT/US90/06436 (W091/06667), 在此都全文被引入作为参考。

在本发明的一个实施方案中, 唾液酸残基不足或者完全缺乏唾液酸残基的促红细胞生成素相关分子可在包括人细胞的哺乳动物细胞中生产。这种细胞可被工程设计为加唾液酸的酶活性不足或缺乏, 如 β -半乳糖苷- α -2, 3-唾液酸转移酶 (“ α -2, 3-唾液酸转移酶”) 和 β -半乳糖苷- α -2, 6-唾液酸转移酶 (“ α -2, 6-唾液酸转移酶”) 的活性。在一个实施方案中, 使用的哺乳动物细胞缺失 α -2, 3-唾液酸转移酶基因和 / 或 α -2, 6-唾液酸转移酶基因中的两者之一或者全部。这样的缺失可使用本领域熟知的基因敲除技术构建。在另一个实施方案中, 二氢叶酸还原酶 (DHFR) 缺乏的中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞, 被用作产生重组促红细胞生成素相关分子的宿主细胞。CHO 细胞不表达 α -2, 6-唾液酸转移酶并因此不以 2, 6 键连接加唾液酸到这些细胞中产生的糖蛋白 N-连接的寡糖上。因此, 在 CHO 细胞中生产的重组蛋白缺少以 2, 6 键连接了半乳糖的唾液酸 (Sasaki 等, (1987); Takeuchi 等, 同上; Mutsaers 等, Eur. J. Biochem. 156, 651(1986); Takeuchi 等, J. Chromotgr. 400, 207(1987))。在一个实施方案中, 为制备用于产生脱唾液酸-促红细胞生成素的宿主细胞, 使 CHO 细胞中编码 α -2, 3-唾液酸转移酶的基因缺失。这种 α -2, 3-唾液酸转移酶敲除的 CHO 细胞完全缺少唾液酸转移酶活性, 并因此适用于脱唾液酸促红细胞生成素的重组表达和生产。

在另一个实施方案中, 脱唾液酸促红细胞生成素可通过干扰唾液酸转运进入高尔基体而产生 (例如 Eckhardt 等, 1998, J. Biol. Chem. 273: 20189-95)。使用本领域技术人员熟知的方法 (如 Oelmann 等, 2001, J. Biol. Chem. 276: 26291-300), 可对核苷酸糖 CMP-唾液酸转运子实施诱变, 以使产生中国仓鼠卵巢细胞的突变体。这些细胞不能添加唾液酸残基到糖蛋白如促红细胞生成素上, 仅产生脱唾液酸促红细胞生成素。产生促红细胞生成素的转染哺乳动物细胞也产生胞质唾液酸酶, 如果它渗漏到培养基中, 将高效地降解唾液酸促红细胞生成素 (例如 Gramer 等, 1995 Biotechnology 13: 692-698)。使用本领域熟知的方法 (例如从如下文献提供的信息: Ferrari 等, 1994,

Glycobiology 4: 367-373), 细胞系可被转染、突变, 或者相反使它以构成的方式产生唾液酸酶。按这种方式, 可以在制备脱唾液酸促红细胞生成素的过程中生产脱唾液酸促红细胞生成素。

在本发明一个方面的实施中, 包含促红细胞生成素的上述药物组合物可以以任何途径施加给哺乳动物, 在血管系统中提供足够水平的促红细胞生成素使其可能转运跨越内皮细胞屏障, 并对促红细胞生成素应答性细胞提供有利的效果。当被使用于对组织或器官输液的目的时, 类似的结果是期望中的。在促红细胞生成素用于对来自体内组织输液的例子中, 此促红细胞生成素可以是促红细胞生成素的任何形式, 如上述的促红细胞生成素但不限于此, 并可包括天然促红细胞生成素, 包括人促红细胞生成素。在细胞或组织是非血管化的, 和/或是通过用本发明的组合物浸浴细胞或组织给药的例子中, 该药物组合物对促红细胞生成素应答性细胞提供有效的益剂量的促红细胞生成素。促红细胞生成素可转运跨越的内皮细胞屏障, 包括在哺乳动物存在的紧密连接、穿孔连接、有窗孔连接以及任何其它类型的内皮屏障。

上述促红细胞生成素通常适用于治疗或预防性处理主要有神经学或精神学症状的人中枢神经系统或外周神经系统疾病, 眼科疾病, 心血管疾病, 心肺疾病, 呼吸疾病, 肾、泌尿和生殖疾病, 胃肠疾病以及内分泌和代谢异常。特别的, 这样的病症和疾病包括缺氧状态, 其对易兴奋组织有不利影响, 例如在中枢神经系统组织、外周神经系统组织或心组织或视网膜组织例如脑、心或视网膜/眼的易兴奋组织。因此, 本发明可用于治疗或预防在各种条件和环境中由缺氧状态导致的对易兴奋组织的损伤。这样的条件和环境的非限制性的例子提供在如下的表中。

在防护按照本发明能治疗的神经组织病理状态的例子中, 这种病理状态包括那些由神经组织低氧导致的状态。任何降低对神经组织的供氧而导致的应激反应、损伤以及最终的神经细胞死亡的状态可借助本发明的方法治疗。通常称为缺氧和/或缺血的这些状态源自或包括但不限于中风、血管闭塞、出生前或出生后的供氧丧失、窒息、窒息、溺水、一氧化碳中毒、吸入烟尘、创伤、包括外科手术和放射治疗、昏厥、癫痫症、低血糖症、慢性梗阻性肺病、肺气肿、成人呼吸窘迫症、低血压休克、败血症休克、过敏性休克、胰岛素休克、镰刀细胞病、

心跳停止、节律障碍、氮麻醉以及由心肺旁路手术引起的神经性缺陷。

在一个实施方案中，例如，可给予特定的 EPO 组合物来防止外科手术例如肿瘤切除术或动脉瘤修复的过程中由伤害或组织损伤的风险引起的伤害或组织损伤。由低血糖症引起的其它病理状态包括胰岛素
5 服药过量，也称为医源性胰岛功能亢进，胰岛瘤，生长激素缺乏，可的松过量，药物服用过量以及某些肿瘤。这些病理状态都是借助在此所述的方法能治疗的。

源于易兴奋性神经组织损伤的其它病理状态包括发作性失调，例如
10 癫痫症、惊厥或慢性发作性失调。其它可治疗的病征和疾病包括如中风、多发性硬化、低血压、心跳停止、阿尔茨海默氏病、帕金森病、大脑性麻痹、脑或脊髓创伤、AIDS 痴呆、年龄相关的认知功能丧失、记忆丧失、肌萎缩性侧索硬化、发作性失调、酒精中毒、视网膜缺血、青光眼引起的视神经损伤，以及神经丧失。

本发明的特定组合物和方法可用于治疗视网膜组织的病症以及对
15 它的伤害。这样的病症包括但不限于视网膜缺血、斑点退化、视网膜脱落、色素性视网膜炎、动脉硬化性视网膜病、高血压性视网膜病、视网膜动脉阻塞、视网膜静脉阻塞、低血压以及糖尿病性视网膜病。

在另一个实施方案中，本发明方法和原理可用于保护或治疗源自对
20 易兴奋组织的放射性损伤造成的损害。本发明方法的进一步效用是治疗神经毒素中毒，例如软骨藻酸贝中毒、神经性山黧豆中毒以及关岛（Guam）病、肌萎缩性侧索硬化，以及帕金森氏病。

如上所述，本发明也涉及一种方法，用于通过外周给予上述的促红
25 细胞生成素来增强哺乳动物中易兴奋组织的功能。多种疾病和病症，适合于用这种方法治疗以及进一步地，这种方法适用于在没有任何病症或疾病时增强智力功能。本发明的这些用途将在下面进一步描述，并包括用于人类和非人类的哺乳动物强化学习和训练。

借助于本发明这方面的方法可治疗的涉及中枢神经系统的病症和
30 疾病，包括但不限于情绪失调、焦虑症、压抑、孤独、注意力缺乏的机能亢进性失调以及认知功能紊乱。这些状况可受益于神经功能的增强。按照本发明的教条可治疗的其它病症包括睡眠障碍，例如，睡眠呼吸暂停和旅行相关的失调；蛛网膜下和动脉瘤的出血，低血压休克，震荡性损伤，败血症休克，过敏性休克以及各种脑炎和脑膜炎后遗症，

例如结缔组织疾病相关的大脑炎如狼疮。其它用途包括预防或保护免受神经毒素的毒害，例如软骨藻酸贝中毒、神经性山黧豆中毒以及关岛（Guam）病、肌萎缩性侧索硬化，帕金森病；血栓或缺血损伤的后处理治疗；全脑辐射；镰刀细胞病以及惊厥。

5 用本发明的方法可治疗的另一类病症包括线粒体功能紊乱，遗传性的或获得性的，它是引起多种以神经损伤和死亡为典型特征的神经性疾病的原因。例如，赖氏疾病（亚急性脑髓坏死病）的特征在于渐进性的视力丧失和脑髓坏死，它是由于神经脱落和肌肉疾病造成。在这些情况下，缺陷的线粒体代谢无法提供足够的高能量底物来给易兴奋细胞的代谢添加燃料。促红细胞生成素受体活性调节剂可优化各种线粒体疾病中不足的功能。如上所述，缺氧状态对易兴奋组织有不利影响。易兴奋组织包括但不限于中枢神经系统组织、外周神经系统组织和心脏组织。除了上述病症外，本发明的方法还适用于治疗吸入性中毒，例如一氧化碳和烟尘吸入、急性哮喘、成人呼吸窘迫症，以及窒息和溺水。造成缺氧状态或通过其它方式诱发易兴奋性组织损伤的另一些病症包括低血糖症，它可能在胰岛素用药不适合或者具有产生胰岛素的肿瘤（胰岛瘤）时发生。

被认为是源自易兴奋组织损伤的多种神经精神性疾病可借助于本发明的方法治疗。涉及神经损伤的，以及通过本发明可对其提供治疗的慢性病包括与中枢神经系统和/或外周神经系统相关的疾病，如包括年龄相关的认知功能丧失和老年性痴呆、慢性发作性失调、阿尔茨海默氏病、帕金森病、痴呆、记忆丧失、肌萎缩性侧索硬化、多发性硬化、结节性脑硬化、威尔逊病、大脑性和渐进性核上瘫痪、关岛（Guam）病、Lewy 身体瘫痪、朊蛋白病，例如海棉状脑疾病，如传染性海绵样脑病、亨廷顿舞蹈病、肌强直性营养不良、遗传性共济失调或其它失调、以及图雷特综合症、发作性失调如癫痫症和慢性发作性失调、中风、脑或脊髓创伤、AIDS 痴呆、酒精中毒、视网膜缺血、青光眼，自主功能失调如高血压和睡眠障碍，以及神经精神性失调包括但不限于精神分裂症、精神分裂性紊乱、注意力缺乏失调、精神抑郁性失调、极度沮丧性失调、狂躁、强迫性神经性失调、使用影响精神状态药物引起的失调、焦虑、恐慌性失调，以及单极和双极情感失调。其它的神

25

30 神经精神性和神经性退化性失调包括，例如列举在美国精神病学会的

精神疾病诊断和统计手册（DSM）中的病症，其最近的版本在此被整体引入作为参考。

5 在另一个实施方案中，包含促红细胞生成素的重组的嵌合毒素分子可用于治疗性转移毒素来治疗增殖性失调，例如癌症或者病毒病例如亚急性硬化性全脑炎。

下面的表格列举出了关于适合于用上述促红细胞生成素治疗的多种病症和疾病的补充的例证性、非限制性适应症。

细胞、组织或器官	功能紊乱或病理状态	病症或疾病	类型
心脏	缺血	冠状动脉疾病	急性，慢性稳定，不稳定
		心肌梗塞	德雷斯勒综合症
		心绞痛	
		先天性心脏病	瓣膜心肌症
		Prinzmetal 绞痛	
		心脏破裂	动脉瘤膜穿孔
		脉管炎	
	心律不齐	心室心动过 快、心动过 缓，心室传导 的异常	稳定的，不稳定的 超敏颈动脉分支
	充血性心力衰 竭	左、右、双心 室	心肌症，例如原发 性家族性的、感染 性的、代谢性的、 积贮病、缺乏症、 结缔组织病、渗透 性和肉芽肿、神经 脉管的
		心肌炎	自身免疫的，感染 性的，原发性的
		肺源性心脏病	
	钝器和穿透性 创伤		
	毒素	可卡因	

细胞、组织或器官	功能紊乱或病理	病症或疾病	类型
血管	高血压	原发性的, 继发性的	
	减压病		
	纤维肌性增生		
	动脉瘤	解剖性的, 破裂的, 扩大的	
肺	梗阻	哮喘, 慢性支气管炎, 肺气肿以及气道阻塞	
	缺血性肺病	肺栓塞, 肺血栓, 脂肪栓	
	环境性肺病		
	缺血性肺病	肺栓塞, 肺血栓	
	间质性肺病	先天性肺纤维化	
	先天性病	囊肿性纤维化	
	肺原性心脏病		
	创伤		
	肺炎	感染性的, 寄生性的, 毒性的, 创伤性的, 灼烧性的, 呼吸性的	
	结节病		
胰	内分泌病	糖尿病, I型和II型	Beta 细胞衰竭、功能紊乱, 糖尿病性神经病变
		胰腺其它内分泌细胞衰竭	
	外分泌病	外分泌胰腺衰竭	胰腺炎
骨	骨质稀少	原发性的, 继发性的	性腺功能衰退的活动抑制

细胞、组织或器官	功能紊乱或病理	病症或疾病	类型
			绝经后的，年龄相关的，甲状旁腺功能亢进，钙、镁、磷和/或维生素 D 缺乏
	骨髓炎		
	无血管形成性坏死		
	创伤		
	佩吉特氏病		
皮肤	秃头	簇状秃头，全秃头	原发性的，继发性的，男性模式秃头
	白癜风	局部性的，全身性的	原发性的，继发性的
	糖尿病性溃疡		
	外周血管病		
	烧伤		
自身免疫疾病	红斑狼疮，干燥综合征，风湿性关节炎，肾小球肾炎，脉管炎		
	朗氏 (Langerhan) 组织细胞增多病		
眼	视神经炎		
	钝器和穿透性伤害，感染，类肉瘤，镰刀 C 病，视网膜脱落，暂时性动脉炎		
胚胎和胎儿病	窒息		
	缺血		

细胞、组织或器官	功能紊乱或病理	病症或疾病	类型
CNS	慢性疲劳综合症, 急性和慢性低渗性和高渗性血清综合症, AIDS 痴呆, 触电		
	脑炎	狂犬病, 疱疹	
	淋病		
	硬脑膜下血肿		
	尼古丁成瘾		
	药物滥用和停药	可卡因, 海洛因, 快克 (Crack), 大麻, LSD, PCP, 多药滥用, 摇头丸, 鸦片, 镇静催眠药, 安非他明, 咖啡因	
	强迫症		
	脊髓狭窄, 横贯性脊髓炎, 格-巴综合征, 创伤, 神经根压迫, 肿瘤压迫, 中暑		
ENT	耳鸣, Meunier's 综合症, 听力丧失		
	创伤性伤害, 气压性创伤		
肾	肾衰竭	急性的, 慢性的	血管/缺血, 间质性疾病, 糖尿病性肾病, 肾病综合症, 感染
	Henoch S. 紫癜		
横纹肌	自身免疫疾病	重症肌无力, 皮肌炎, 多肌炎	

细胞、组织或器官	功能紊乱或病理	病症或疾病	类型
	肌病	遗传代谢性的，内分泌的和中毒性的	
	中暑		
	压伤		
	横纹肌溶解		
	线粒体病		
	感染	坏死性筋膜炎	
性功能失调	中枢性的和外周性的	继发性可治疗的阳痿	
肝	肝炎	病毒性的，细菌性的，寄生虫性的	
	缺血性疾病		
	肝硬化，脂肪肝		
	渗透性/代谢性疾病		
胃肠道	缺血性肠病		
	发炎性肠病		
	坏死性小肠结肠炎		
器官移植	受体和供体的治疗		
生殖道	不育	血管性的，自身免疫，子宫异常，移植病	
内分泌	腺体功能亢进及减退		

如上所述，这些疾病、失调或状态仅仅是，例证性说明本发明的促红细胞生成素提供的利益范围。因此，本发明概括地提供了对机械创伤或人类疾病的后果的治疗或预防性处理。优选的是对 CNS 和/或外周神经系统的疾病、失调或状态的治疗或预防性治疗。提供了对具有精神成分的疾病、失调或状态的治疗或预防性治疗。提供了对包括但不限于具有如下成分疾病、失调或状态的治疗或预防性治疗：眼科成分、心血管成分、心肺成分、呼吸成分、肾成分、泌尿成分、生殖成分、胃肠道成分、内分泌成分或者代谢成分。

在一个实施方案中，这种促红细胞生成素药物组合物可被全身性用药来保护或增强目标细胞、组织或器官。这种给药方式可以是不经肠道，通过呼吸，或者穿过粘膜，例如口服、鼻饲、直肠用药、阴道用药、舌下用药、粘膜下用药或者透皮内用药。优选的，给药方式是不经肠道的，例如通过静脉内或腹膜内注射，还包括但不限于，动脉内用药、肌内用药和皮下给药。

对于其它用药途径来说，例如通过使用输注液而注射到器官中，或者其它局部给药方式，提供的药物组合物将导致如上所述类似的促红细胞生成素水平。大约 15pM-30nM 的水平是优选的。

本发明的药物组合物可以包含治疗有效剂量的化合物和药学上可接受的载体。在一个特定的实施方案中，术语“药学上可接受的”意指被联邦或州政府的管理机构核准或者被列举在美国药典或者其它被普遍承认的外国药典中可以用于动物，以及更特别地可用于人的。术语“载体”是指稀释剂、佐剂、赋形剂或治疗给药媒介物。这种药物载体可以是无菌液体，例如在水和油中的盐溶液，包括那些石油、动物、植物或合成来源的油，例如花生油、大豆油、矿物油、和芝麻油等。当药物组合物是静脉内给药时，盐水液是优选的载体。盐水液以及葡萄糖的甘油水溶液也可作为液体载体使用，尤其是用于可注射的溶液。合适的药物赋形剂包括淀粉、葡萄糖、乳糖、蔗糖、明胶、麦芽、稻米、面粉、白垩、硅胶、硬脂酸钠、甘油硬脂酸单酯、云母、氯化钠、干燥的脱脂乳、甘油、丙烯、乙二醇、水、和乙醇等。如果需要，组合物也可包含少量的增湿剂或乳化剂或者 pH 缓冲试剂。这些组合物可以采取的形式为溶液、悬液、乳状液、片剂、丸剂、胶囊、粉剂、凡缓释剂型等。组合物可以配制成栓剂，具有传统的粘合剂和

载体如甘油三酸酯。本发明的化合物可配制成中性的或盐的形式。药
学上可接受的盐包括与自由氨基形成的盐，例如源自盐酸、磷酸、乙
酸、草酸、酒石酸等的盐，以及与自由羧基形成的盐，例如源自钠、
钾、铵、钙、氢氧化铁、异丙胺、三乙胺、2-乙胺基乙醇、组氨酸、
5 普鲁卡因等的盐。合适的药用载体的例子被 E. W. Martin 描述于
“Remington's 制药学”中。这种组合物将包含治疗有效剂量的化合
物，优选纯化的形式，同时含有适量的载体以便给病人提供适当的用
药形式。剂型应当适合用药的方式。

适用于口服用药的药物组合物可以提供为胶囊或片剂；为粉剂或粒
10 剂；为溶液、糖浆或悬液（在水性液体或非水性液体中）；为可食用
的泡沫或奶油状；或者为乳液。片剂或硬质明胶胶囊可以包含乳糖、
淀粉或其衍生物、硬脂酸镁、糖精钠、纤维素、碳酸镁、硬脂酸或其
盐。软质明胶胶囊可包含植物油、蜡、脂肪、半固态或液态的多羟基
化合物等。溶液和糖浆可包含水、多羟基化合物和糖。

设计用于口服给药的活性药剂可用延迟该活性药剂在胃肠道的崩
解和/或吸收的物质包衣或者与其混合（例如可以使用甘油硬脂酸单酯
或甘油硬脂酸二酯）。这样，活性药剂的缓释可以达到超过数小时。
如果有必要，活性药剂可受保护避免在胃内降解。用于口服给药的药
物组合物可被配制成在特定的胃肠道位置由于特殊的 pH 或酶促环境而
15 容易释放活性药剂。

适用于透皮用药的药物组合物可提供为分离的贴剂，被设计可与接
受者的表皮保持长时间的紧密接触。适用于局部用药的药物组合物可
被提供作为软膏、面霜、悬液、洗液、粉剂、溶液、糊剂、胶体、喷
剂、气雾剂或油剂。为了对皮肤、口腔、眼部或其它外部组织局部给
25 药，局部使用的软膏或面霜是优选使用的。当配在软膏中时，活性成
分可以和石蜡或水混溶性软膏基质一起使用。按另一种方式，活性成
分可以与水包油型基质或油包水型基质一起配制在面霜中。适合于对
眼睛局部用药的药物组合物包括滴眼剂。在这些组合物中，活性成分
可被溶解或悬浮在合适的载体中，例如水溶剂中。适合于给口腔局部
30 用药的药物组合物包括止咳糖、锭剂和洗口药。

适合对鼻腔和肺用药的药物组合物可包含固态载体如粉剂（优选具
有颗粒大小为 20 到 500 微米的范围）。粉剂可采用鼻吸的方式用药，

例如通过鼻腔从保持在靠近鼻腔的粉剂容器中快速吸入。另外，适合于鼻腔用药的组合物可包含液态载体，例如喷鼻剂或滴鼻剂。按另一种方式，可实现直接吸入肺部通过深吸气或者安装一根通到口咽的吹管。这些组合物可包含活性成分的水溶液或油溶液。通过吸入用药的组合物可在特制的装置内给药，包括但不限于密闭式气雾剂、喷雾器或吹药器，可设计成提供预定剂量的活性成分。在一个优选的实施方案中，本发明的药物组合物直接施加进鼻腔或者通过鼻腔或口咽进入肺部。

适合于直肠用药的药物组合物可作为栓剂或灌肠剂提供。适合于阴道用药的药物组合物可作为阴道栓剂、药棉塞、乳油、糊剂、泡沫剂或喷剂配方提供。

适合于不经肠道用药的药物组合物包括水溶性的和非水溶性的无菌可注射溶液或悬液，并可含有抗氧化剂、缓冲剂、抑菌剂以及使组合物与预定接受者的血液基本等渗的溶质。在该组合物中可存在的其它成分包括例如水、醇、多羟基化合物，甘油和植物油。适合于不经肠道用药的组合物可在单剂量或多剂量的容器中提供使用，例如密封的安瓿和小玻璃瓶，并可保存在冰冻-干燥（冻干）的环境中，仅需在临使用前加入无菌的液态载体，例如用于注射的无菌盐溶液。临时性的注射溶液或悬液可由无菌的粉剂、粒剂和片剂制备。在一个实施方案中，一种含有可注射的促红细胞生成素溶液的自动注射器可提供给救护车、急诊室和战场环境急救使用，以及甚至可提供给家庭环境的自我用药，特别是可能发生创伤性截肢的地方，例如由于不谨慎地使用割草机。截断的脚或脚趾中细胞或组织在重新附着后存活的可能性，通过尽快地在截断部分多个部位施加促红细胞生成素可得到提高，即使在医疗人员到达现场之前给药，或者在拖着断趾痛苦的患者到达急诊室后给药。

在一个优选的实施方案中，按照常规的程序将组合物配制成适合于对人静脉给药的药物组合物。典型地，用于静脉给药的组合物是在无菌的等渗水性缓冲剂中的溶液。必要时，组合物也可包含增溶剂和局部麻醉剂，例如利多卡因，用来在注射部位镇痛。通常，各组分是以单位剂量形式分开或混合在一起被提供，例如，作为一种冷冻干燥的粉末或无水的浓缩物，装在密封的容器中，例如标明了活性剂含量的

安瓿瓶或小袋子中。当组合物要被灌注注给用药时，可将它配制在含有无菌的药物级水或盐水的输液瓶中。当组合物被注射给药时，可以提供无菌盐水的安瓿，这样可在给药之前混合各成分。

5 栓剂通常包含的活性成分按重量在 0.5% 到 10% 的范围内；口服配方优选地包含 10% 到 95% 的活性成分。

灌注液组合物可被提供用于移植器官的浸浴液，用于原位输注，或者用于在采集器官之前对供体器官的血管系统给药。这种药物组合物可能包含不同浓度的促红细胞生成素或者一种形式的促红细胞生成素，这种浓度或形式不适于对患者进行急性或慢性、局部或全身性给
10 药，但是，在使处理的器官或组织接触或恢复正常的循环之前，未除去或降低其中所含有的促红细胞生成素的浓度时，该组合物在尸体、器官浸泡液中，在器官灌注液或原位输注液中将发挥在此所预期的功能。用于本发明这方面的促红细胞生成素可以是任何促红细胞生成素，作为非限制性例子例如天然存在的形式如人促红细胞生成素，或者上述促红细胞生成素的任何一种，例如脱唾液酸促红细胞生成素和
15 苯基乙二醛促红细胞生成素。

本发明还提供了一种药物包装或试剂盒，其包括装有本发明的一种或几种药物组合物成分的一个或几个容器。任选地与这些容器在一起的可以是一张告示，该告示采取管理药品或生物制品的生产、使用或
20 销售的政府机构规定的形式，反映该机构批准生产，使用或销售用于对人给药。

在另一个实施方案中，例如，促红细胞生成素可在控制释放的体系中转运。例如，该多肽可使用静脉注入、不可移植的渗透泵、透皮贴剂、脂质体或其它用药模式进行给药。在一个实施方案中，可使用一
25 种泵（参见 Langer, 同上；Sefton, 1987, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14: 201; Buchwald 等, 1980, Surgery 88: 507; Saudek 等, 1989, N. Engl. J. Med. 321: 574）。在另一个实方案例中，该化合物可在囊泡内被特别是在脂质体内转运，（参见 Langer, 科学 249: 1527-1533 (1990); Treat 等, in Liposomes in the Therapy of Infectious
30 Disease and Cancer, Lopez-Berestein and Fidler (eds.), Liss, New York, pp. 353-365 (1989); Wo91/04014; 美国专利 4,704,355; -LopezBerestein, *ibid.*, pp. 317-327; 通常参见 *ibid.*）在另一

个实施方案中，可以使用多聚物（参见 *Medical Applications of Controlled Release*, Langer 和 Wise (eds.), CRC Press: Boca Raton, Florida, 1974; *Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance*, Smolen 和 Ball (eds.), Wiley: New York (1984); Ranger 和 Peppas, *J. Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem.* 23:61, 1953; 也参见 Levy 等, 1985, *Science* 228:190; During 等, 1989, *Ann. Neurol.* 23:351; Howard 等, 1989, *J. Neurosurg.* 71:105)。

在另一个实施方案中，可将控制释放系统放置在治疗目标附近，即如目标细胞、组织或器官附近，这样就只需要全身剂量的一部分（参见，例如，Goodson, pp. 115-138, 在 *Medical Applications of Controlled Release*, vol. 2, 同上, 1984)。在 Langer 的述评中探讨了其它控制的释放系统 (1990, *Science*, 249:1527-1533)。

在另一个实施方案中，促红细胞生成素经合适的配制，可通过鼻腔、口腔、直肠、阴道或舌下给药。

在一个特别的实施方案中，将本发明的促红细胞生成素组合物局部施加到需要治疗的区域是值得期待的；这可以通过如下方式达到目的，例如，但不限于，在外科手术中的局部注入，局部施用，例如在外科手术中与创伤敷料联合使用，通过注射，通过导管，通过栓剂，或者通过植入，所述植入是多孔的、无孔的或凝胶状的材料，包括膜，例如硅橡胶膜或纤维的植入。

优选有效剂量的选择将由本领域技术人员根据对本领域普通技术人员周知的几个因素的考虑来确定。这些因素包括促红细胞生成素的特定形式及其药物动力学参数如生物利用度、代谢、半衰期等，这些因素将在常规的开发程序中被确立，通常运用这些程序才能获得对药物化合物的按规定的批准。与剂量有关的另一些因素包括，将要治疗的病症或疾病，或者对正常人将要获得的益处，病人的体重，用药的途径，用药是急性或是慢性，伴随给药，以及影响所给药剂效率的其它周知因素。因此，精确的剂量应当按照医师的判断和每个病人的情况，例如，取决于每个病人的病情和免疫状态，按照标准的临床技术来确定。

在本发明的另一个方面，提供了灌注液或灌注溶液来输注和保存用

于移植的器官，该灌注溶液包含保护促红细胞生成素应答性细胞和相关细胞、组织或器官的有效量促红细胞生成素。移植包括但不限于异体移植，在此器官（包括细胞、组织或其它身体部分）采自一个供体而移植进入一个不同的受体；以及自体移植，在此器官取自身体的一个部分而移至另一个部位，包括取出器官的手术台外科手术，以及当来自体内时，进行切除、修复或者其它操作，例如肿瘤切除，然后返回原来的位置。在一个实施方案中，灌注溶液是威斯康星大学（UW）溶液（美国专利 4,798,824），其包含约 1-25U/ml 促红细胞生成素、5% 羟乙基淀粉（具有分子量约 200,000 约 300,000，并基本上没有的乙烯基乙二醇、乙烯基氯乙醇、氯化钠和丙酮）；25mM KH_2PO_4 ；3mM 谷胱苷肽；10mM 葡萄糖；10mM HEPES 缓冲液；5mM 葡萄糖酸镁；1.5mM CaCl_2 ；105mM 葡萄糖酸钠；200,000 单位青霉素；40 单位胰岛素；16mg 地塞米松；12mg 酚红；以及具有 pH 7.4-7.5 和渗透度约 320 mOsm/l。该溶液被用于保养移植前的尸体肾和胰。使用该溶液，保存可以延长超过被建议用于尸体肾保存的 30 小时的限制。这种特定的灌注液仅仅是许多这种溶液的例证性说明。这些溶液通过包含有效量促红细胞生成素而可以适合于本发明的用途。在进一步的实施方案中，灌注液包含约 5-35 U/ml 促红细胞生成素，或者约 10-30 U/ml 促红细胞生成素。如上所述，任何形式的促红细胞生成素可用于本发明的该方面。

虽然用于该目的促红细胞生成素的优选接受体始终是人，但是该方法也同样适用于其它哺乳动物，特别是家畜、驯养动物、宠物和观赏动物。不过，本发明没有这样限制，其益处可适用于任何哺乳动物。

在本发明体内运用的另一方面，可能是任何促红细胞生成素例如，但不限于上述的促红细胞生成素，以及天然的促红细胞生成素及其类似物，促红细胞生成素模拟物，以及促红细胞生成素片断、杂交的促红细胞生成素分子、促红细胞生成素受体结合分子、促红细胞生成素激动剂、肾促红细胞生成素、脑促红细胞生成素、其寡聚物、其多聚物、其突变体、其同源物、其天然存在的形式、其合成形式、其重组形式、其糖基化变异体、其去糖基化变异体，或者其组合物。

在本发明的另一个方面，提供了几种方法和组合物，用于增强未被内皮细胞屏障而与血管系统隔离的细胞、组织或器官的存活力，是通过使细胞、组织或器官直接暴露于含有促红细胞生成素的药物组合

物，或者将含有促红细胞生成素的药物组合物对该组织或器官的血管系统给药或接触。在被处理的组织或器官中促红细胞生成素应答性细胞增强的活性是发挥积极效果的原因所在。

如上所述，本发明部分地基于发现了促红细胞生成素分子可以从器官毛细血管内皮细胞的腔表面被转运到其基底膜表面，这些器官都具有上皮细胞紧密连接包括如脑、视网膜和睾丸。因此，跨越此屏障的促红细胞生成素应答性细胞是促红细胞生成素的有益作用的敏感目标，而包含以及完全或部分依赖于其中的促红细胞生成素应答性细胞的其它细胞类型或组织或器官，是本发明方法的目标。虽然不希望受任何特定理论的束缚，在促红细胞生成素被转胞吞之后，促红细胞生成素可以与促红细胞生成素应答性细胞上的促红细胞生成素受体相互作用，这种细胞包括例如，神经、视网膜、肌肉、心、肺、肝、肾、小肠、肾上腺皮质、肾上腺髓质、毛细管内皮、睾丸、卵巢、或子宫内膜的细胞，并且受体结合可触发信号传导级联反应而导致激活促红细胞生成素应答性细胞或组织内的基因表达程序，导致保护细胞或组织或器官免受损伤，例如由毒素、化学治疗制剂、放射治疗、缺氧等引起的损伤。因此，用于保护包含促红细胞生成素应答性细胞的组织免受损伤或避免缺氧应激状态以及增强该组织功能的方法，将在下面详细描述。

在对本发明一个实施方案的实施中，一个哺乳动物病体为治疗癌症将承受全身性化学治疗，包括放射性治疗，这通常具有副作用如对神经、肺、心、卵巢或睾丸的损伤。在化学治疗和/或放射治疗之前，以及在治疗过程中给予包含上述促红细胞生成素的药物组合物，以便保护各种组织和器官免受化学治疗药剂的伤害，例如保护睾丸。治疗可持续到化学治疗药剂的循环浓度降低到对哺乳动物身体有潜在危险的浓度之下为止。

在对本发明另一个实施方案的实施中，计划从汽车事故受害者采集的各种器官用于移植入许多接受者中，其中的一些需要运输较长的距离和时间。在器官采集之前，受害者用包含所述的促红细胞生成素的药物组合物输注。对要运送的采集器官用含有在此所述的促红细胞生成素的灌注液输注，并保存在含有促红细胞生成素的浸浴液中。对某些器官用脉动式输液设备利用含有按照本发明的促红细胞生成素的灌

注液进行持续输注。在运输过程中以及在移植和对器官原位再输注时，器官功能发生了最低限度的衰退。

在本发明的另一个实施方案中，修复心脏瓣膜的外科手术需要暂时的心脏停搏和动脉闭塞。在手术前，患者用每 kg 体重 500 U 促红细胞生成素输液。这种处理防止了缺氧性局部缺血的细胞伤害，尤其是在反复输液后。

在本发明的另一个实施方案中，在任何外科手术中，例如心肺分流手术，天然存在的促红细胞生成素或本发明的任何一种促红细胞生成素都可以使用。在一个实施方案中，含有上述促红细胞生成素的药物组合物的施用在分流手术之前、手术过程中和/或手术之后进行，以便保护脑、心和其它器官的功能。

在前述的实施例 中，其中本发明的促红细胞生成素，包括天然存在的促红细胞生成素，被用于体内的应用，或者治疗促红细胞生成素应答性细胞诸如神经组织、视网膜组织、心、肺、肝、肾、小肠、肾上腺皮质、肾上腺髓质、毛细血管内皮、睾丸、卵巢、或子宫内膜的细胞或组织，本发明提供了一种以剂量单位形式的药物组合物，适合于保护或增强远离血管系统的促红细胞生成素应答性细胞、组织或器官，它的每个剂量单位包含有效而无毒量的促红细胞生成素促红细胞生成素受体活性调节剂，或者促红细胞生成素激活的受体调节剂以及药理学上可接受的载体。它们的剂量范围可以是约 50,000-500,000 单位、60,000-500,000 单位、70,000-500,000 单位、80,000-500,000 单位、90,000-500,000 单位、100,000-500,000 单位、150,000-500,000 单位、200,000-500,000 单位、250,000-500,000 单位、300,000-500,000 单位、350,000-500,000 单位、400,000-500,000 单位、或者 450,000-500,000 单位。在优选的实施方案中，促红细胞生成素的有效无毒的剂量在约 50,000-500,000 单位的范围内。在另一优选的实施方案中，在前述组合物中的促红细胞生成素是非促红细胞生成性的。

本发明另一方面进一步发现，给予促红细胞生成素恢复了遭受脑创伤动物的认知功能。在延迟 5 天或 30 天之后，给予促红细胞生成素，与假治疗的对照动物相比较，仍然能够恢复功能，这表明促红细胞生成素具有再生或恢复脑活性的能力。因此，本发明也涉及使用促红细胞生成素制备治疗脑创伤和其它认知功能紊乱的药物组合物，包括在

受伤很久以后才治疗（例如三天、五天、一周、一月或者更长）。本发明也涉及用于在受伤之后治疗认知功能紊乱的方法，是通过施加有效量的促红细胞生成素。在此所述的任何一种促红细胞生成素都可用于本发明的该方面。

5 而且，本发明的这种康复功能涉及使用在此的任何一种促红细胞生成素来制备恢复细胞、组织或器官功能紊乱的药物组合物，其中可在导致功能紊乱的初始伤害之后，以及很久以后开始治疗。而且，使用本发明的促红细胞生成素的治疗可覆盖在急性期以及慢性期的疾病或病症的全过程。

10 在本发明的促红细胞生成素具有促红细胞生成活性的情况下，在优选的实施方案中，促红细胞生成素可全身性用药的剂量每次约 300-10,000 单位/kg 体重，优选约 500-5,000 单位/kg 体重，最优选约 1,000 单位/kg 体重。该有效剂量应该在给予促红细胞生成素之后足够达到超过约 10,000, 15,000 或 20,000 mU/ml 血清的促红细胞生成素血清浓
15 度。这种血清水平可能在用药后约 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 或 10 小时达到。这样的剂量在必要时可重复给药。例如，只要临床上有必要，可每天重复给药一次，或者在一个合适的时间间隔之后，如每 1-12 周，优选地每 1-3 周重复一次。在一个实施方案中，有效剂量的促红细胞生成素和药学上可接受的载体可包装在单剂量的小瓶或其它容
20 器中。在另一个实施方案中，适用于此目的的促红细胞生成素是非促红细胞生成的，即，它能够发挥这里描述的活性，但是并不引起血红蛋白浓度或血球比率的增加。这种促红细胞生成素的非促红细胞生成性形式在计划长期使用本发明方法的情况下是优选的。在另一个实施方案中，所给的促红细胞生成素剂量超过最大刺激促红细胞生成的必
25 要剂量。如上所述，本发明的促红细胞生成素不必具有促红细胞生成的活性，因此上述以生血单位表示的剂量仅仅是促红细胞生成性促红细胞生成素的例子；上述提供的剂量摩尔当量适用于任何一种促红细胞生成素。

30 本发明进一步涉及一种用于促进转运一种分子跨越哺乳动物内皮细胞屏障的方法，是通过给予包含与上述促红细胞生成素相结合的该特定分子的组合物。如上所述，在体内某些器官的内皮细胞之间的紧密连接造成了某些分子进入的屏障。为治疗被屏障的器官中的各种病

症，促进药物制剂通过的方法是期待的。本发明的促红细胞生成素作为载体转运其它分子跨越血脑屏障和其它类似屏障是有用的。制备了包含期望跨越屏障的分子与促红细胞生成素的组合物，该组合物的外周给药可导致转胞吞该组合物跨越屏障。要被运送跨越屏障的分子与促红细胞生成素之间的结合可以是易断开的共价键，在此情况下，该分子在跨过屏障后从与促红细胞生成素的结合中被释放出。如果此分子所需要的药理学活性仍然保持或者不受与促红细胞生成素结合的影响，这样一种复合体可被给药。

本领域技术人员将意识到有多种方法可用于使分子与本发明的促红细胞生成素和上述其它药剂连接，通过共价键、非共价键的以及其它的方式；并且，对组合物的效力评估可容易地在实验系统中确定。分子与促红细胞生成素的连接可通过许多方式达到，包括不稳定的共价结合、交联等。生物素/抗生物素蛋白相互作用可以被利用。如上所述，杂交分子可通过重组或合成的方法制备，例如，它既包含具有所需药理学活性分子的结构域，也包含负责促红细胞生成素受体活性调节的结构域。

通过多功能分子即多功能交联剂可使分子偶联到促红细胞生成素上。如这里使用的，术语“多功能分子”包括具有能够连续反应一次以上的一种官能团的分子，例如甲醛，以及具有一个以上活性基团的分子。如这里使用的，术语“活性基团”是指交联剂上的官能基团，它能够与分子（例如要跨越内皮细胞屏障转运的肽、蛋白质、糖、核酸，尤其是激素、抗生素或者抗癌药剂）上的官能团反应，以致在交联剂与那种分子之间形成共价键。术语“官能团”保留其有机化学中的标准意义。可使用的多功能分子优选为生物兼容性连接剂，即，它们在体内是非致癌的、无毒的以及在体内基本没有免疫原性的。例如本领域已知的和这里描述的多功能交联剂可在动物模型中容易地验证确定其生物兼容性。多功能分子优选双功能的。如这里使用的，术语“双功能分子”是指具有两个活性基团的分子。双功能分子可以是异型双功能或同型双功能的。异型双功能交联剂用于定向偶联。对于多功能分子特别优选的是充分的水溶性，以便于交联反应在水溶液如缓冲在 pH 6-8 的水溶液的水中发生，并且使所获得的偶联物保持水溶性，以便于更有效的生物分布。典型地，此多功能分子与氨基或巯基

官能团共价连接。不过，与其它官能团如羧基或羟基反应的多功能分子在本发明中是期待的。同型双功能分子具有至少两个相同的活性官能团。同型双功能分子上的活性官能团包括例如醛基和活性酯基。具有醛基的同型双功能分子包括例如戊二醛和辛二醛。以戊二醛用作交联剂披露于 Poznansky 等, Science 223, 1304-1306 (1984)。具有至少两个活性酯单元的同型双功能分子包括二羧酸的和 N-羧基琥珀酰亚胺的酯。这种 N-琥珀酰亚胺基酯的一些例子包括双琥珀酰亚胺基辛二酸酯和二硫代-双-(琥珀酰亚胺基丙酸酯), 以及它们的可溶性双磺酸和双磺酸酯的盐例如其钠盐和钾盐。这些同型双功能试剂可得自 Pierce, Rockford, Illinois.

异型双功能分子具有至少两个不同的活性基团。这些活性基团与例如存在于促红细胞生成素和此分子上的不同的官能团反应。与异型双功能交联剂上的活性基团反应的两种不同的官能团通常是氨基, 例如赖氨酸的 ϵ -氨基; 巯基, 例如半胱氨酸的巯基; 羧基, 例如天冬氨酸上的羧基; 或者羟基, 例如丝氨酸上的羟基。

当然, 本发明的多种促红细胞生成素分子可能没有合适的活性基团提供给某些交联剂使用; 不过, 本领域的技术人员完全知道根据本发明的促红细胞生成素中可提供用于交联的基团来选择交联剂。

当异型双功能分子的活性基团与氨基形成共价键时, 该共价键将通常是酰胺基或酰亚胺基键。与氨基形成共价键的活性基团可以是例如活化的羧基、卤代烃基、或者酯基。优选的卤代烃基是氯代烃基。酯基优选活性酯基如, N-羧基琥珀酰亚胺酯基。

其它官能团典型地是巯基, 能被转化为巯基的基团, 或者与巯基形成共价键的基团。该共价键通常是硫醚键或二硫键。与巯基形成共价键的活性基团可以是例如与巯基或活化的二硫化物反应形式的双键。包含能与巯基反应的双键的活性基团是马来酰亚胺基, 尽管其它基团, 例如丙烯腈也是可能的。活性二硫键可以是例如 2-吡啶二硫键或者 5, 5'-二硫代-双-(2-硝基苯甲酸) 基团。包含活性二硫键的异型双功能试剂的一些例子包括 N-琥珀酰亚胺基-3-(2-吡啶-二硫代) 丙酸酯 (Carlsson 等, 1978, Biochem J., 173: 723-737), S-4-琥珀酰亚胺羧基- α -甲基苯基硫代磺酸钠, 以及 4-琥珀酰亚胺羧基- α -甲基-(2-吡啶-二硫代) 丙酸酯。N-琥珀酰亚胺基-3-(2-吡啶-二硫代)

丙酸酯是优选的。包含具有能与巯基反应的双键的活性基团的异型双功能试剂的一些例子，包括琥珀酰亚胺基-4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己胺-1-羧酸酯以及琥珀酰亚胺基-m-马来酰亚胺基苯甲酸酯。其它异型双功能分子包括琥珀酰亚胺基-3-(马来酰亚胺基)丙酸酯，硫代琥珀酰亚胺基-4-(p-马来酰亚胺基-苯基)丁酸酯，硫代琥珀酰亚胺基-4-(N-马来酰亚胺基甲基-环己胺)-1-羧酸酯，马来酰亚胺基苯甲酰基-N-羟基-琥珀酰亚胺基酯。琥珀酰亚胺基-m-马来酰亚胺基苯甲酸酯的磺酸钠盐是优选的。许多种上述异型双功能试剂及其磺酸盐都可得自 Pierce Chemical Co., Rockford, Illinois USA.

上述偶联是可逆或者不稳定的可以由本领域技术人员容易地确定。对偶联物可以在体外测试其促红细胞生成素以及所期望的药理学活性。如果此偶联物保持了两种性质，然后可以在体内测试它的适用性。如果为了活性被偶联的分子需要其与促红细胞生成素分开，与促红细胞生成素形成不稳定的键或可逆的结合将是优选的。不稳定性特征也可以在体内测试之前使用标准的体外方法进行测试。

关于如何制备和使用这些以及其它多功能试剂的补充信息可以从以下出版物或者其它本领域提供的出版物中获得：

Carlsson, J. Et al., 1978, *Biochem. J.* 173: 723-737.

Cumber, J.A. et al., 1985, *Methods in Enzymology* 112: 207-224.

Jue, R. Et al., 1978, *Biochem* 17: 5399-5405.

Sun, T.T. et al., 1974, *Biochem.* 13: 2334-2340.

Blattler, W.A. et al., 1985, *Biochem.* 24: 1517-152.

Liu, F.T. et al., 1979, *Biochem.* 18: 690-697.

Youle, R.J. and Neville, D.M. Jr., 1980, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 77: 5483-5486.

Lerner, R.A. et al., 1981, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78: 3403-3407.

Jung, S.M. and Moroi, M., 1983, *Biochem. Biophys. Acta.* 761: 162.

Caulfield, M.P. et al., 1984, *Biochem.* 81: 7772-7776.

Staros, J.V., 1982, *Biochem.* 21: 3950-3955.

Yoshitake, S. Et al., 1979, Eur. J. Biochem. 101: 395-399.

Yoshitake, S. Et al., 1982, J. Biochem. 92: 1413-1424.

Pilch, P.F. and Czech, M.P., 1979, J. Biol. Chem. 254:
5 3375-3381.

Novick, D. Et al., 1987, J. Biol. Chem. 262: 8483-8487.

Lomant, A.J. and Fairbanks, G., 1976, J. Mol. Biol. 104:
243-261.

Hamada, H. And Tsuruo, T., 1987, Anal. Biochem. 160:
10 483-488.

Hashida, S. Et al., 1984, J. Applied. Biochem. 6: 56-63.

此外, 交联的方法被综述于 Means 和 Freeney, 1990,
Bioconjugate Chem. 1: 2-12.

可被本发明上述方法和组合物跨越的屏障包括但不限于血-脑屏
15 障、血-眼屏障、血-睾屏障、血-卵巢屏障和血-子宫屏障。

用于跨越内皮细胞屏障转运的候选分子包括, 例如, 激素如生长激
素, 神经营养因子, 抗生素或抗真菌剂如正常情况下被脑和其它有屏
障的器官排斥的抗菌素, 肽放射性药物, 反义药物, 抗生物活性剂的
抗体, 药物, 以及抗癌药剂。这些分子的非限制性例子包括生长激素、
20 神经生长因子 (NGF)、脑来源的神经营养因子 (BDNF)、睫状神经营
养因子 (CNTF)、碱性成纤维细胞生长因子 (bFGF)、转化生长因子
 $\beta 1$ (TGF $\beta 1$)、转化生长因子 $\beta 2$ (TGF $\beta 2$)、转化生长因子 $\beta 3$ (TGF $\beta 3$)、
白细胞介素 1、白细胞介素 2、白细胞介素 3 和白细胞介素 6、AZT、抗
肿瘤坏死因子的抗体、以及免疫抑制剂如环孢霉素。

25 本发明还涉及一种组合物, 它包含一种将借助于转胞吞作用被转运
跨越内皮细胞紧密连接屏障的分子, 以及上述的促红细胞生成素。本
发明进一步涉及一种分子与上述促红细胞生成素之间的偶联物的用途
可用于制备转运该分子跨越上述屏障的药物组合物。

30 通过参考下面非限制性的实施例本发明可更好地被理解, 它们是作
为本发明的范例被提供。提出下面的实施例是为了更充分地说明本发
明的优选实施方案。然而, 它们决不应被理解为对本发明广阔范围的
限制。

实施例 1

促红细胞生成素跨越血-脑脊液紧密屏障

成熟雄性 Sprague-Dawley 大鼠经麻醉并腹膜内注射给予重组人促红细胞生成素。从小脑延髓池每隔 30 分钟取样脑脊液 (CSF) 直到 4 小时, 应用灵敏的特异性酶联免疫分析法测定促红细胞生成素浓度。如图 1 所示, 在 CSF 中的初始促红细胞生成素浓度是 8 mU/ml。在延迟几个小时后, 在 CSF 中测得的促红细胞生成素浓度开始增加并在 2.5 小时及以后与初始浓度具有明显的 $p < 0.01$ 的水平显著差异。约 100 mU/ml 的峰值浓度是已知的在体外试验中实施保护作用的范围之内 (0.1-100 mU/ml)。到达峰值的时间出现在约 3.5 小时, 这比血清峰值浓度的时间 (不到 1 小时) 明显延迟。该实验的结果表明, 通过以合适浓度的促红细胞生成素快速浓注给药, 可实现使有效浓度的促红细胞生成素跨越紧密的细胞连接。

实施例 2

在制备来用于移植的心脏中功能的维持

对体重 300 到 330g 的 Wistar 雄性大鼠, 在取出心脏用于来自体内的研究之前 24h 给予促红细胞生成素 (5000 U/kg 体重) 或赋形剂, 然后按照 Delcayre 等, 1992, Amer. J. Physiol. 263:H1537-45 的方案进行。动物以戊巴比妥麻醉 (0.3mL) 处死, 并通过静脉注射肝素化 (0.2mL)。心脏被允许初始平衡 15 分钟。然后将左心室气囊膨胀到具有 8 mmHg 舒张期末压的体积。左心室压力-体积曲线可通过以 0.02ml 一份的增量膨胀气囊体积而构建。零体积的定义为左心室舒张期末压为零的点。当压力-体积曲线完成时, 使左心室气囊缩小, 以使舒张期末压回到 8mmHg 并在检查冠状血流后维持此控制期 15 分钟。然后用 50 mL Celsior+分子使心脏停止跳动静置于 4°C、60cm H₂O 压力下。然后将心脏取出, 在充满同样溶液外包碎冰的塑料容器中 4°C 保存 5 小时。

保存结束后, 心脏被转移到 Langendorff 仪器中。气囊导管被重新插入左心室, 重新膨胀与缺血期前同样的体积。心脏在 37°C 再次输液至少 2 小时。再次输液的压力设定为 50 cm H₂O, 持续回流 15 分钟, 然后回到 100 cm H₂O 再持续 2 小时, 重新建立搏动 (每分钟 320 次)。对收缩指数和舒张压的等容积测定在重新输液的 25, 45, 60, 120 分

钟进行，每次测定重复三次。在该时间点完成压力-容积曲线，并在45min的重新输液期间收集冠脉流出液，测量肌酸激酶的泄漏。应用不成对的t-检验对两个治疗组进行比较，使用舒张期末压数据的线性回归被用来设计拟合曲线。如图2所示，在用促红细胞生成素治疗后，发展的左心室压力出现了明显的改善，同时改善了体积-压力曲线，降低了左心室舒张压以及减少了肌酸激酶泄漏。

实施例3

促红细胞生成素保护心肌免受缺血损伤

对在24小时前给予重组人促红细胞生成素(5000 U/kg体重)的，成熟雄性大鼠进行麻醉并制备冠状动脉闭塞。在实验开始时，补充给予一次促红细胞生成素，先使左侧主冠状动脉闭塞30分钟，然后释放。处理之后每天给予同样剂量的促红细胞生成素，持续一周。然后研究动物的心脏功能。如图3所示，接受假注射(盐水)的动物表现出左侧舒张期末压的很大增加，表现出继发于心肌梗死的膨大、僵硬的心脏。与假治疗的对照相比截然不同，接受促红细胞生成素的动物没有遭受心脏功能的衰退(差异显著性水平为 $p < 0.01$)。

实施例4

促红细胞生成素分子

天然促红细胞生成素可被修饰以便使它的活性适合于特定的一种组织或几种组织。可以实行以达到这种所需要的组织特异性的几种非限制性的策略，包括除去或修饰糖基化部分的修饰，促红细胞生成素具有三个N-连接的和一个O-连接的糖基化部分。糖基化促红细胞生成素的这些变异体可以由许多途径产生。例如，终止糖链末端的唾液酸可用依赖于连接唾液酸和糖链的化学键的特异性唾液酸酶除去。另外，此糖基化结构还可通过使用裂解特定键的其它酶以不同的方式拆除。为确证这些原理，重组人促红细胞生成素被使用唾液酸酶A(Prozyme Inc.)按照厂商的方案进行脱唾液酸。通过将此反应产物在SDS-聚丙烯酰胺凝胶上跑电泳并将所得的电泳带染色成功的化学修饰得到确认，这些电泳带表明，此化学修饰的促红细胞生成素具有如予期的明显的分子量约31 kD，相比之下未修饰的促红细胞生成素的分子量为约34 kD，并且通过化学方法测定了残留的唾液酸残基为 < 0.1 摩尔/摩尔促红细胞生成素。

在另一修饰中促红细胞生成素的氨基酸残基被修饰,通过使用苯基乙二醛按照 Takahashi 的方法 (1977, J. Biochem. 81: 395-402) 修饰精氨酸残基,在室温下在 0.5-3 小时的范围内持续进行了不同的时间长度。通过将反应混合物对水透析使反应终止。使用这种形式的修饰促红细胞生成素被完全包括在本发明内。

如图 4-6 所示,脱唾液酸促红细胞生成素和苯基乙二醛促红细胞生成素在体外试验对神经细胞具有与天然促红细胞生成素同样的效果。在体外,使用神经样胚瘤细胞 (P19) 进行试验,这种细胞在撤除血清时将经历凋亡。在去除血清二十四小时前,1-1000 ng/ml 的促红细胞生成素或修饰的促红细胞生成素被加到培养基中。第二天去除培养基,用新鲜的不含血清的培养基漂洗细胞,包有待测试物质的培养基(无血清)加回到培养基中再培养 48 小时。为测定存活细胞的数量,进行了四唑还原试验(96 孔细胞滴定板; Promega, Inc)。如图 4-5 所示,脱唾液酸促红细胞生成素显示出与促红细胞生成素本身等同的防止细胞死亡的效力。使用上述神经样 P19 细胞试验对苯基乙二醛修饰的促红细胞生成素进行了测试。如图 6 所示,这种化学修饰的促红细胞生成素完全保持其神经保护效果。

使用大鼠局灶性缺血模型证实了神经保护活性在体内的保持,此模型中在按照以前所述(Brines 等, 2000, Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A. 97: 10526-31) 在大脑中动脉区域形成了可逆性损伤。成熟的雄性 Sprague-Dawley 大鼠在动脉闭塞开始时被给予脱唾液酸促红细胞生成素或促红细胞生成素(5000 U/kg 体重腹腔内用药)或者赋形剂。二十四小时后,动物被处死并取出它们的脑用于研究。作连续切片并用四唑盐染色以便确认大脑存活区。如图 7 所示,脱唾液酸促红细胞生成素在对 1 小时缺血提供神经保护作用与天然促红细胞生成素同样有效。图 8 显示另一个局灶性缺血模型的结果,其中展现了用促红细胞生成素和脱唾液酸促红细胞生成素可比较的剂量响应。在 250 U/kg 的最低剂量,脱唾液酸促红细胞生成素提供了保护作用,而未修饰的促红细胞生成素未提供保护作用。

30 实施例 5

对促红细胞生成素初级结构的修饰和在神经保护上的效力

许多突变的促红细胞生成素分子已经被描述,这些突变分子不与红

细胞促红细胞生成素受体结合并因此在体内或体外不提供促红细胞生成作用。然而，这些分子中的某些在其它组织或器官中将模仿促红细胞生成素本身的效果。例如，包含天然促红细胞生成素 31-47 氨基酸序列的 17-聚体没有促红细胞生成活性，但是在体外对神经细胞是完全有活性的 (Campana&O'Brien, 1998: Int. J. Mol. Med. 1:235-41)。

可望用于所述用途的衍生的促红细胞生成素，可通过胍化、脒化、三硝基苯基化、乙酰化、琥珀酰化、硝化产生，或者通过修饰精氨酸残基或羧基，尤其是上述的方法产生，以便产生对特定器官和组织保持它们的活性而不对其它例如红细胞无活性的促红细胞生成素。当促红细胞生成素经受了上述反应，已经发现，通常所获得的分子缺乏体内和体外的促红细胞生成活性 (例如，Satake 等; 1990, Biochim. Biophys. Acta 1038:125-9)。制备修饰的促红细胞生成素的一些例子在下面描述。

在促红细胞生成素的自由氨基生物素化。将 0.2 mg D-生物素- ϵ -氨基己酸-N-羟基琥珀酰亚胺酯基 (Boehringer Mannheim #1418165) 溶于 100 μ l DMSO。该溶液与含有约 0.2 mg 促红细胞生成素的 400 μ l PBS 在箔覆盖的管中混合。在室温孵育 4 小时后，未反应的生物素在 Centricon 10 柱上通过凝胶过滤分离出。如图 10 所示，该生物素化的促红细胞生成素在撤除血清时保护 p19 细胞。

在 Wojchowski 等, Blood, 1989, 74(3):952-8 的 "Biotinylated recombinant human erythropoietins: Bioactivity and Utility as a receptor ligand" 中，作者使用了三种不同的方法生物素化促红细胞生成素。生物素被加入到 (1) 唾液酸部分 (2) 羧基或 (3) 氨基上。作者使用小鼠脾细胞增殖试验来验证 (1) 生物素加入到唾液酸部分未使促红细胞生成素的生物活性失去 (2) 生物素加入到羧基导致促红细胞生成素基本无生物活性 (3) 生物素加入到氨基导致促红细胞生成素完全失去生物活性。这些方法和修饰完全包括在本发明内。图 9 显示生物素化促红细胞生成素和脱唾液酸促红细胞生成素在血清饥饿的 P19 试验中的活性。

促红细胞生成素的碘化。方法 1——碘珠法。将一个碘珠 (Pierce, Rockford, Ill) 在包含 1 mCi 自由 Na^{125}I 的 100 μ l PBS (20 mM 磷酸钠, 0.15M NaCl, pH7.5) 中孵育 5 分钟。然后将溶于 100 μ l PBS 中

的 100 ug 促红细胞生成素加入到此混合物中。在室温下孵育十分钟后，通过从反应容器中取出此 200 ul 溶液而终止反应（留下碘珠）。过量的碘通过在 Centricon 10 柱上凝胶过滤除去。如图 11 所示，用该方式制备的碘-促红细胞生成素在保护 P19 细胞免受血清撤除伤害是有效的。

方法 2——氯胺 T 法。将在 eppendorf 管中溶于 100 ul PBS 中的 100 ug 促红细胞生成素加入到 500 uCi 自由 Na^{125}I 的 100 ul PBS 中，混合均匀。然后加入 25 ul 氯胺 T (2 mg/ml)，混合物在室温孵育 1 分钟。然后加入 50 ul 氯胺终止缓冲液 (2.4 mg/ml 偏亚硫酸氢盐，10 mg/ml 酪氨酸，10% 甘油，0.1% 二甲苯于 PBS 中)。然后通过 10 10 mg/ml 酪氨酸，10% 甘油，0.1% 二甲苯于 PBS 中)。然后通过 Centricon 10 柱上凝胶过滤使碘代酪氨酸和碘代促红细胞生成素分离开。

赖氨酸修饰：氨基甲酰化法：促红细胞生成素 (100 ug) 用氰酸钾按照 Plapp 等的描述修饰 (“Activity of bovine pancreatic deoxyribonuclease A with modified amino groups” 1971, J. Biol. Chem. 246, 939-845)。

三硝基苯基化：用 2,4,6-三硝基苯磺酸盐按照 Plapp 等的描述修饰促红细胞生成素 (100 ug) (“Activity of bovine pancreatic deoxyribonuclease A with modified amino groups” 1971, J. Biol. Chem. 246, 939-845)。

乙酰化：将促红细胞生成素 (100 ug) 在含有等量乙酐的 0.3M 磷酸盐缓冲液 (pH7.2) 中 0°C 孵育 1 小时。反应通过对蒸馏水透析而终止。

琥珀酰化：溶于 0.5M NaHCO_3 (pH 8.0) 中的促红细胞生成素 (100 ug) 与过量的 15 摩尔琥珀酸酐 15°C 孵育 1 小时。反应通过对蒸馏水透析而终止。

精氨酸修饰：用 2,3-丁二酮按照 Riordan 的描述修饰促红细胞生成素 (“Functional arginyl residues in carboxypeptidase A. Modification with butanedione” Riordan JF, Biochemistry 1973, 12 (20): 3915-3923)。

促红细胞生成素用环己酮按照 Patthy 等的描述修饰 (“Identification of functional arginine residues in

ribonuclease A and lysozyme" Patthy, L, Smith EL, J. Biol. Chem. 1975, 250(2):565-9)。

促红细胞生成素用苯基乙二醇按照 Werber 等的描述修饰 (" Proceedings: CarboxypeptidaseB: modification of functional arginyl residues" Werber, MM, Sokolovsky M, Isr J Med Sci 1975 11(11): 1169-70)。

酪氨酸修饰: 促红细胞生成素(100 ug)与四硝基甲烷按照 Nestler 等以前的描述共孵育: "Stimulation of rat ovarian cell steroidogenesis by high density lipoproteins modified with tetranitromethane" Nestler JE, Chacko GK, Strauss JF 3rd. J Biol Chem 1985 Jun 25; 260(12): 7316-21)。

谷氨酸(和天冬氨酸)修饰: 为修饰羧基, 促红细胞生成素(100 ug)与1M甘氨酸胺中的0.02M EDC在室温反应60分钟, 按照如下文献中 Carraway 等的描述进行: "Carboxyl group modification in chymotrypsin and chymotrypsinogen." Carraway KL, Spoerl P, Koshland DE Jr. J Mol Biol 1969 May 28; 42(1):133-7。

色氨酸残基修饰: 促红细胞生成素(100 ug)与溶于20mM磷酸钾缓冲液(pH6.5)中的20uM n-溴代琥珀酰亚胺在室温反应, 按照如下文献 Ali 等的描述; J Biol Chem. 1995 Mar 3; 270(9):4570-4。被氧化的色氨酸残基的数量可通过 Korotchkina 描述的方法确定 (Korotchkina, LG 等, Protein Expr Purif. 1995 Feb; 6(1): 79-90)。

氨基的去除: 为除去氨基, 促红细胞生成素(100 ug)与含有20mM 茚三酮(Pierce Chemical, Rockford, IL)的PBS(pH7.4)在37°C共孵育两小时, 如 Kokkini 等所述(Kokkini, G等 "Modification of hemoglobin by ninhydrin" Blood, Vol. 556, No 4, 1980: 701-705)。对所生成醛的还原通过将产物与硼氢化钠或氢化锂铝反应完成。具体地说, 使促红细胞生成素(100 ug)与溶于PBS中的0.1M硼氢化钠在室温共孵育30分钟。还原的终止是通过将样品在冰上冷却10分钟并对PBS透析过夜三次。(Kokkini, G., Blood, Vol. 556, No. 4, 1980: 701-705。)使用氢化锂铝的还原是通过将促红细胞生成素(100 ug)与PBS中的0.1M氢化锂铝在室温共孵育30分钟完成。还原的终

止是通过将样品在冰上冷却 10 分钟并对 PBS 透析过夜三次。

二硫键的还原和稳定：促红细胞生成素（100 ug）与 50 mM DTT 在 60°C 共孵育 15 分钟。然后将溶于水中的 20 mM 碘乙酰胺加入到此混合物中并在室温下于暗处孵育 25 分钟。

- 5 有限的蛋白质水解：促红细胞生成素可受到对准特定残基的有限化学蛋白质水解。使促红细胞生成素与溶于 50% 乙酸中的 50 倍过量的 2-(2-硝基苯亚磺酰基)-3-甲基-3'-溴代假嘌呤，在氮气压力下封口的试管中室温下于暗处反应 48 小时此试剂可在色氨酸残基后特异性地断开促红细胞生成素。反应通过以色氨酸淬灭和脱盐而终止。

10 实施例 6

通过外周施加促红细胞生成素对视网膜缺血的保护作用。

- 视网膜细胞对缺血非常敏感以至于许多细胞在缺血应激状态 30 分钟后就将死亡。并且，亚急性或慢性缺血是伴随许多普通的人类疾病视力衰退的原因，这些疾病例如糖尿病、青光眼以及斑点退化。在目前尚无保护细胞免受缺血损害的有效治疗方法。存在于血和视网膜之间的紧密内皮细胞屏障可排斥绝大多数大分子。为测试外周给予的促红细胞生成素是否会保护对缺血敏感的细胞，运用了一个急性的可逆性青光眼大鼠模型，如 Rosenbaum 等的描述的（1997; Vis. Res. 37: 3443-51）。具体地说，将盐水注入成熟雄性大鼠的眼前室使达到超过全身主动脉压的压力并维持 60 分钟。在诱导缺血前 24 小时对动物通过腹膜下注射给予盐水或 5000 U 促红细胞生成素/kg 体重，并作为每日剂量再继续三天。治疗后一周对暗适应大鼠作视网膜电图描记。图 11-12 说明，给予促红细胞生成素与视网膜电图（ERG）的良好保留有关（图框 D），相比之下，仅以盐水治疗的动物保留了非常小的功能（图框 C）。图 11 对促红细胞生成素治疗组和盐水治疗组，比较了视网膜电图 a-波和 b-波的振幅表明促红细胞生成素提供了明显的保护。

实施例 7

促红细胞生成素对由脑损伤造成的认知功能减弱的恢复效果

- 30 在为证明促红细胞生成素对小鼠受到脑创伤后使减弱的认知功能恢复的能力的研究中，使雌性 Balb/c 小鼠，遭受钝器脑创伤如在 Brines 等 PNAS 2000, 97; 10295-10672 中所述，并在五天后，开始

每天腹膜下注射给予促红细胞生成素 5000 U/kg 体重。受伤后十二天，在 Morris 水迷宫中检验动物的认知功能，每天试验四次。尽管经治疗的和未经治疗的动物在测试中都表现不好（游泳的时间约 80 秒，未达到可能的 90 秒），但是图 13 显示促红细胞生成素治疗的动物表现较好（在这种图像中，负值是较好）。即使促红细胞生成素开始治疗被延迟在到创伤后 30 天（图 14），也可以看见认知功能的恢复。

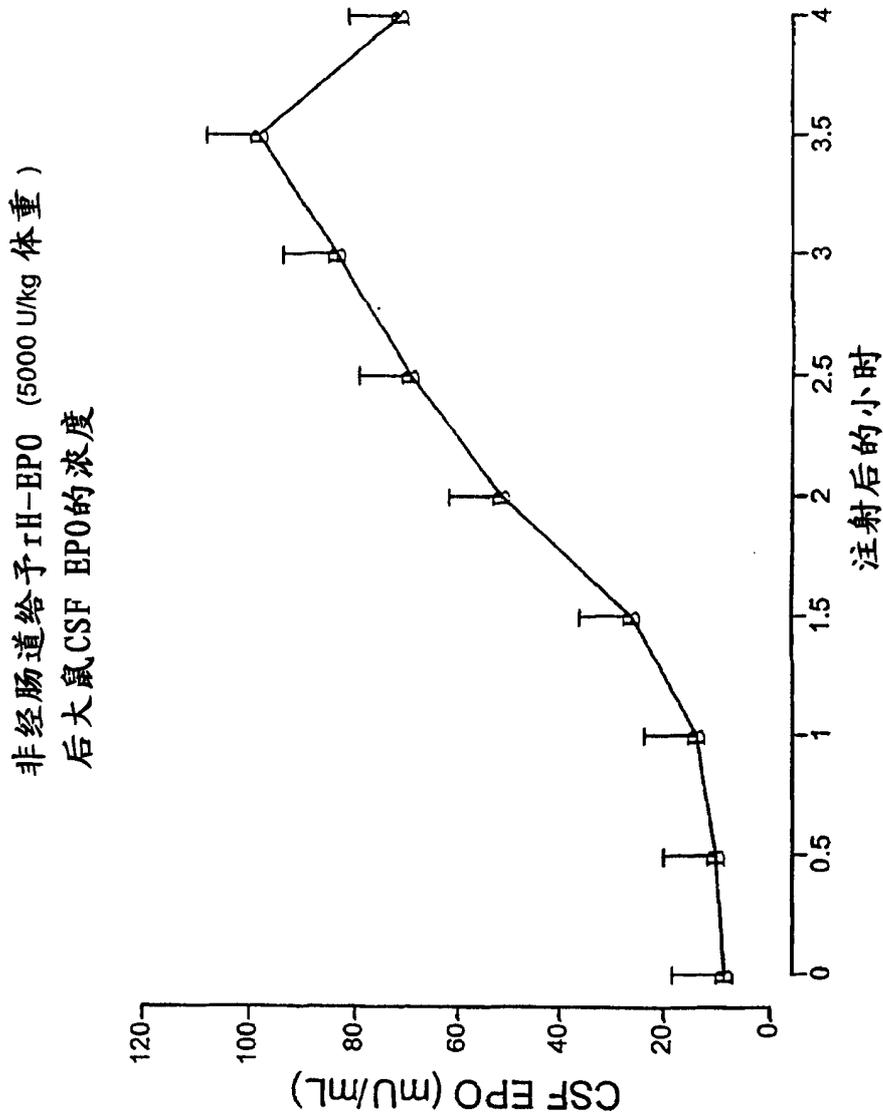
实施例 8

KAINATE 模型

在 KAINATE 神经毒性模型中，按照 Brines 等 Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A. 2000, 97; 10295-10672 的方案在给予 25 mg/kg kainate 之前 24 小时以 5000 U/kg 体重的剂量，腹膜注射给予脱唾液酸促红细胞生成素。表明它与促红细胞生成素同样有效，如死亡时间显示的（图 15）。

本发明不被描述的特定实施方案所限制在其范围内，仅打算将这些实施方案作为本发明每个方面的单独例子，功能相同的方法和成分都在本发明的范围之内。实际上除了在这里显示的和描述的之外，还有本发明的各种修饰形式，根据前面的说明和附图对本领域技术人员来说将是显而易见的。这些修饰形式包括在所附的权利要求的范围内。

这里引用的所有参考文献在所有的场合都被整体引入作为参考。



2.5 小时及更久与初始相比 $P < 0.01$

图 1

缺血30分钟后7天的大鼠心脏

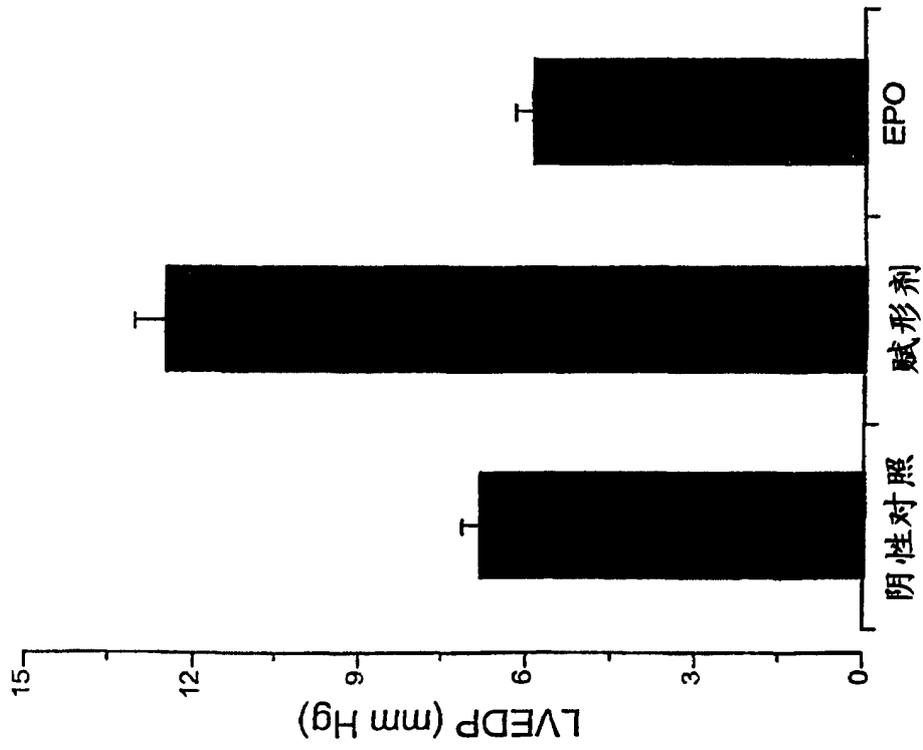


图 2

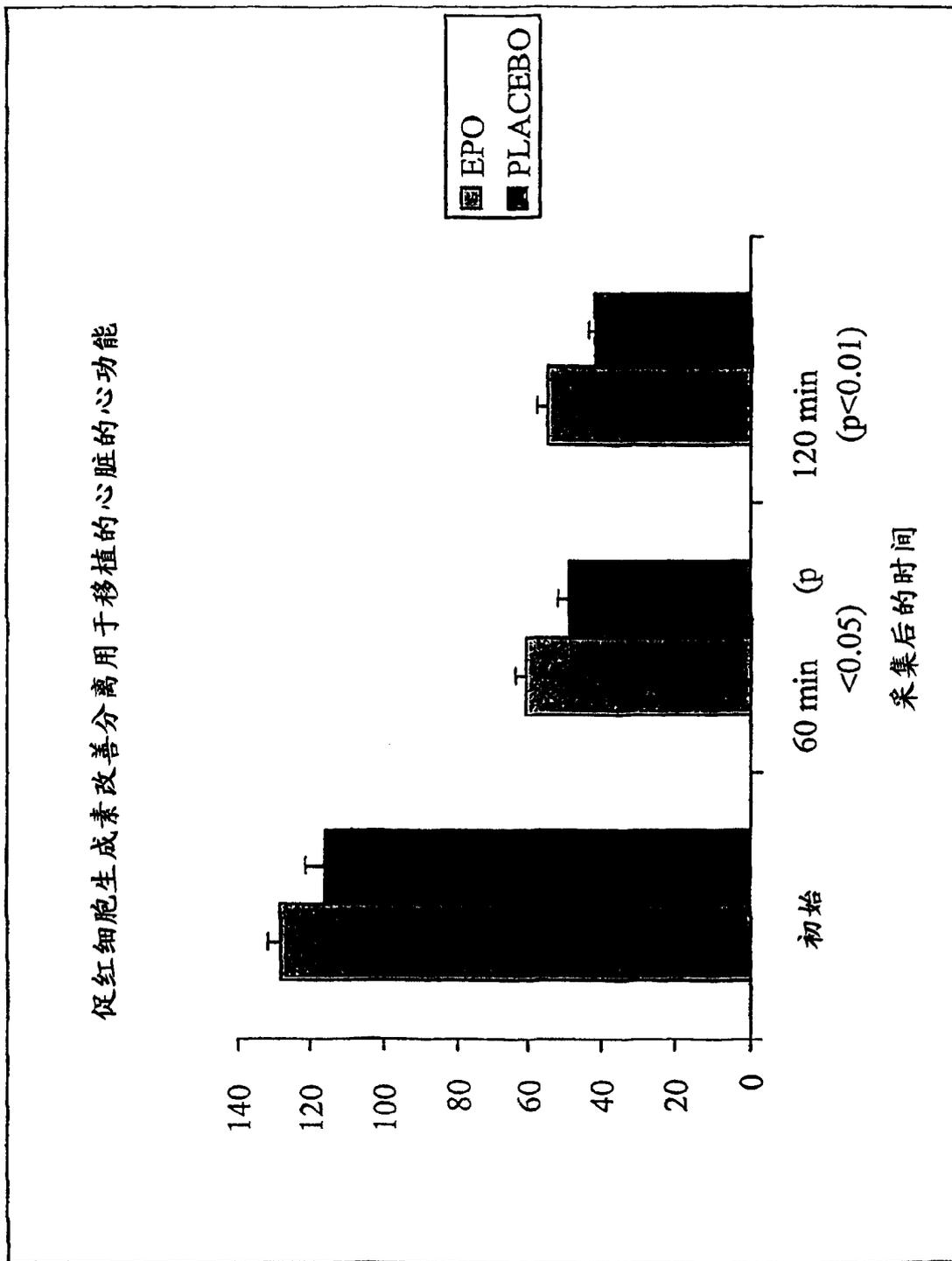


图 3

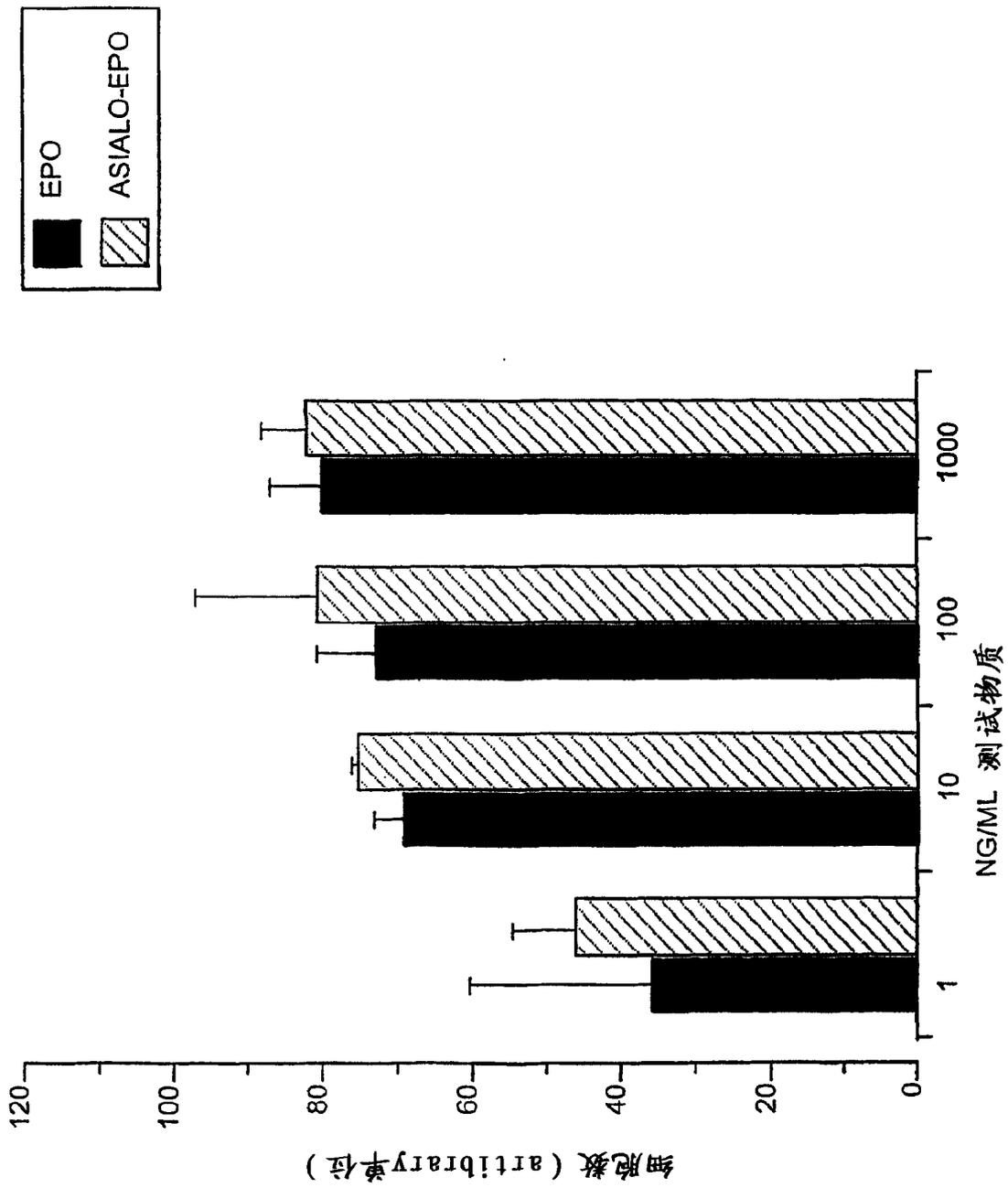


图 4

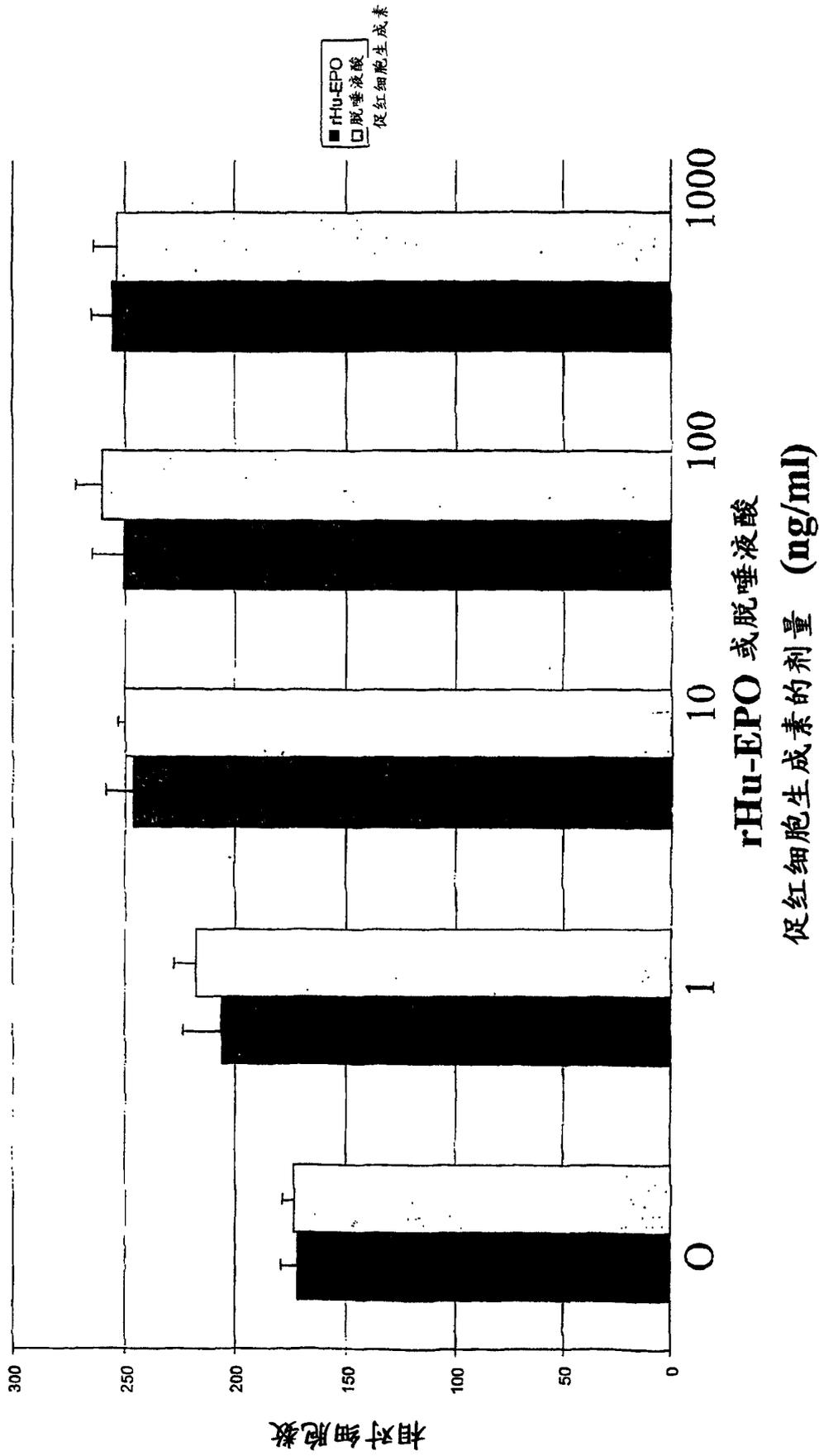


图 5

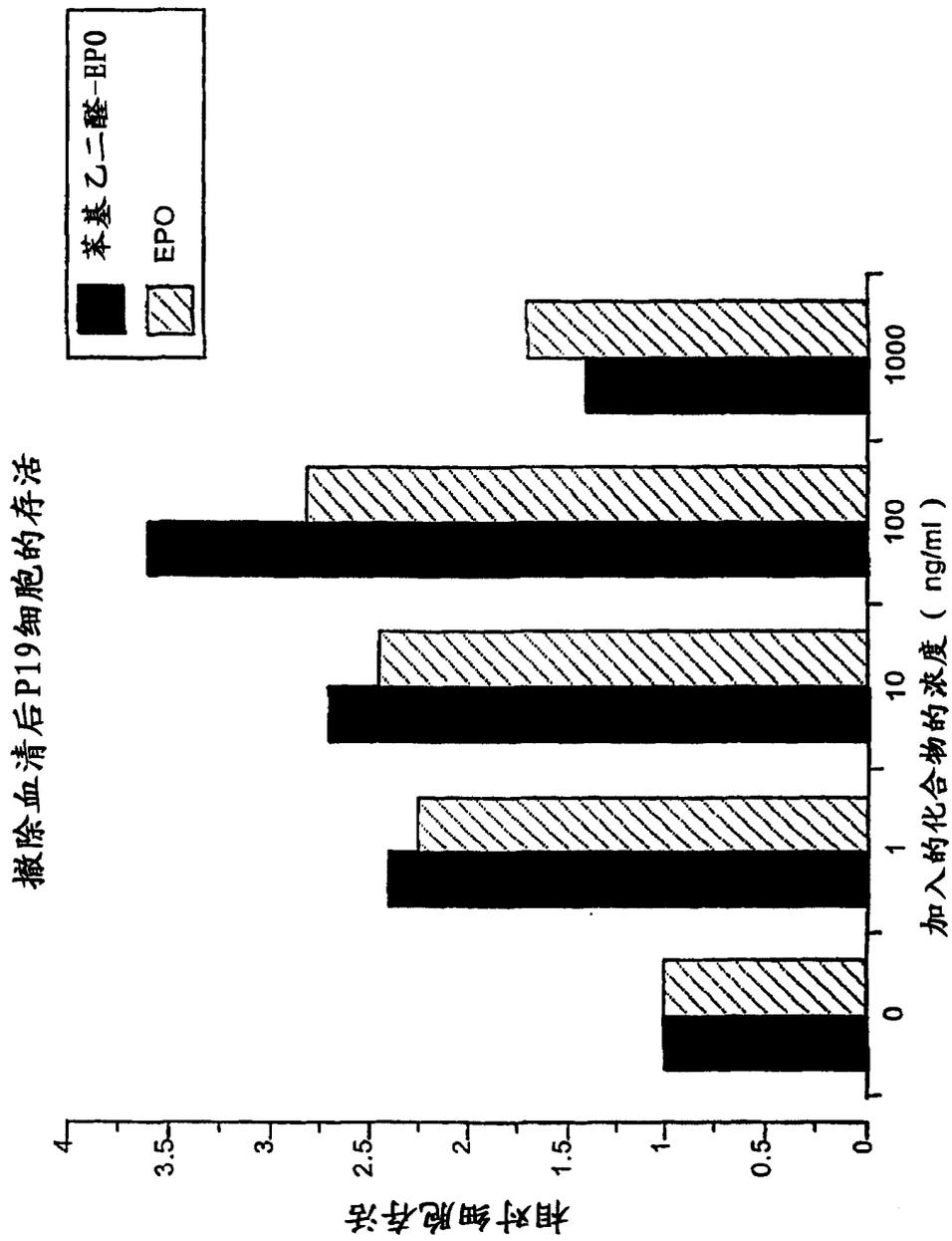


图 6

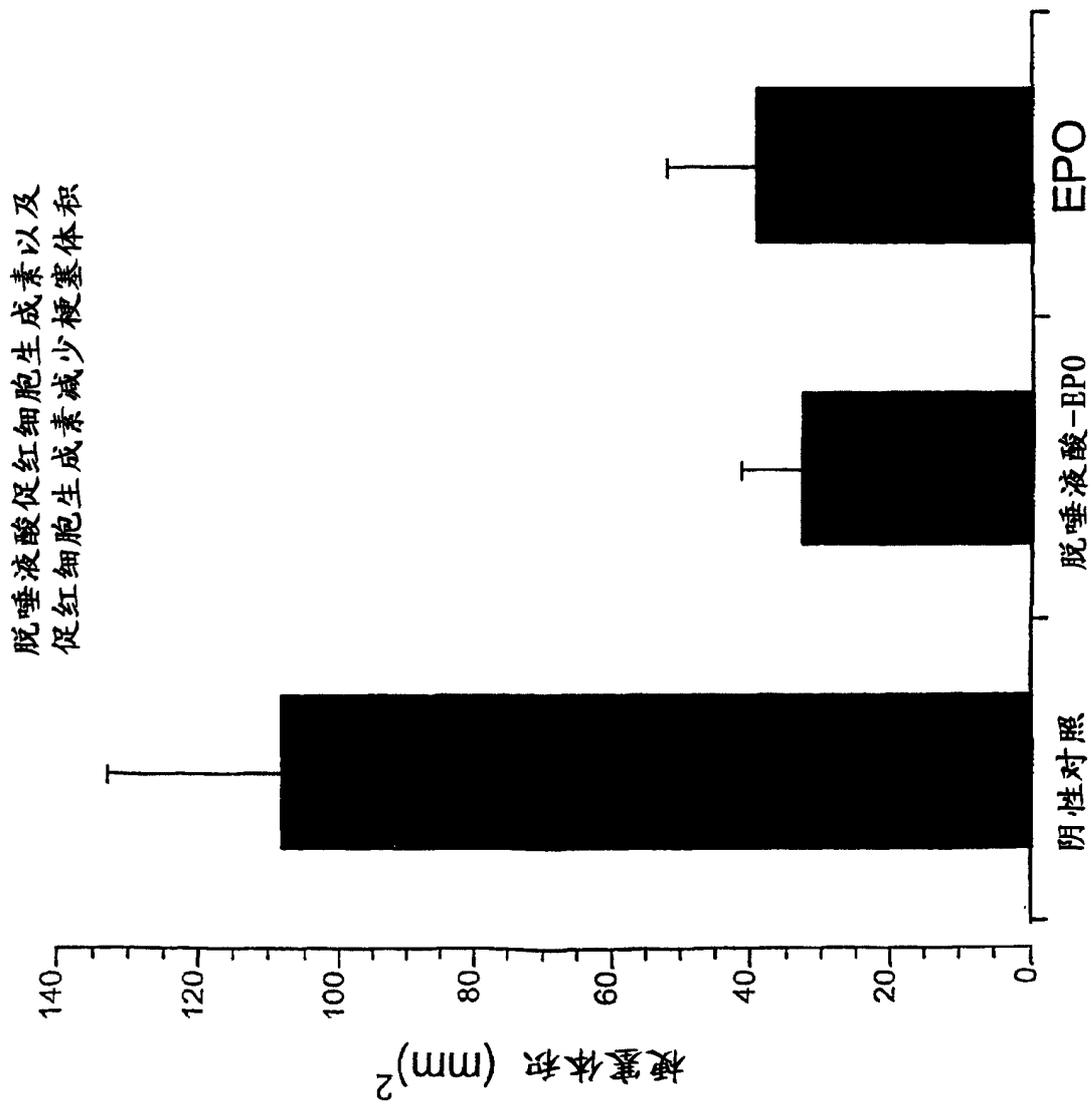
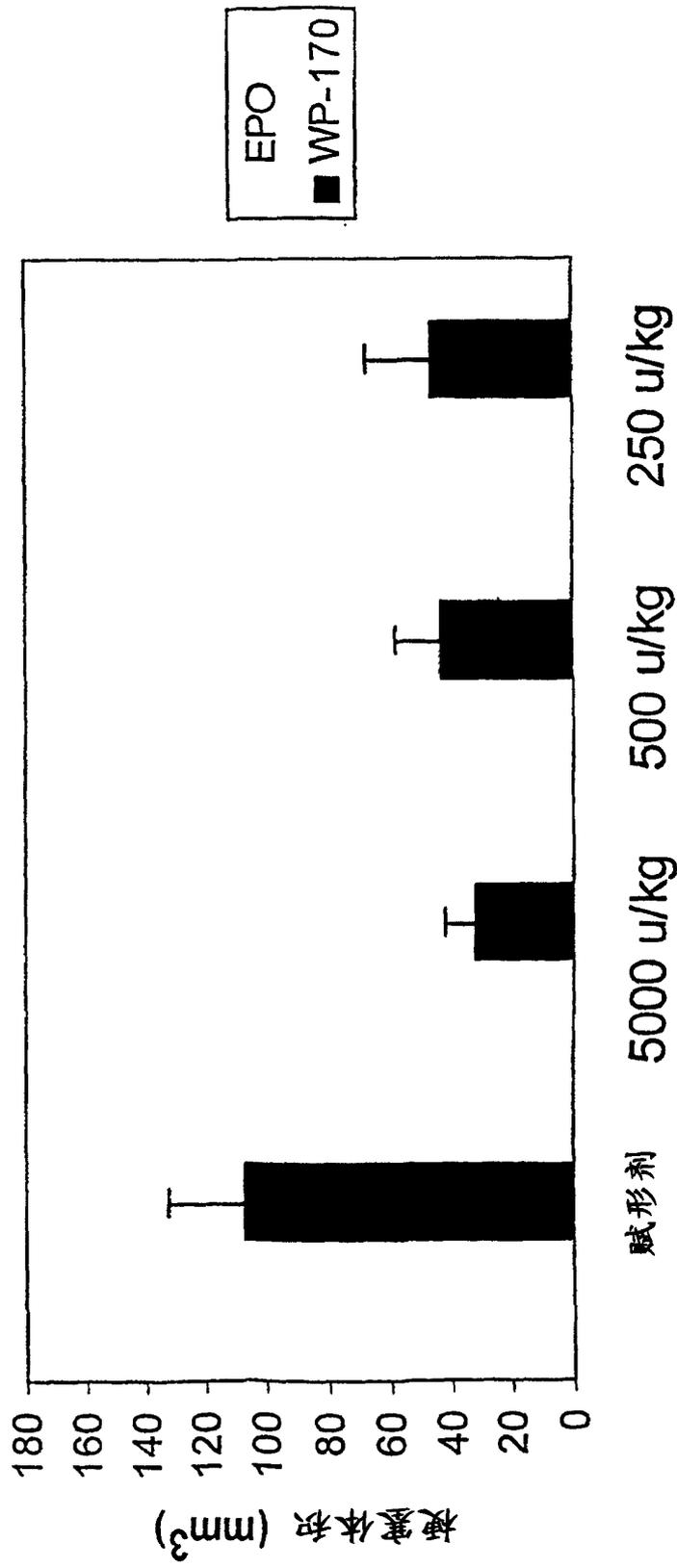


图 7

脱唾液酸促红细胞生成素
(剂量响应)



每组的n值大于或等于4

图 8

生物素化-EP0和脱唾液酸化-EP0
在P19试验中保持P19细胞活性

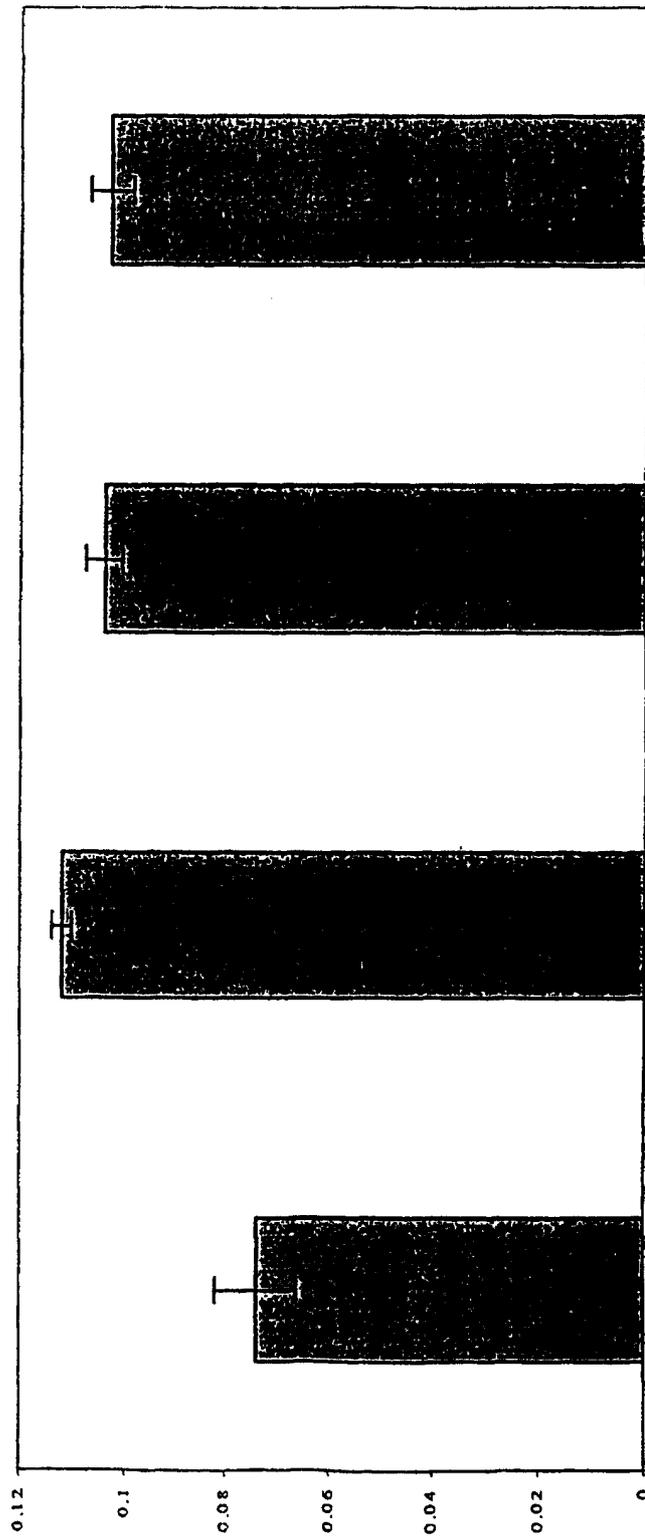


图 9

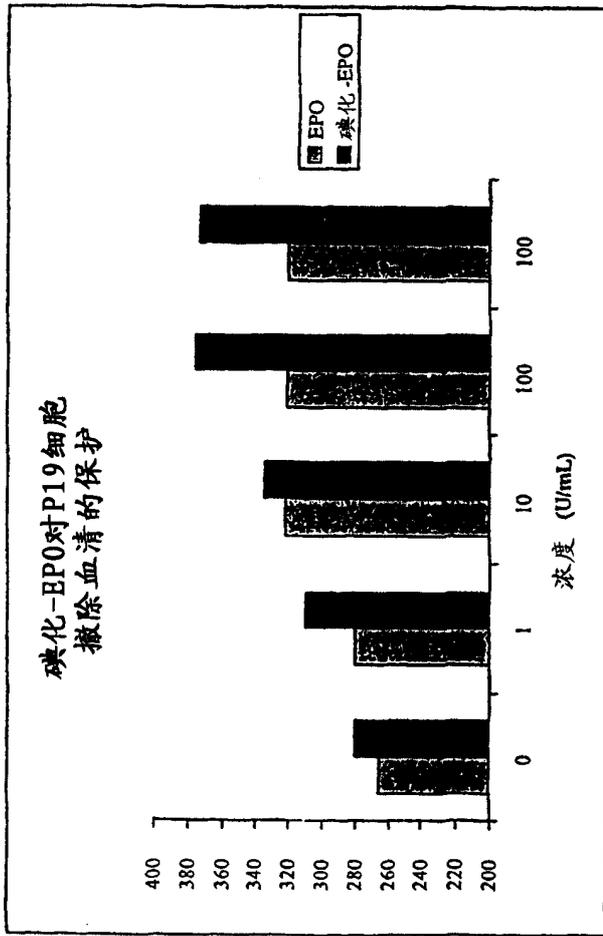


图 10

来自缺血60分钟的大鼠的视网膜电图

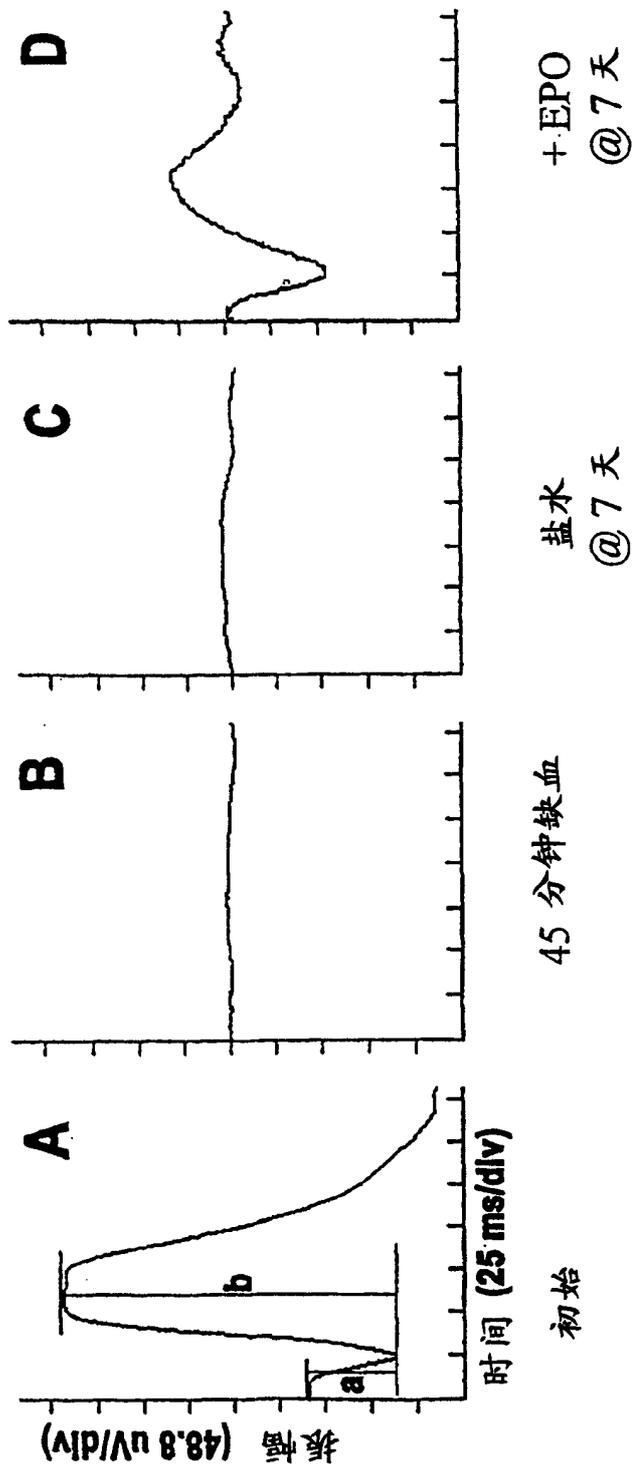


图 11

60分钟缺血后视网膜电图振幅

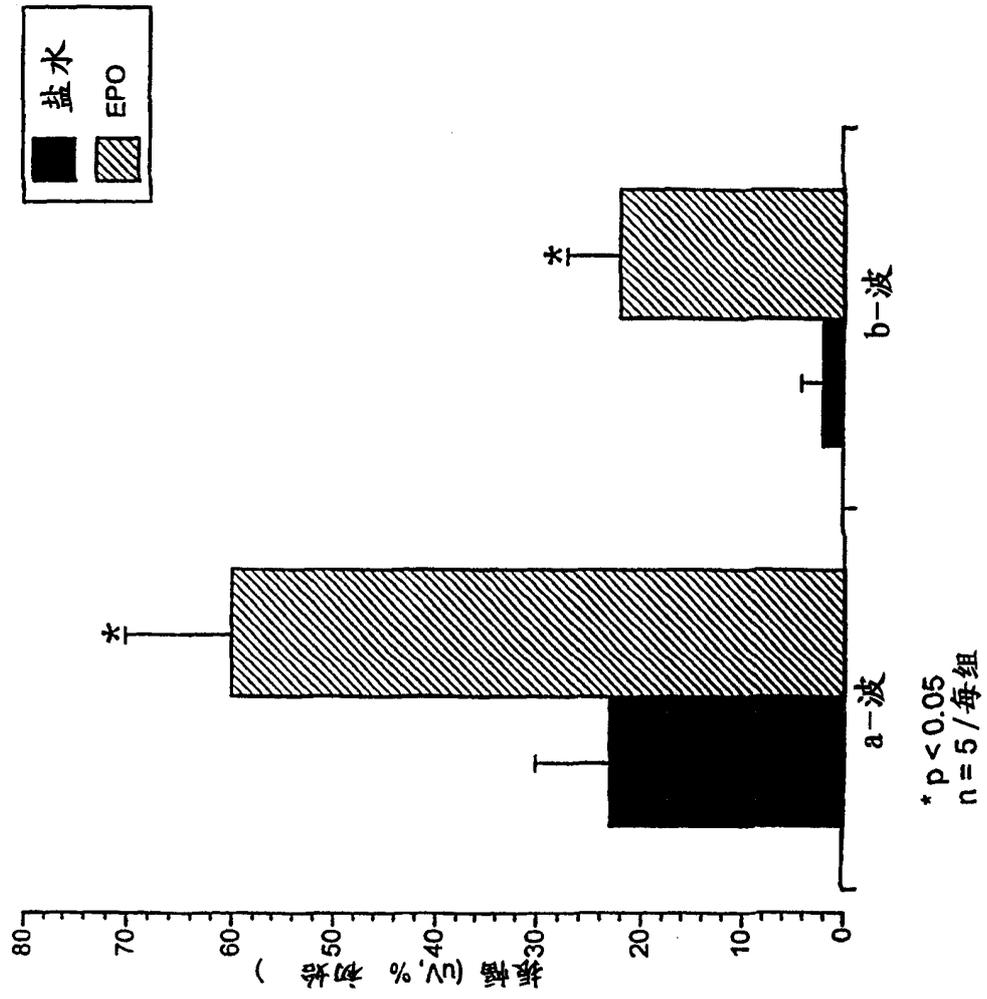


图 12

Morris 水迷宫; 雌性 Bale/c 小鼠 n=16。
钝器脑创伤受伤后第 5 天开始用 EPO ix
第一次水迷宫测试在 EPO 用药开始 1 周后
开始 (受伤后 12 天)。两组动物表现都不好,
游泳时间约 80 秒, 而不是预期可能的 90 秒。
负值表示 EPO 组较好。每天 4 次试验的平均值。

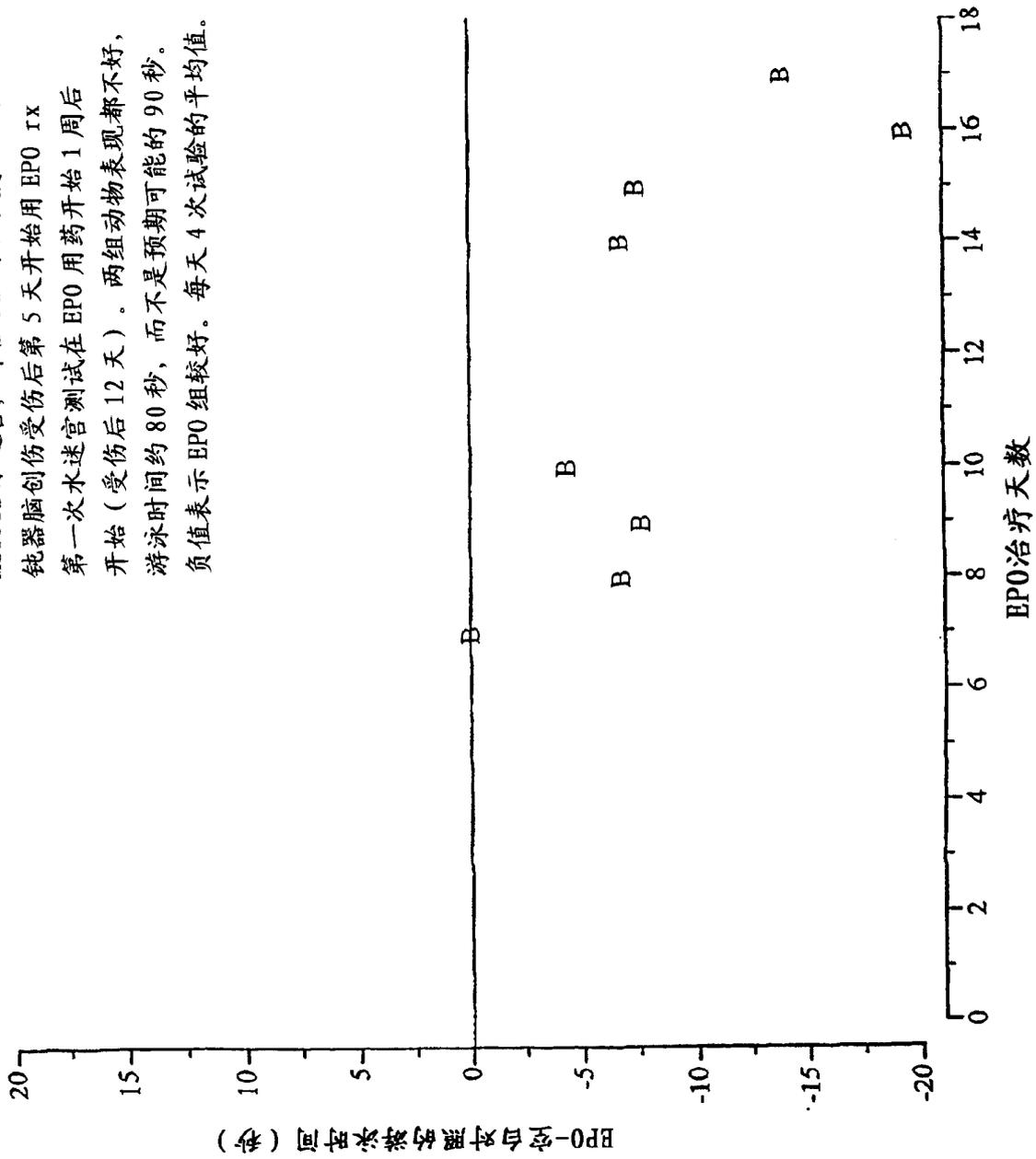


图 13

Morris 水迷宫中游泳到达平台时间的差异。
Bab/c 小鼠, 1 个月前脑创伤, 在伤后 1 个月
开始除周末外每天用 5000U/kg
EPO 治疗 (n=7 每组) 每天 4 次试验的平均值

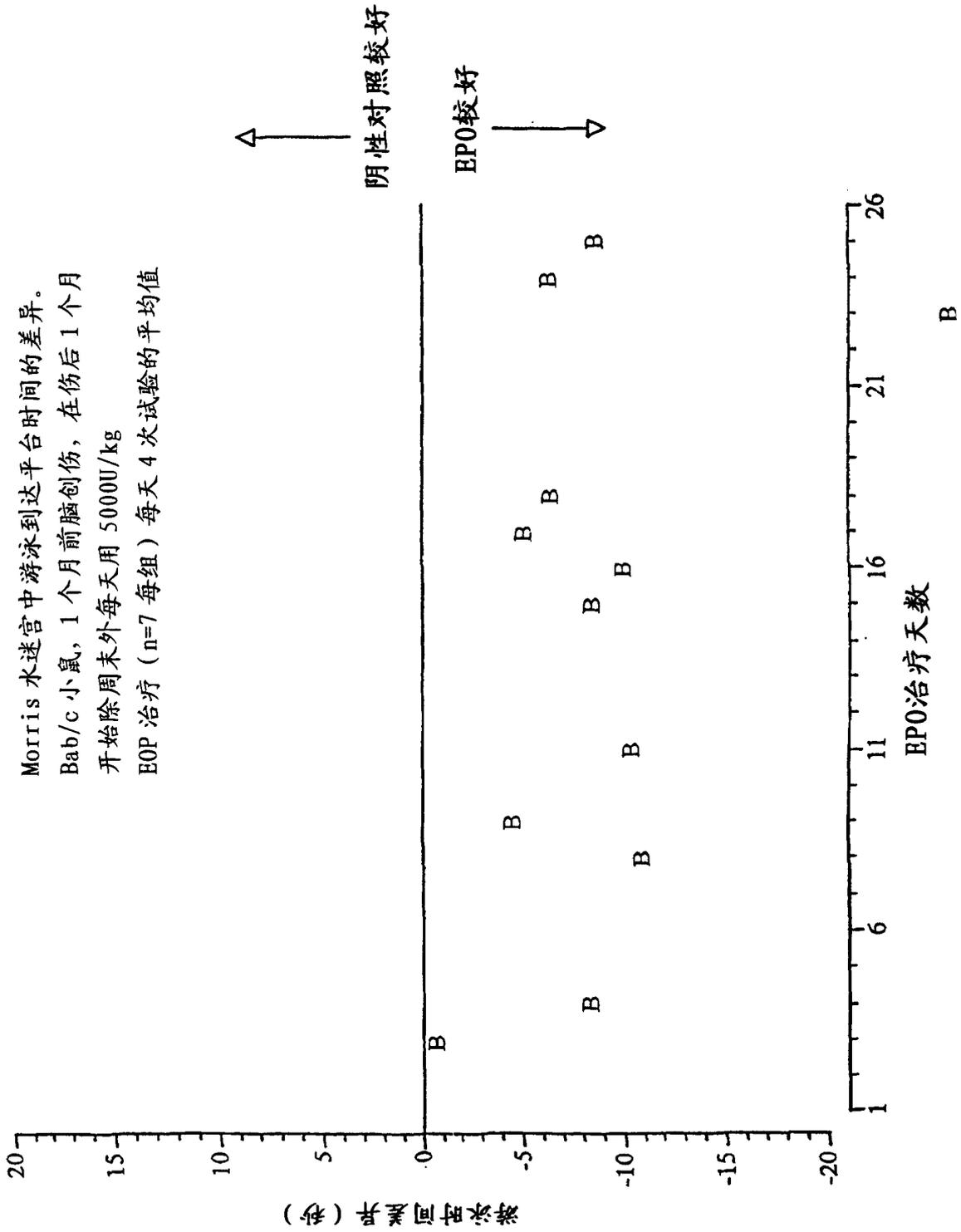


图 14

Kainate 模型

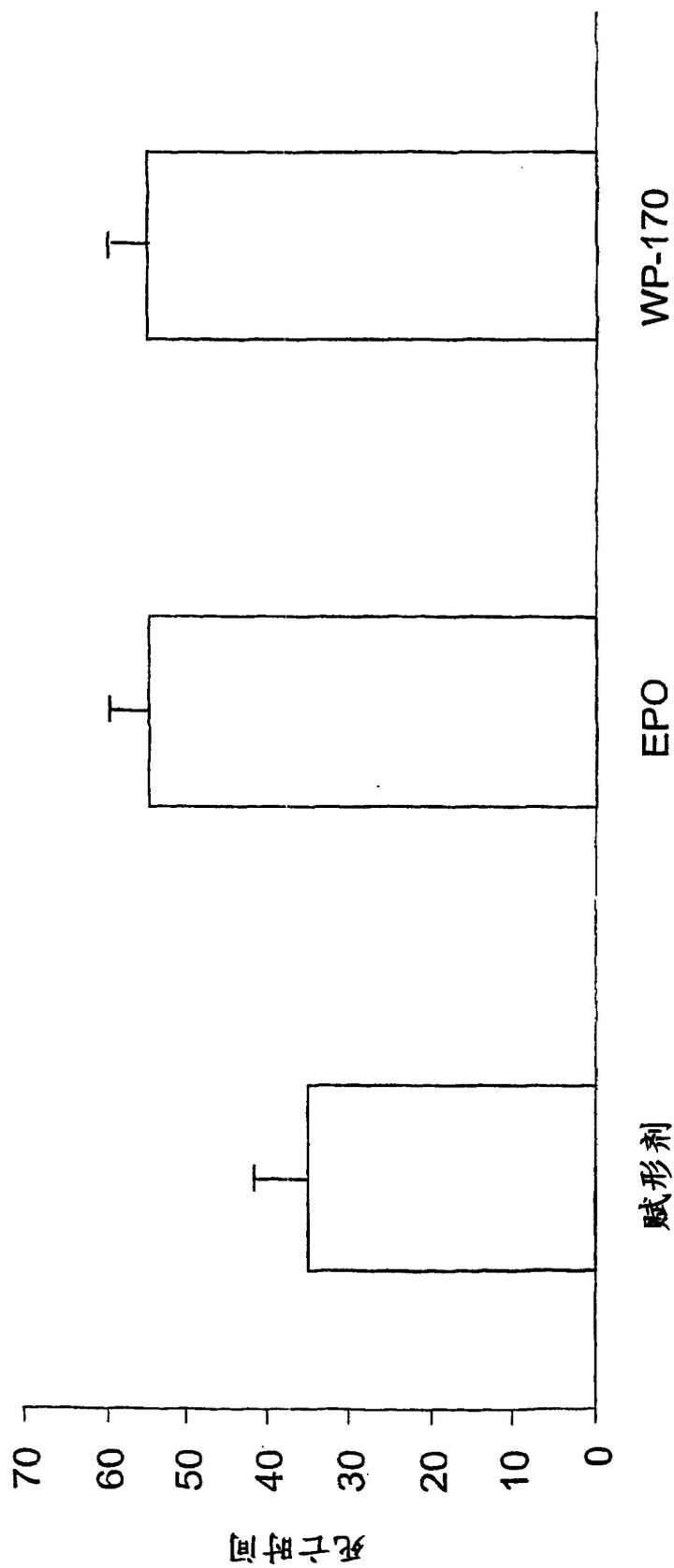


图 15