

# PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(19)  
ČESKÁ  
REPUBLIKA



ÚŘAD  
PRŮMYSLOVÉHO  
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **28.12.2001**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **29.12.2000 29.12.2000**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **2000/753132 2000/259245**

(33) Země priority: **US US**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **17.12.2003**  
**(Věstník č. 12/2003)**

(86) PCT číslo: **PCT/US01/49479**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO02/053580**

(21) Číslo dokumentu:

**2003 - 2059**

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>:

**C 07 K 14/52**

**A 61 K 38/19**

**A 61 P 25/00**

**A 61 P 9/00**

**A 61 P 3/00**

(71) Přihlašovatel:

**THE KENNETH S. WARREN INSTITUTE, INC.,**  
Ossining, NY, US;

(72) Původce:

**Brines Michael, Woodbridge, CT, US;**

**Cerami Anthony, New York, NY, US;**

**Cerami Carla, Sleepy Hollow, NY, US;**

(74) Zástupce:

**Korejzová Zdeňka JUDr., Spálená 29, Praha 1, 11000;**

(54) Název přihlášky vynálezu:

**Ochrana, obnova a posílení buněk, tkáně a  
orgánů odpovídajících na erythropoetin**

(57) Anotace:

Popisují se metody a prostředky pro ochranu nebo posílení buňky, tkáně, orgánu nebo funkce části těla nebo životaschopnost in vivo, in situ nebo ex vivo u savců, kteří zahrnují člověka. Metody zahrnují systémovou nebo lokální aplikaci modulátoru aktivity erythropoetinuového receptoru, jako je erythropoetin nebo upravený erythropoetin.

CZ 2003 - 2059 A3

Ochrana, obnova a posílení buněk, tkáně a orgánů  
odpovídajících na erytropoetin

### Oblast techniky

Popisují se různé formy erytropoetinu a jeho použití při ochraně, udržování, zesílení nebo obnově buněk odpovídajících na erytropoetin a asociovaných buněk, tkání a orgánů.

### Dosavadní stav techniky

Po řadu let jedinou jasnou úlohou erytropoetinu je řízení produkce červených krvinek. V současné době několik linií důkazů naznačuje, že erytropoetin, jako člen rodiny cytokinů, provádí další důležité fyziologické funkce, které jsou zprostředkovány interakcí s receptorem erytropoetinu (erytropoetin-R). Tyto funkce zahrnují mitogenezi, úpravu přívodu vápníku do buněk hladkého svalstva a nervových buněk a účinky na intermediární metabolismus. Věřící se, že erytropoetin umožňuje kompenzační odezvy, které slouží ke zlepšení hypoxického buněčného mikroprostředí, stejně jako upravuje programové odumírání buněk způsobené metabolickým stresem. Ačkoliv jedna studie prokázala, že erytropoetin zavedený intrakraniálně chrání neurony proti hypoxickému poškození neuronů, intrakraniální aplikace není praktický ani přijatelný způsob aplikace při terapeutickém použití, zvláště u normálních jedinců. Dále dřívější studie anemických pacientů, kterým se aplikoval erytropoetin ukázala, že periférně aplikovaný erytropoetin není transportován do mozku (popisuje se v publikaci Martí et al., 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).

Popisují se různé formy erythropoetinu, jejichž aktivity jsou řízeny směrem ke zlepšení erythropoietické aktivity molekuly tak, jako ty s upravenými aminokyselinami na C-konci, jak se popisuje v patentových dokumentech USA č. 5 457 089, 4 835 260. Dále se popisují izoformy erythropoetinu s různým počtem zbytků kyseliny sialové v jedné molekule, jak se uvádí v patentovém dokumentu USA č. 5 856 292, polypeptidy uvedené v patentovém dokumentu č. 4 703 008, agonisté uvedené v patentovém dokumentu č. 5 767 078, peptidy, které se váží na receptor erythropoetinu uvedené v patentovém dokumentu č. 5 773 569 a 5 830 851 a napodobeniny tvořené malými molekulami, jak se popisuje v patentovém dokumentu č. 5 835 382.

Vynález dále popisuje použití erythropoetinu pro ochranu, udržování, posílení nebo obnovu buněk odpovídajících na erythropoetin a asociovaných buněk, tkání a orgánů *in situ* stejně jako *ex vivo* a zavedení erythropoetinu přes endoteliální buněčnou bariéru pro účely ochrany a posílení buněk odpovídajících na erythropoetin a asociovaných buněk, tkání a orgánů vzdálených od vaskulárního systému nebo transport asociovaných molekul podle vynálezu.

#### Podstata vynálezu

Vynález popisuje použití erythropoetinů pro přípravu farmaceutických prostředků pro ochranu, udržování, zesílení nebo obnovu funkce nebo pro životnost savčích buněk, které odpovídají na erythropoetin a jejich asociovaných buněk, tkání a orgánů. Savčí buňky odpovídající na erythropoetin a jejich asociované buňky, tkáň nebo orgán jsou odděleny od vaskulárního systému pevnou bariérou endoteliálních buněk. V jiném provedení vynálezu buňky, tkáně, orgány nebo jiné části těla se izolovaly s těla savce stejně jako ty určené pro transplantaci. Buňkou nebo tkání odpovídající na erythropoetin

mohou být neuronové, svalové, kapilární endoteliální buňky, buňky sítnice, srdce, plic, jater, ledvin, tenkého střeva, nadledvinové kůry, dřeně nadledvin, varlat, vaječníků, pankreatu a endometria. Uvedené příklady buněk odpovídajících na erytropoetin jsou pouze ilustrativní. V jednom provedení vynálezu buňka odpovídající na erytropoetin nebo jejich asociované buňky, tkáně nebo orgány nejsou dráždivé buňky, tkáně nebo orgány nebo převážně neobsahují dráždivé buňky nebo tkáň. V dalším provedení vynálezu savčí buňka, tkáň nebo orgán, v případě kterého se použil uvedený derivát erytropoetinu, jsou ty, které prodloužily dobu přežití za podmínek působící negativně na životnost buňky, tkáně nebo orgánu. Takové podmínky zahrnují traumatickou hypoxii *in situ* nebo metabolickou disfunkci, hypoxii *in situ* vyvolanou chirurgickým zásahem nebo metabolickou dysfunkcí nebo působením toxinu *in situ*, může být také spojena s chemoterapií nebo radioterapií. V jednom provedení vynálezu jsou uvedené podmínky výsledkem kardiopulmonárního bypassu (zařízení srdce-plíce), který se používá při jistých chirurgických postupech.

Erytropoetiny je možné použít při terapii nebo profylaktické léčbě lidského onemocnění CNS nebo onemocnění periferního nervového systému, které vykazují primárně neurologické nebo psychiatrické symptomy, stejně jako očního, kardiovaskulárního, kardiopulmonárního, respiračního onemocnění, onemocnění ledvin, onemocnění močového ústrojí a reprodukčního systému, gastrointestinální onemocnění a endokrinní a metabolické abnormality.

Vynález dále popisuje farmaceutické prostředky obsahující určité erytropoetinové deriváty vhodné pro aplikaci savci, s výhodou člověku. Takové farmaceutické prostředky se mohou připravit tak, aby byly vhodné pro orální, intranasální nebo

parenterální aplikaci nebo ve formě promývacího roztoku pro udržování životaschopnosti buněk, tkáně nebo orgánů *ex vivo*.

Erytropoetinové deriváty použitelné pro shora popsané účely mohou zahrnovat libovolný přirozený erytropoetin nebo analog erytropoetinu, napodobeninu erytropoetinu a fragment erytropoetinu, hybridní molekulu erytropoetinu, molekulu vázající se na receptor erytropoetinu, agonistu erytropoetinu, renální erytropoetin, mozkový erytropoetin, jeho oligomér, multimér, mutein, jeho obdobu, jeho přirozeně se vyskytující formu, jeho syntetickou formu, jeho rekombinantní formu, jeho glykosylační variantu, jeho deglykosylovanou variantu nebo jeho kombinaci. Vynález popisuje libovolnou formu erytropoetinu schopnou napomáhat prospívání buněk vykazujících odezvu na erytropoetin.

Jiné deriváty erytropoetinu, které je možné použít pro shora popsané účely a farmaceutické prostředky zahrnují přirozené erytropoetiny, stejně jako erytropoetiny, které se změnily alespoň jednou úpravou ve srovnání s přirozeným erytropoetinem, s výhodou pak ve srovnání s přirozeným lidským erytropoetinem. Alespoň jednou úpravou může být úprava alespoň jedné aminokyseliny molekuly erytropoetinu nebo úprava alespoň jednoho sacharidu molekuly erytropoetinu. Molekuly erytropoetinu použitelné pro zde popsané účely mohou mít velké množství úprav ve srovnání s přirozenou molekulou, jako je velké množství úprav aminokyselinové části molekuly, velké množství úprav sacharidové části molekuly nebo alespoň jednu úpravu aminokyselinové části molekuly a alespoň jednu úpravu sacharidové části molekuly. Upravená molekula erytropoetinu si uchovává svou schopnost chránit, udržovat, zesilovat nebo obnovovat funkci nebo životaschopnost savčích buněk odpovídajících na erytropoetin nebo jiné vlastnosti molekuly erytropoetinu, které se nevztahují k tomu, co se popisuje

shora v textu, přičemž požadovaný rys nemusí být přítomen ve srovnání s přirozenou molekulou. Ve výhodném provedení vynálezu erythropoetinový derivát není erythropoiteický.

V jednom provedení vynálezu erythropoetin podle vynálezu nemá alespoň žádné části kyseliny sialové. Ve výhodném provedení vynálezu upravený erythropoetin je asialoerythropoetin, nejvýhodnější je lidský asialoerythropoetin. Jiné výhodné provedení vynálezu popisuje upravený erythropoetin, který vykazuje 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 nebo 13 částí sialové kyseliny.

Ve druhém provedení vynálezu se popisuje upravený erythropoetin, který nemá alespoň žádné N-spojené nebo O-spojené sacharidy.

Ve třetím provedení vynálezu upravený erythropoetin má alespoň omezený obsah sacharidů v důsledku ošetření erythropoetinu, který obsahuje své přirozené cukry, alespoň jednou glykozidázou.

Ve čtvrtém provedení vynálezu sacharidová část upravené molekuly erythropoetinu nevykazuje alespoň savčí glykosylační patern v důsledku exprese rekombinantního erythropoetinu v buňkách, které nejsou savčí. Ve výhodných provedeních vynálezu upravené erythropoetiny se exprimují v hmyzích nebo rostlinných buňkách.

V pátém provedení vynálezu upravený erythropoetin má alespoň jednu nebo více oxidovaných sacharidů, které se mohou chemicky redukovat. Ve výhodném provedení vynálezu upravený erythropoetin je oxidován jodistanem, v jiném výhodném provedení vynálezu se erythropoetin oxidovaný jodistanem

chemicky redukuje hydridoboritanovou solí, jako je hydrid sodno-boritý nebo kyanohydridoboritan sodný.

V šestém provedení vynálezu upravený erythropoetin vhodný pro shora v textu popsané účely vykazuje alespoň jeden nebo více upravených zbytků argininu. V jednom provedení vynálezu upravený erythropoetin obsahuje glyoxalovou část na jednom nebo více argininových zbytcích, jako je arylglyoxalová nebo alkylglyoxalová část. V jiném provedení vynálezu se upravil alespoň jeden argininový zbytek reakcí s vicinálním diketonem, jako je například 2,3-butandion nebo cyklohexandion.

V sedmém provedení vynálezu upravený erythropoetin obsahuje alespoň jeden nebo více lyzinových zbytků nebo úpravu N-terminální aminokyseliny erythropoetinové molekuly. Takové úpravy jsou výsledkem reakce lyzinového zbytku nebo N-terminální aminoskupiny s činidlem, které upravuje aminoskupinu. Upravený lyzinový zbytek se může dále chemicky redukovat. V jednom výhodném provedení vynálezu se erythropoetin značí biotinem nebo karbamylem prostřednictvím jedné nebo více lyzinových skupin. V jiném výhodném provedení vynálezu lyzin reagoval s aldehydem nebo s redukujícím cukrem za vzniku iminu, který se může stabilizovat redukcí, například kyanohydroboritanem sodným za vzniku N-alkylovaného lyzinu, jako je glucitolylyllyzin nebo který se v případě redukujících cukrů může stabilizovat znovu uspořádáním podle Amadori nebo Heynse za vzniku alfa-deoxy-alfa-aminosacharidu, jako je alfa-deoxy-alfa-fruktosyllyzin. V jiném výhodném provedení vynálezu lyzinová skupina je upravená karbamylem, například v důsledku reakce s kyanátovým iontem, alkyl-karbamylace, aryl-karbamylace nebo aryl-thiokarbamylace s alkylizokyanátem, arylizothiokyanátem nebo se mohou upravit acylem pomocí reaktivní derivátů alkylkarboxylové nebo arylkarboxylové kyseliny, jako je reakce s anhydridem kyseliny octové,

anhydridem kyseliny jantarové nebo anhydridem kyseliny ftalové. Alespoň jednou lyzinovou skupinou může být trinitrofenyl upravený reakcí s trinitrobenzensulfonovou kyselinou nebo s výhodou jejich sole. V jiném provedení vynálezu se mohou lyzinové zbytky upravovat reakcí s derivátem glyoxalu, jako je reakce s glyoxalem, methylglyoxalem nebo 3-deoxyglukosonem za vzniku odpovídajících alfa-karboxyalkylových derivátů.

V osmém provedení vynálezu se může upravit alespoň jeden tyrosinový zbytek erythropoetinu v poloze aromatického kruhu elektrofilním činidlem, například nitrací nebo jodací.

V devátém provedení vynálezu se může upravit zbytek kyseliny asparágové nebo glutamové erythropoetinu reakcí s karbodiimidem, po níž následuje reakce s aminem, jako je glycinamid.

V desátém provedení vynálezu se může upravit alespoň tryptofanový zbytek erythropoetinu, například reakcí s n-bromosukcinimidem nebo n-chlorosukcinimidem.

V jedenáctém provedení vynálezu se popisuje upravená molekula erythropoetinu vykazující alespoň jednu odstraněnou aminoskupinu, například reakcí s ninhydrinem, po níž následuje redukce výsledné karbonylové skupiny reakcí s hydridoboritanem.

Ve dvanáctém provedení vynálezu se popisuje upravený erythropoetin, který vykazuje alespoň otevření alespoň jedné z cysteinových vazeb v molekule erythropoetinu reakcí s redukčním činidlem, jako je dithiothreitol, pak následuje reakce sulfhydrylů s amidem kyseliny jódoctové, s kyselinou

jódoctovou nebo s jiným elektrofilním činidlem, aby se předešlo opětnému vzniku disulfidových můstků.

Ve třináctém provedení vynálezu se popisuje upravený erytropoetin, který vykazuje alespoň jednu substituci libovolné z řady aminokyselin, jako je leucin, alespoň jedním zbytkem ze skupiny zahrnující lyzin, arginin, tryptofan, tyrozin nebo cystein za použití metod molekulární biologie.

Ve čtrnáctém provedení vynálezu se upravený erytropoetin upravil omezenou chemickou proteolýzou, která je zaměřena na určité zbytky, například štěpí vazbu po tryptofanových zbytcích. Vynález popisuje fragmenty erytropoetinu, které jsou výsledkem uvedeného štěpení.

Jak se uvádí shora v textu, erytropoetin, který je možné použít pro shora uvedené účely může vykazovat alespoň jednu ze shora uvedených úprav, ale může také vykazovat více než jednu ze shora v textu uvedených úprav. Prostřednictvím příkladu upraveného erytropoetinu s jednou úpravou v sacharidové části molekuly a s jednou úpravou aminokyselinové části, upravený erytropoetin je asialoerytropoetin a jeho lyzinové zbytky jsou upraveny biotinem nebo karbamylem. Vynález také popisuje prostředky zahrnující farmaceutické prostředky obsahující jeden nebo více shora popsanych erytropoetinů.

Vynález dále popisuje způsob ochrany, udržování, zesílení nebo obnovy funkce nebo životaschopnosti savčích buněk odpovídajících na erytropoetin a jejich asociovaných buněk, tkání nebo orgánů aplikací účinného množství libovolného jednoho nebo více shora v textu uvedených erytropoetinů. V jednom určitém provedení vynálezu jsou savčí buňky odpovídající na erytropoetin a jejich asociované buňky, tkáň nebo orgán odděleny od cév bariérou z endoteliálních buněk.

V jiném provedení vynálezu se buňky, tkáně, orgány nebo tělesné části izolovaly z těla savce, jako ty části určené pro transplantaci. Prostřednictvím neomezených příkladů buňka nebo tkáň odpovídající na erytropoetin může být nervová, retinální, svalová, srdeční, plicní, jaterní, ledvinová, endometriální buňka nebo tkáň nebo buňka nebo tkáň z tenkého střeva, nadledvinové kůry, z dřene nadledvin, z endotelia kapilár, z varlat a vaječníků. Tyto příklady buněk odpovídajících na erytropoetin jsou pouze ilustrativní. V určitém provedení vynálezu buňka odpovídající na erytropoetin nebo jejich asociované buňky, tkáně nebo orgány nejsou dráždivé buňky, tkáně nebo orgány nebo převážně neobsahují dráždivé buňky nebo tkáně. V jiném určitém provedení vynálezu savčí buňka, tkáň nebo orgán v případě, kterých je možné aplikovat derivát erytropoetinu, jsou ty, které prodloužily dobu přežití za podmínek působící negativně na životnost buňky, tkáně nebo orgánu. Takové podmínky zahrnují traumatickou hypoxii *in situ* nebo metabolickou disfunkci, hypoxii *in situ* vyvolanou chirurgickým zásahem nebo metabolickou dysfunkcí nebo vystavením působení toxinu *in situ*. Tyto stavy mohou také být s chemoterapií nebo radioterapií. V jednom provedení vynálezu se popisuje ochrana proti nežádoucím účinkům, které jsou výsledkem kardiopulmonárního bypassu.

Vynález dále popisuje libovolný z již dříve zmíněných erytropoetinů, stejně jako libovolné jiné molekuly erytropoetinů, které zahrnují přirozený lidský erytropoetin a mohou se použít při přípravě farmaceutického prostředku pro léčbu buněk, tkání nebo orgánů *ex vivo*, pro účely ochrany, udržování, zesílení nebo obnovu funkce nebo životaschopnosti savčích buněk odpovídajících na erytropoetin a jejich asociovaných buněk, tkání nebo orgánů. Uvedenou léčbu *ex vivo* je možné použít například při ochraně buněk, tkání nebo orgánů vhodných pro transplantaci, ať už autotransplantaci nebo

xenotransplantaci. Buňky, tkáň nebo orgán se mohou promývat v roztoku, který obsahuje erytropoetin, nebo se může zavést promývací roztok do orgánu prostřednictvím cévního systému nebo jinými způsoby, aby se udržela funkce buněk během doby, kdy buňky, tkáň nebo orgán není integrován s cévním systémem dárce nebo příjemce. Aplikace promývacího roztoku se může u dárce provést, dříve než se odebere orgán, stejně jako se může aplikovat na již odebraný orgán a příjemci. Aplikaci libovolného erytropoetinu je možné provést v každém případě, kdy se oddělí buňka, tkáň nebo orgán od vaskulárního systému jedince a je nutné zajistit jejich existenci *ex vivo* po určitou dobu. Termín „izolovaný“ znamená omezení nebo zablokování vaskulárního systému buněk, tkáně nebo orgánu nebo části těla, což je možné provést například během chirurgického zákroku, který zahrnuje zvláště kardiopulmonární bypass, bypass vaskulárního systému buňky, tkáně, orgánu nebo části těla, vyjmutí buněk, tkáně, orgánu nebo části těla ze savčího těla, jak se může provést před xenotransplantací nebo před nebo během autotransplantace, nebo při traumatické amputaci buněk, tkáně, orgánu nebo části těla. K těmto účelům slouží perfúze erytropoetinem *in situ* a *ex vivo*. *Ex vivo* erytropoetin se může v případě buněk, tkáně nebo orgánu aplikovat v ochranném roztoku. Aplikaci je možné provést nepřerušovanou perfúzí, pulzatilní perfúzí, infúzí, promýváním, injekcí nebo katetrizací.

Vynález dále popisuje způsob ochrany, udržování, posílení nebo obnovení životaschopnosti savčí buňky, tkáně, orgánu nebo části těla, které zahrnují buňku nebo tkáň odpovídající na erytropoetin, kde buňka, tkáň nebo orgán nebo část těla je odebrána z těla savce. Způsob zahrnuje alespoň vystavení izolované savčí buňky, tkáně nebo orgánu nebo části těla množství erytropoetinu po dobu, která je účinná při ochraně, udržování, zesílení nebo obnově uvedené životaschopnosti.

Termín „izolovaný“ znamená omezení nebo zablokování vaskulárního systému buněk, tkáně nebo orgánu nebo části těla, jak je možné provést během chirurgického zákroku, který zahrnuje zvláště kardiopulmonární bypass, bypass vaskulárního systému buňky, tkáně, orgánu nebo části těla, odstranění buněk, tkáně, orgánu nebo části těla ze savčího těla, jak se může provést před xenotransplantací nebo před nebo během autotransplantace, nebo při traumatické amputaci buněk, tkáně, orgánu nebo části těla. K těmto účelům slouží perfúze erythropoetinem *in situ* a *ex vivo*. *Ex vivo* erythropoetin se může buňkám, tkáni nebo orgánu aplikovat v ochranném roztoku. Aplikaci je možné provést nepřerušovanou perfúzí, pulzatilní perfúzí, infúzí, promýváním, injekcí nebo katetrizací.

Při shora uvedené izolaci a při provedení *ex vivo* použitelný erythropoetin může být libovolný ze shora uvedených erythropoetinů, které zahrnují přirozený erythropoetin nebo analog erythropoetinu, napodobeninu erythropoetinu a fragment erythropoetinu, hybridní molekulu erythropoetinu, molekulu vázající se na receptor erythropoetinu, agonistu erythropoetinu, renální erythropoetin, mozkový erythropoetin, jeho oligomér, multimér, mutein, jeho obdobu, jeho přirozeně se vyskytující formu, jeho syntetickou formu, jeho rekombinantní formu, jeho glykosylační variantu, jeho deglykosylovanou variantu nebo jeho kombinaci. Vynález popisuje libovolnou formu erythropoetinu schopnou napomáhat prospívání buněk vykazujících odezvu na erythropoetin. Jiné erythropoetiny zahrnují, ale nejsou omezeny na asialoerythropoetin, N-deglykosylovaný erythropoetin, O-deglykosylovaný erythropoetin, erythropoetin s omezeným obsahem sacharidů, erythropoetin se změněnými glykosylačními paterny, erythropoetin se sacharidy oxidovaný a pak redukovaný, erythropoetin upravený arylglyoxalem, erythropoetin upravený alkylglyoxalem, erythropoetin upravený 2,3-butandionem, erythropoetin upravený cyklohexandionem,

erytropoetin upravený biotinem, N-alkylovaný lysylerytropoetin, glucitolylyllyzinerytropoetin, alfa-deoxy-alfa-fruktosyllyllyzinerytropoetin, erytropoetin upravený karbamylem, acetylovaný erytropoetin, erytropoetin upravený sukcinylem, alfa-karboxyalkylerytropoetin, nitrovaný erytropoetin, jodovaný erytropoetin. Výhodný je lidský erytropoetin. Nejvýhodnější je přirozený lidský erytropoetin. V jiném provedení vynálezu je výhodný lidský asialoerytropoetin. V jiném provedení vynálezu je výhodný lidský fenylglyoxalerytropoetin.

Buňkou nebo tkání odpovídající na erytropoetin ex vivo mohou být neuronové, svalové, kapilární endoteliální buňky, buňky sítnice, srdce, plic, jater, ledvin, tenkého střeva, nadledvinové kůry, dřeně nadledvin, varlat, vaječníků, pankreasu a endometria. Uvedené příklady buněk odpovídajících na erytropoetin jsou pouze ilustrativní.

Všechny shora v textu uvedené metody a použití je možné s výhodou aplikovat člověku, ale je možné je aplikovat libovolnému savci, jako jsou domácí zvířata, domestikovaná zvířata, chovná zvířata a zvířata chovaná v zajetí. Způsoby aplikace shora v textu uvedených farmaceutických prostředků zahrnují orální, intravorní, intranasální, povrchovou, intraluminální, parenterální aplikaci nebo inhalaci, intravenózní, intraarteriální, subkutánní, intramuskulární, intraperitoneální, submukozální nebo intradermální aplikaci. V případě použití ex vivo je výhodné použít perfúzní roztok nebo lázeň. To zahrnuje perfúzi izolované části vaskulárního systému in situ. Vynález dále ukazuje, že libovolný ze shora v textu popsanych erytropoetinů je použitelný při přípravě farmaceutického prostředku při obnově nefunkční buňky, tkáně nebo orgánu, když se aplikuje po objevení se onemocnění nebo stavu, který je odpovědný za nefunkčnost. Aplikace

farmaceutického prostředku obsahující erythropoetin obnovuje kognitivní funkci u zvířat, která prodělala trauma mozku, dokonce, když se aplikují dlouho po ustoupení traumatu (například tři dni, pět dní, týden, měsíc nebo déle). Erythropoetiny použitelné při takových aplikacích zahrnují libovolný ze shora v textu popsaných erythropoetinů nebo libovolný přirozený erythropoetin nebo analog erythropoetinu, napodobeninu erythropoetinu a fragment erythropoetinu, hybridní molekulu erythropoetinu, molekulu vázající se na receptor erythropoetinu, agonistu erythropoetinu, renální erythropoetin, mozkový erythropoetin, jeho oligomér, multimér, mutein, jeho obdobu, jeho přirozeně se vyskytující formu, jeho syntetickou formu, jeho rekombinantní formu, jeho glykosylační variantu, jeho deglykosylovanou variantu nebo jeho kombinaci. Vynález popisuje libovolnou formu erythropoetinu schopnou napomáhat prospívání buněk vykazujících odezvu na erythropoetin. Jiné deriváty erythropoetinu, které je možné použít pro shora uvedené účely a farmaceutické prostředky zahrnují jak přirozené erythropoetiny tak erythropoetiny, které se změnily alespoň jednou úpravou ve srovnání s přirozeným erythropoetinem a s výhodou s přirozeným lidským erythropoetinem. Úprava může být úprava alespoň jedné aminokyseliny molekuly erythropoetinu nebo úprava alespoň jednoho sacharidu molekuly erythropoetinu. Molekuly erythropoetinu použitelné pro tyto účely mohou mít velké množství úprav ve srovnání s přirozenou molekulou, jako je velké množství úprav aminokyselinové části molekuly, velké množství úprav sacharidové části molekuly nebo alespoň jednu úpravu aminokyselinové části molekuly a alespoň jednu úpravu sacharidové části molekuly. Upravená část erythropoetinu si uchovává svoji schopnost chránit, udržovat, zesilovat nebo obnovovat funkci nebo životaschopnost savčích buněk odpovídajících na erythropoetin, a ještě další vlastnosti molekuly erythropoetinu, které nesouvisí s tím co bylo popsáno. Požadovaný rys nemusí být ve srovnání s přirozenou molekulou

přítomen. Výhodný je lidský erytropoetin, nejvýhodnější je lidský erytropoetin. V jiném provedení vynálezu je výhodný lidský asialoerytropoetin.

V jiném provedení vynález popisuje způsoby použití shora popsaného erytropoetinu pro obnovu nefunkční buňky, tkáně nebo orgánu, když se aplikuje po vzniku onemocnění nebo podmínek odpovědných za ztrátu funkce.

Aplikace farmaceutického prostředku obsahující erytropoetin obnovuje kognitivní funkci u zvířat, která prodělala trauma mozku, dokonce, když se aplikují dlouho po pominutí traumatu (například tři dni, pět dní, týden, měsíc nebo déle). Erytropoetiny použitelné při takových aplikacích zahrnují libovolný ze shora v textu popsaných erytropoetinů nebo libovolný přirozený erytropoetin nebo analog erytropoetinu, napodobeninu erytropoetinu a fragment erytropoetinu, hybridní molekulu erytropoetinu, molekulu vázající se na receptor erytropoetinu, agonistu erytropoetinu, renální erytropoetin, mozkový erytropoetin, jeho oligomér, multimér, mutein, jeho obdobu, jeho přirozeně se vyskytující formu, jeho syntetickou formu, jeho rekombinantní formu, jeho glykosylační variantu, jeho deglykosylovanou variantu nebo jeho kombinaci. Vynález popisuje libovolnou formu erytropoetinu schopnou napomáhat prospívání buněk vykazujících odezvu na erytropoetin. Jiné deriváty erytropoetinu, které je možné použít pro shora uvedené účely a farmaceutické prostředky zahrnují jak přirozené erytropoetiny tak erytropoetiny, které se změnily alespoň jednou úpravou ve srovnání s přirozeným erytropoetinem a s výhodou s přirozeným lidským erytropoetinem. Úprava může být úprava alespoň jedné aminokyseliny molekuly erytropoetinu nebo úprava alespoň jednoho sacharidu molekuly erytropoetinu. Molekuly

erythropoetinu použitelné pro tyto účely mohou mít velké množství úprav ve srovnání s přirozenou molekulou, jako je velké množství úprav aminokyselinové části molekuly, velké množství úprav sacharidové části molekuly nebo alespoň jednu úpravu aminokyselinové části molekuly a alespoň jednu úpravu sacharidové části molekuly. Upravená část erythropoetinu si uchovává svoji schopnost chránit, udržovat, zesilovat nebo obnovovat funkci nebo životaschopnost savčích buněk odpovídajících na erythropoetin, a ještě další vlastnosti molekuly erythropoetinu, které nesouvisí s tím co bylo popsáno. Požadovaný rys nemusí být ve srovnání s přirozenou molekulou přítomen. Výhodný je lidský erythropoetin, nejvýhodnější je lidský erythropoetin. V jiném provedení vynálezu je výhodný lidský asialoerythropoetin.

Vynález dále popisuje způsoby umožňující transcytózu molekuly přes bariéru endoteliálních buněk u savce aplikací prostředku obsahující molekulu ve spojení s erythropoetinem, jako je erythropoetin, který nemá alespoň žádnou část kyseliny sialové, erythropoetin, který nemá alespoň žádné N-spojené nebo O-spojené sacharidy, erythropoetin, který má alespoň omezený obsah sacharidů v důsledku ošetření erythropoetinu s jeho přirozenými cukry alespoň jednou glykozidázou, erythropoetin se sacharidovou částí molekuly erythropoetinu, která nevykazuje alespoň savčí glykosylační patern v důsledku exprese rekombinantního erythropoetinu v buňkách, které nejsou savčí buňky, erythropoetin, který má alespoň jeden nebo více oxidovaných sacharidů, které se mohou chemicky redukovat, erythropoetin, který vykazuje alespoň jeden nebo více upravených zbytků argininu, erythropoetin, který obsahuje alespoň jeden nebo více lyzinových zbytků nebo úpravu N-terminální aminokyseliny erythropoetinové molekuly, erythropoetin, který má alespoň jeden upravený tyrozinový zbytek, erythropoetin, který má upravený zbytek kyseliny

asparágové nebo glutamové, erythropoetin, který má upravený tryptofanový zbytek, erythropoetin vykazující alespoň jednu odstraněnou aminoskupinu, erythropoetin, který vykazuje alespoň otevření alespoň jedné z cyteinových vazeb, erythropoetin, který vykazuje alespoň jednu substituci alespoň jedné aminokyseliny, zkrácený erythropoetin.

Spojení mezi transportovanou molekulou a erythropoetinem může být například labilní kovalentní vazba, stabilní kovalentní vazba nebo nekovalentní spojení s vazebným místem vhodným pro molekulu. Endoteliální buněčné bariéry mohou být hematoencefalická bariéra, bariéra krev-oko, bariéra krev-ovarium, bariéra krev-varle a bariéra krev-placenta. Molekuly vhodné pro transport způsobem podle vynálezu zahrnují hormony, jako je růstový hormon, antibiotika a činidla určená proti zhoubnému bujení.

Vynález dále popisuje prostředek umožňující transcytózu molekuly endoteliální buněčnou bariérou u savce. Uvedený prostředek obsahuje molekulu spojenou s erythropoetinem, jako je erythropoetin, který nevykazuje alespoň žádnou část kyseliny sialové, erythropoetin, který nemá alespoň žádné N-spojené nebo O-spojené sacharidy, erythropoetin, který má alespoň omezený obsah sacharidů v důsledku ošetření erythropoetinu s jeho přirozenými cukry alespoň jednou glykozidázou, erythropoetin se sacharidovou částí molekuly erythropoetinu, která nevykazuje alespoň savčí glykosylační patern v důsledku exprese rekombinantního erythropoetinu v buňkách, které nejsou savčí, erythropoetin, který má alespoň jeden nebo více oxidovaných sacharidů, které se mohou chemicky redukovat, erythropoetin, který vykazuje alespoň jeden nebo více upravených zbytků argininu, erythropoetin, který obsahuje alespoň jeden nebo více lyzinových zbytků nebo úpravu N-terminální aminokyseliny erythropoetinové molekuly, erythropoetin, který má alespoň jeden

upravený tyrozinový zbytek, erytropoetin, který má upravený zbytek kyseliny asparágové nebo glutamové, erytropoetin, který má upravený tryptofanový zbytek, erytropoetin vykazující alespoň jednu odstraněnou aminoskupinu, erytropoetin, který vykazuje otevření alespoň jedné z cyteinových vazeb, erytropoetin, který vykazuje alespoň jednu substituci alespoň jedné aminokyseliny, zkrácený erytropoetin.

Spojení mezi transportovanou molekulou a erytropoetinem může být například labilní kovalentní vazba, stabilní kovalentní vazba nebo nekovalentní spojení s vazebným místem vhodným pro molekulu. Endoteliální buněčné bariéry mohou být hematoencefalická bariéra, bariéra krev-oko, bariéra krev-ovárium, bariéra krev-varle a bariéra krev-placenta. Molekuly vhodné pro transport způsobem podle vynálezu zahrnují hormony, jako je růstový hormon, antibiotika a činidla určená proti zhoubnému bujení.

Dále vynález popisuje libovolné shora v textu popsané erytropoetiny, které je možné použít při přípravě farmaceutického prostředku umožňující transcytózu molekuly endoteliální buněčnou bariérou savce. Uvedený prostředek obsahuje molekulu spojenou s erytropoetinem, jako je erytropoetin, který nemá alespoň žádnou část kyseliny sialové, erytropoetin, který nemá alespoň žádné N-spojené nebo O-spojené sacharidy, erytropoetin, který má alespoň omezený obsah sacharidů v důsledku ošetření erytropoetinu s jeho přirozenými cukry alespoň jednou glykozidázou, erytropoetin se sacharidovou částí molekuly erytropoetinu, která nevykazuje alespoň savčí glykosylační patern v důsledku exprese rekombinantního erytropoetinu v buňkách, které nejsou savčí, erytropoetin má alespoň jeden nebo více oxidovaných sacharidů, které se mohou chemicky redukovat, erytropoetin, který vykazuje alespoň jeden nebo více upravených zbytků argininu,

erytropoetin, který obsahuje alespoň jeden nebo více lyzinových zbytků nebo úpravu N-terminální aminokyseliny erytropoetinové molekuly, erytropoetin, který má alespoň jeden upravený tyrozinový zbytek, erytropoetin, který má upravený zbytek kyseliny asparágové nebo glutamové, erytropoetin, který má upravený tryptofanový zbytek, erytropoetin vykazující alespoň jednu odstraněnou aminoskupinu, erytropoetin, který vykazuje alespoň otevření alespoň jedné z cyteinových vazeb, erytropoetin, který vykazuje alespoň jednu substituci alespoň jedné aminokyseliny, zkrácený erytropoetin.

Spojení může být například labilní kovalentní vazba, stabilní kovalentní vazba nebo nekovalentní spojení s vazebným místem vhodným pro molekulu. Endoteliální buněčné bariéry mohou být hematoencefalická bariéra, krev-oko bariéra, bariéra krev-ovárium, bariéra krev-varle a bariéra krev-placenta. Molekuly vhodné pro transport způsobem podle vynálezu zahrnují hormony, jako je růstový hormon, antibiotika a činidla určená proti zhoubnému bujení.

Termín „buňka odpovídající na erytropoetin“ znamená savčí buňku, jejíž funkce nebo životaschopnost se udržuje, podporuje, zesiluje, regeneruje vystavením buňky působení erytropoetinu nebo erytropoetin má na buňku libovolné jiné pozitivní účinky.

Příklady takových buněk zahrnují neuronové, retinální, svalové, srdeční, plicní, jaterní, ledvinové buňky a buňky tenkého střeva, nadledvinové kůry, dřeně nadledvin, kapilárního endotelia, varlat, vaječníků a endometria. Termín buňky odpovídající na erytropoetin se může rozšířit na jiné buňky, které přímo neodpovídají na erytropoetin, nebo na tkáň nebo orgány, které obsahují takové buňky, které neodpovídají na erytropoetin a pozitivní působení erytropoetinem se může

nepřímo rozšířit na ochranu nebo posílení uvedených buněk a tkání či orgánů. Tyto jiné buňky nebo tkáně nebo orgány, které přímo prospívají z obohacení buněk odpovídajících na erytropoetin, které jsou přítomny jako část buněk, tkáně nebo orgánu jsou „asociované“ buňky, tkáně a orgány. Takové zde popsané pozitivní účinky erytropoetinu jsou výsledkem přítomnosti malého počtu nebo části buněk odpovídajících na erytropoetin v tkáni nebo v orgánu, například dráždivá nebo neuronová tkáň přítomná v uvedené tkáni nebo Leydigovi buňky ve varlatech, které produkují testosteron. V jednom provedení vynálezu buňky odpovídající na erytropoetin nebo asociované buňky, tkáně nebo orgány nejsou dráždivé buňky, tkáně nebo orgány nebo neobsahují převážnou část dráždivých buněk nebo tkání.

Způsoby podle vynálezu poskytují lokální nebo systémovou ochranu nebo obohacení buněk, tkání a orgánů v těle savce za různých normálních a negativních podmínek nebo ochranu buněk, tkání nebo orgánů, které jsou určeny pro přenos do jiného těla savce. Navíc také dochází k obnově nebo regeneraci jejich funkce. Jak se uvádí shora v textu schopnost erytropoetinu procházet endoteliální buněčnou bariérou a uplatnění jeho pozitivních účinků na buňky odpovídající na erytropoetin (stejně jako na jiné typy buněk) oddělené od vaskulárního systému nabízí potenciál předcházet stejně jako léčit různé stavy onemocnění, které způsobuje podstatné poškození buněk a tkání zvířat a lidí a umožňuje úspěch dříve neproveditelných chirurgických postupů, při kterých nebezpečí tradičně převládá nad výhodami. Trvání a stupeň úmyslných negativních účinků vyvolaných za účelem maximální výhody, jako je chemoterapie ve vysokých dávkách, terapie ozářením, prodloužené uchování transplantátu ex vivo, prodloužené období ischemie vyvolané chirurgickým zásahem, se může provést s tím, že se využije pozitivního účinku uvedeného vynálezu. Vynález

zahrnuje, ale není omezen na způsoby nebo prostředky, kde cílové buňky odpovídající na erytropoetin jsou odděleny od vaskulárního systému endoteliální buněčnou bariérou nebo endoteliálním pevným spojením. V obecném případě vynález popisuje libovolné buňky odpovídající na erytropoetin a asociované buňky, tkáně a orgány, pro něž může být výhodné, když jsou vystaveny působení erytropoetinu. Dále dysfunkce buněk, tkáně nebo orgánu se může obnovit a regenerovat po akutním nežádoucím projevu (jako je trauma) pomocí působení erytropoetinu.

Vynález v obecném případě popisuje použití erytropoetinu vhodných pro přípravu farmaceutických prostředků pro shora v textu popsané účely, u nichž se udržuje, podporuje, zesiluje, regeneruje buněčná funkce nebo jejich použití je výhodné jiným způsobem. Vynález dále popisuje způsoby udržování, zesilování, podpory nebo regenerace buněčné funkce aplikací savci účinného množství erytropoetinu, jak se popisuje v textu. Vynález dále popisuje způsoby udržování, podpory, zesilování nebo regenerace buněčné funkce ex vivo tím, že se buňky, tkáň nebo orgán vystaví působení erytropoetinu. Vynález také popisuje promývací prostředky obsahující erytropoetin, které jsou vhodné pro ochranu orgánu nebo tkáně.

Různé metody popsané vynálezem využívají farmaceutický prostředek, který zahrnuje alespoň erytropoetin v množství, jenž je účinné při určitém způsobu aplikace a trvání expozice, aby se dosáhlo pozitivních účinků nebo výhod ve spojení s buňkami odpovídajícími na erytropoetin, které jsou v těle savce nebo se z těla savce vejmuly. V případě, že cílová buňka, tkáně nebo orgány určené pro terapii vyžadují erytropoetin, aby prošel endoteliální buněčnou bariérou, pak farmaceutický prostředek zahrnuje erytropoetin v koncentraci,

• která je schopna po přestupu endoteliální buněčné bariéry dosáhnout požadované účinky ve spojení s buňkami odpovídajícími na erytropoetin. Molekuly schopné reagovat s erytropoetinovým receptorem a upravovat aktivitu receptoru, se zde nazývají modulátory aktivity receptoru erytropoetinu, je možné použít v souladu s receptorem. Tyto molekuly mohou být například přirozeně se vyskytující formy, syntetické formy nebo rekombinantní formy molekul erytropoetinu, jak se popisuje shora v textu, nebo jiné molekuly, které mohou být nezbytné při uspořádání erytropoetinu libovolným jiným způsobem s výjimkou úpravy aktivity buněk odpovídajících na erytropoetin, jak se zde popisuje.

Erytropoetin je glykoproteinový hormon, který v případě člověka má molekulární hmotnost přibližně 34 000. Zralý protein obsahuje 165 aminokyselin a zbytky glykosylu obsahují přibližně 40 % hmotnosti molekuly. Formy erytropoetinu použitelné pro praktické účely v souladu s vynálezem zahrnují přirozeně se vyskytující, syntetické a rekombinantní formy následujících lidských a jiných savčích molekul příbuzných erytropoetinu. Jsou to eritropoietin, asialoerytropoetin, deglykosylovaný erytropoetin, analog erytropoetinu, napodobeninu erytropoetinu a fragment erytropoetinu, hybridní molekulu erytropoetinu, molekulu vázající se na receptor erytropoetinu, agonistu erytropoetinu, renální erytropoetin, mozkový erytropoetin, jeho oligomér, multimér, mutein, jeho obdobu. Navíc formy erytropoetinu, které je možné použít v praxi podle vynálezu zahrnují proteiny, které reprezentují funkční ekvivalent genových produktů. Takový ekvivalent genového produktu erytropoetinu zahrnuje mutantní erytropoietiny, které mohou obsahovat delece, zahrnující vnitřní delece, adice, adice, které vedou ke vzniku fúzních proteinů nebo konzervativní substituce aminokyselinových zbytků v aminokyselinové sekvenci a/nebo v přilehlé

aminokyselinové sekvenci. Výsledkem je „tichá“ změna, přičemž vzniká funkční ekvivalent erythropoetinu. Takové aminokyselinové substituce se mohou provést na základě podobnosti polarity, náboje, rozpustnosti, hydrofobnosti, hydrofilnosti, a/nebo amfipatické podstaty zahrnutých zbytků. Například nepolární (hydrofóbní) aminokyselinové zbytky aminokyseliny zahrnují alanin, leucin, izoleucin, valin, prolin, fenylalanin, tryptofan a methionin, polární neutrální aminokyseliny zahrnují glycin, serin, treonin, cystein, tyrozin, asparagin a glutamin, pozitivně nabitě (bazické) aminokyseliny zahrnují arginin, lyzin a histidin a negativně nabitě (kyselé) aminokyseliny zahrnují kyselinu asparágovou a glutamovou. V jiném případě nekonzervativní změny aminokyselin a větší začlenění a delece se mohou použít ke vzniku funkčně změněných mutantů erythropoetinu. Takové mutanty se mohou použít ke změně vlastností erythropoetinu požadovaným způsobem. V jednom provedení vynálezu erythropoetin použitelný pro praktické účely může být mutantní erythropoetin, kde se změnila jedna nebo více aminokyselin ve čtyřech funkčních doménách, které ovlivňují navázání na receptor: VLQRY a/nebo TKVNFYAW a/nebo SGLRSLTTL a/nebo SNFLRG. V jednom provedení vynálezu se použily erythropoetiny obsahující mutace v okolních oblastech molekul, která ovlivňuje kinetiku molekuly nebo vlastnosti navázání na receptor.

Termín „erythropoetin“ je možné užívat ve spojení s různými analogy, fragmenty, hybridními molekulami, agonisty, muteiny a jinými formami, jak se popisuje shora v textu. Termín zahrnuje velký rozsah variant a místa glykosylace erythropoetinu zahrnující přirozenou, deglykosylovanou, asialylovanou a jiné částečně glykosylované formy erythropoetinu. Nelimitující příklady takových variant se popisují v publikaci Tsuda et al., 1990, Eur. J. Biochem. 188: 405-411. Bakterie, kvasinky, hmyz, rostliny, savci zahrnující člověka. Navíc, při expresi a

produkci rekombinantního erytropoetinu se mohou použít různé hostitelské systémy zahrnujícího bakterie, kvasinky, rostliny a savce zahrnující člověka, a buněčné systémy. Rekombinantní erytropoetin produkováný v bakteriích, kde se produkt neupravuje glykosylací a skupinami kyseliny sialové, by se mohly bakterie použít k produkci neglykosylovaných forem erytropoetinu. V jiném případě se rekombinantní erytropoetin může produkovat v jiných systémech, kde probíhá glykosylace. Jsou to například rostliny, lidské buňky.

Jak se uvádí shora v textu, vynález zahrnuje libovolné molekuly modulátorů aktivity receptoru erytropoetinu schopné vyvolat pozitivní aktivitu v případě buněk odpovídajících na erytropoetin bez ohledu na strukturní vztah molekuly s erytropoetinem.

Navíc samotný erytropoetin může být upraven tak, aby se upravila jeho aktivita pro specifickou tkáň nebo tkáň. Několik nelimitujících strategií, které je možné provést, aby se dosáhlo této požadované tkáňové specifity zahrnuje úpravy, které zkracují poločas cirkulace a tak redukuje dobu, po kterou může erytropoetin reagovat s prekurzory erytroidu, nebo úpravy primární struktury molekuly erytropoetinu. Jedním přístupem jak dosáhnout zkrácení poločasu cirkulace je odstranění nebo úprava glykosylačních částí, které jsou v molekuly erytropoetinu tři spojené prostřednictvím atomu dusíku a jeden prostřednictvím atomu kyslíku. Takové varianty glykosylovaného erytropoetinu se mohou produkovat řadou způsobů. Například kyseliny sialové, které uzavírají konec cukerných řetězců se mohou odstranit specifickými sialidázami v závislosti na chemické vazbě spojující kyselinu sialovou s cukerným řetězcem. V jiném případě glykosylovaná struktura může být porušena různými způsoby použitím jiných enzymů, které štěpí specifické vazby. Postupy úprav primární struktury

jsou myriáda a zahrnují substituce specifických aminokyselin, chemickou úpravu aminokyselin nebo adici jiných struktur, které interferují s interakcí erytropoetinu s libovolným z jiných receptorů. Použití takových forem erytropoetinu jsou zcela předmětnou věcí vynálezu. Ve výhodném provedení vynálezu se poločas neerytropoietického erytropoetinu podle vynálezu snižuje přibližně o 90 % ve srovnání s poločasem přirozeného erytropoetinu.

Některé z těchto molekul budou přesto napodobovat působení samotného erytropoetinu v jiných tkáních nebo orgánech. Například 17-mér obsahující aminokyselinovou sekvenci 31 až 47 přirozeného erytropoetinu není aktivní v případě erythropoiezy, ale je zcela aktivní v případě neuronových buněk *in vitro* (popisuje se v publikaci Campana and O'Brien, 1998: Int. J. Mol. Med. 1: 235-41).

Dále deriváty molekul erytropoetinu nutné pro zde popsané použití může být vytvořeny mimo jiné například guanidinací, amidinací, karbamylací, trinitrofenylací, acetylací, sukcinací, nitrací nebo úpravou argininu, lyzinu, tyrozinu, tryptofanu nebo cysteinu nebo karboxylových skupin, jako je omezená proteolýza, odstranění aminoskupin a/nebo mutační substituce argininu, lyzinu, tyrozinu, tryptofanu nebo cysteinu pomocí postupů molekulární biologie, aby došlo k produkci erytropoetinů, které udržují adekvátní stupeň aktivit v případě specifických orgánů a tkání, nikoliv v jiných případech, jako například erytrocyty (popisuje se například v publikaci Satake et al., 1990, Biochim. Biophys. Acta 1038: 125-9). V jednom neomezujícím příkladu, jak se popisuje shora v textu, se upravují argininové zbytky erytropoetinu reakcí s glyoxalem, jako je fenylglyoxal (uskutečnilo se podle protokolu uvedeného v publikaci Takahashi, 1977, J. Biochem. 81: 395-402). Jak je možné vidět

dále v textu, taková molekula erythropoetinu si zcela uchovává svůj neurotrofický účinek. Takové molekuly erythropoetinu je možné zcela zahrnout do vynálezu pro své využití a zde popsané prostředky.

Popisují se syntetické a rekombinantní molekuly, jako je mozkový erythropoetin a renální erythropoetin, Rekombinantní savčí formy erythropoetinu, stejně jako přirozeně se vyskytující formy erythropoetinu, formy erythropoetinu získané z nádoru a rekombinantní izoformy, jako jsou rekombinantně exprimované molekuly a ty připravené homologní rekombinací. Vynález dále zahrnuje molekuly zahrnující peptidy, které se váží na erythropoetinový receptor, stejně jako rekombinantní konstrukce nebo jiné molekuly, které mají část nebo všechny strukturální a/nebo biologické vlastnosti erythropoetinu zahrnující fragmenty a multiméry erythropoetinu nebo jeho fragmenty. Erythropoetin zahrnuje molekuly se změněnými aktivitami navázání na receptor erythropoetinu, s výhodou se zvýšenou receptorovou afinitou, zvláště co se týká zesílení transportu přes endoteliální buněčné bariéry. Vynález popisuje muteiny zahrnující molekuly, které vykazují navýšený nebo snížený počet glykosylačních míst. Jak se popisuje shora v textu termíny „erythropoetiny“ a „napodobeniny“ je možné zaměnit, co se týká molekul příbuzných erythropoetinu, které chrání nebo posilují buňky odpovídající na erythropoetin, stejně jako v případě molekul, které jsou schopny procházet endoteliální buněčnou bariérou.

Dále se popisují molekuly produkované transgenními zvířaty. Je nutné poznamenat, že zde popsané molekuly se nemusí strukturou podobat erythropoetinu nebo libovolným jiným způsobem s výjimkou schopnosti reagovat s receptorem erythropoetinu nebo upravovat aktivitu receptoru erythropoetinu

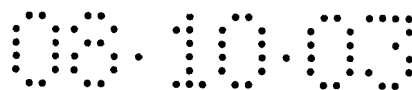


nebo aktivovat signalizační kaskádu erythropoetinu, jak se popisuje dále v textu.

Forma erythropoetinu použitelná v praxi podle vynálezu zahrnuje erythropoetinové muteiny, jako jsou ty se změněnými aminokyselinami na karboxylovém konci, popsaném v patentovém dokumentu č. 5 457 089 a č. 4 835 260, asialoerythropoetinové a erythropoetinové formy s různým množstvím zbytků kyseliny sialové v jedné molekule, jak se popisuje v patentovém dokumentu č. 5 856 298, polypeptidy popsané v patentovém dokumentu 4 703 008, agonisté popsané v patentovém dokumentu č. 5 767 078, peptidy, které se váží na receptor erythropoetinu, jak se popisuje v patentovém dokumentu č. 5 773 569 a 5 830 851, napodobeniny malých molekul, které aktivují erythropoetinový receptor, jak se popisuje v patentovém dokumentu č. 5 835 382 a analogy erythropoetinu popsané v dokumentech WO 9505465, WO 9718318 a WO 981 8926. Všechny dříve uvedené citace jsou začleněny v takovém rozsahu, že popisují různé alternativní formy nebo postupy přípravy takových forem erythropoiteinů podle vynálezu.

Erythropoetin je dostupný například jako přípravek s obchodní známkou PROCRIIT u firmy Ertho Biotech Inc., Raritan, NJ, a EPOGEN, dostupný u firmy Amgen Inc., Thousand Oaks, CA.

Aktivita (v jednotkách) erythropoetinu a molekul podobných erythropoetinu se tradičně definuje na základě účinnosti při stimulaci produkce červených buněk v modelech hlodavců (jak se odvozuje od mezinárodních standardů erythropoetinu). Jedna jednotka (U) běžného erythropoetinu (molekulová hmotnost je přibližně 34 000) je přibližně 8 ng proteinu (1 mg proteinu je přibližně 125 000 U). V případě, že účinek erythropoiezy souvisí s požadovanými aktivitami nemusí nezbytně být



detekovatelnou vlastností jistých erytropoetinů podle vynálezu, pak definice aktivity založené na erytropoietické aktivitě není vhodná. Jak se zde používá jednotková aktivita erytropoetinu molekul podobných erytropoetinu se definuje jako množství proteinu nutného k vyvolání stejné aktivity v neuronových nebo jiných buněčných systémech, které odpovídají na erytropoetin, jak se vyvolalo ve stejném systému mezinárodním standardem erytropoetinu podle WHO. Pro odborníka je po instruktaži jednoduché definovat jednotky neerytropoietického erytropoetinu nebo příbuzné molekuly.

Mimo shora v textu popsané úpravy erytropoetinu, které je možné použít podle vynálezu se popisují další různé erytropoetiny podle vynálezu.

Erytropoetin podle vynálezu nemusí vykazovat žádné části sialové kyseliny, jako je asialoerytropoetin. Erytropoetin podle vynálezu je lidský asialoerytropoetin. V jiných provedeních podle vynálezu erytropoetinem podle vynálezu může obsahovat alespoň 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 nebo 13 zbytků kyseliny sialové. Za použití sialidáz se může připravit erytropoetin bez skupin kyseliny sialové, jak se popisuje v balíčku přípravku Sialydáza A od firmy ProZyme Inc., San Leandro, Kalifornie. V typickém případě se přípravek PROZYME® GLYCORO® čistotě odpovídající sekvenování SIALYDASE™ (N-acetylneuraminátglykohydroláza, EC 3.2.1.18) se používá ke štěpení všech neredukčních terminálních zbytků kyseliny sialové z komplexních scharidů a glykoproteinů, jako je erytropoetin. Tak se budou štěpit větvené sialové kyseliny (spojené s vnitřním zbytkem). Sialidáza A se izolovala z klonu *Arthrobacter ureafaciens*.

Erytropoetin může mít alespoň malý počet N-spojených sacharidů. Aby došlo k odstranění N-spojených sacharidů,



erythropoetin se může ošetřit hydrazinem v souladu s metodami popsány v publikaci Hermentin et al., 1996, Glycobiology 6(2): 217-30. Jak se poznamenalo shora v textu, erythropoetin vykazuje tři N-spojené sacharidové části. Vynález zahrnuje tyto erythropoetiny se dvěma, jedním nebo žádným N-spojeným sacharidem.

Erythropoetin podle vynálezu může vykazovat alespoň omezený obsah sacharidů, což je způsobeno v důsledku ošetření přirozeným erythropoetinem s alespoň jednou glykozidázou. Může se například použít postup podle publikace Chen and Evangelista, 1998, Electrophoresis 19(15):2639-44. Dále odstranění O-spojeného sacharidu se může dosáhnout následujícími metodami popsány v publikaci Hokke et al., 1995, Eur. J. Biochem. 228(3):981-1008.

Sacharidová část molekuly erythropoetinu může mít alespoň glykosylační patern, který neodpovídá savci, v důsledku exprese rekombinantního erythropoetinu v buňkách, které nejsou savčí. Erythropoetiny se s výhodou exprimují v hmyzích nebo rostlinných buňkách. Exprese erythropoetinu ve hmyzích buňkách za použití bakulovirového expresivního systému se může provést v souladu s publikací Quelle et al., 1989, Blood 74(2):652-657. Jiná metoda se popisuje v patentovém dokumentu č. 5 637 477. Exprese v rostlinném systému může být provedena v souladu s metodou popsanou v publikaci Matsumoto et al., 1993, Biosci. Biotech. Biochem. 57(8):1249-1252. V jiném případě exprese v bakteriích povede ke vzniku neglykosylovaných forem erythropoetinu. Tyto jsou pouze příklady metod použitelných při produkci erythropoetinu podle vynálezu a nejsou žádným způsobem limitující.

Erythropoetin podle vynálezu může mít alespoň jeden nebo více oxidovaných sacharidů, které se mohou chemicky redukovat.

Například erythropoetin může být erythropoetin oxidovaný jodistanem. Takto upravený erythropoetin se může chemicky redukovat solí hydroboritanu, jako je hydroboritan sodný nebo kyanohydroboritan sodný. Oxidace erythropoetinu jodistanem se může například provést způsoby popsány v publikaci Linsley et al., 1994, Anal. Biochem. 219(2):207-17. Chemická redukce následující oxidací jodistanem se může provést metodami popsány v publikaci Tonelli and Meints, 1978, J. Supramol. Struct. 8(1):67-78.

Erythropoetin pro shora v textu popsané použití může vykazovat alespoň jeden nebo více upravených argininových zbytků. Upravený erythropoetin může například obsahovat R-glyoxalovou část na jednom nebo více argininových zbytcích, kde symbol R může být aryl, heteroaryl, nižší alkyl, nižší alkoxy skupina nebo cykloalkylová skupina nebo alfa-deoxyglycitolylová skupina. Termín nižší „alkyl“ znamená přímý nebo větvený řetězec satureovaný alifatickou uhlovodíkovou skupinou, která s výhodou obsahuje 1 až 6 atomů uhlíku. Reprezentanti takových skupin jsou metyl, etyl, izopropyl, izobutyl, butyl, pentyl, hexyl a podobně. Termín „alkoxy skupina“ znamená nižší alkylovou skupinu, jak se definuje shora v textu, zachycenou na zbytku molekuly kyslíkem. Příklady alkoxy skupin zahrnují metoxy skupinu, etoxy skupinu, propoxy skupinu, izopropoxy skupinu a podobně. Termín „cykloalkyl“ znamená cyklické alkylové skupiny se třemi až přibližně osmi uhlíky, které zahrnují například cyklopropyl, cyklobutyl, cyklohexyl a podobně. Termín aryl znamená fenylovou nebo naftylovou skupinu. Termín heteroaryl znamená heterocyklické skupiny obsahující 4 až 10 kruhových členů a 1 až 3 heteroatomy vybrané ze skupiny obsahující kyslík, dusík a síru. Příklady zahrnují, ale nejsou omezeny na izoxazolyl, fenylizoxazolyl, furyl, pyrimidinyl, chinolyl, tetrahydrochynolyl, pyridyl, imidazolyl, pyrrolidinyl, 1,2,4-

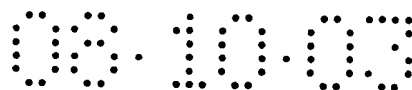
triazoylyl, thiazolylyl, thienyl a podobně. Skupina R se může nahradit, jako například 4-trihydroxybutylová skupina 3-deoxyglukosonu. Typickými příklady R-glyoxálních sloučenin jsou glyoxal, metylglyoxal, 3-deoxyglukoson a fenylglyoxal. Výhodné R-glyoxalové sloučeniny jsou metylglyoxal nebo fenylglyoxal. Příklady metod za použití fenylglyoxalu pro takové úpravy se mohou popisovat v publikaci Werber et al., 1975, *Isr. J. Med. Sci.* 11(11):1169-70.

V dalším příkladu se může upravit alespoň jeden argininový zbytek reakcí s vicinálním diketonem, jako je 2,3-butandion nebo cyklohexandion, s výhodou v borátovém pufru s hodnotou pH 8 až 9 s přibližnou koncentrací 50 mM. Postup pro pozdější úpravy s 2,3-butandionem se může provést v souladu s publikací Riordan, 1973, *Biochemistry* 12(20): 3915-3923 a úpravy pomocí cyklohexanonu podle publikace Patthy et al., 1975, *J. Biol. Chem.* 250(2):565-9.

Erytropoetin podle vynálezu může obsahovat alespoň jednu nebo více upravených lyzinových zbytků nebo úpravu N-terminální aminokyselinové skupiny erytropoetinové molekuly, jako jsou úpravy, které vznikají z reakce lyzinového zbytku s činidlem, který upravuje aminoskupinu. V jiném provedení vynálezu lyzinové zbytky se mohou upravit reakcí s glyoxalovými deriváty, jako je reakce s glyoxalem, metylglyoxalem a 3-deoxyglukosonem za vzniku alfa-karboxyalkylových derivátů. Příklady jsou reakce s glyoxalem za vzniku karboxymetyllyzinem, jak se popisuje v publikaci Glomb and Monnier, 1995, *J. Biol. Chem.* 270(17):10017-26 nebo s metylglyoxalem za vzniku (1-karboxyetyl)lyzinu, jak se popisuje v publikaci Degenhardt et al., 1998, *Cell. Mol. Biol. (Noisy-le-grand)* 44(7):1139-45. Upravený lyzinový zbytek se může dále biochemicky redukovat. Například erytropoetin se může upravit biotinem prostřednictvím lyzinové skupiny, jako

v souladu s metodou popsanou v příkladu 5, kde N-hydroxysukcinimidester kyseliny D-biotinyl- $\epsilon$ -aminokapronové reagoval s erythropoetinem. Pak následuje odstranění nezreagovaného biotinu gelovou filtrací na koloně Cantricon 10, jak se popisuje v publikaci Wojchowski and Caslake, 1989, Blood 74(3):952-8. V tomto článku se popisuje použití tří různých metod erythropoetinu upraveného biotinem, přičemž libovolná z nich se může použít pro přípravu erythropoetinu podle vynálezu. Biotin je možné přidat k (1) částem sialové kyseliny, (2) karboxylátovým skupinám nebo (3) aminoskupinám.

V jiném provedení vynálezu lyzin může reagovat s aldehydem nebo redukujícím cukrem za vzniku aminu, který může být stabilizován redukcí jako například s kyanohydroboritanem za vzniku N-alkyllyzinu, jako je glucytolyllyzin, nebo který v případě redukujících cukrů může být stabilizován opětovným uspořádáním podle Amadori nebo Heynse za vzniku alfa-deoxy-alfa-aminocukru, jako je alfa-deoxy-alfa-fruktosyllyzin. Příprava proteinu upraveného fruktosyllyzinem inkubací s 0,5 M glukózou v pufru fosforečnanu sodného s hodnotou pH 7,4 po dobu 60 dní, se popisuje v publikaci Makita et al., 1992, J. Biol. Chem. 267:5133-5138. V jiném příkladu lyzinová skupina se může upravit karbamylem, jako například reakcí s kyanátovým iontem nebo alkylkarbamylem nebo arylkarbamylem nebo může být thiokarbamylován s alkylizokyanátem nebo arylizokyanátem nebo izothiokyanátem nebo může být acylován reakcí s reaktivním alkylem nebo derivátem arylkarboxylové kyseliny, jako reakcí s anhydridem kyseliny octové nebo sukcinanhydridem nebo anhydridem kyseliny ftalové. Příklady úpravy lyzinových skupin pomocí 4-sulfofenyllizothiokyanátu nebo anhydridem kyseliny octové se popisují v publikaci Gao et al., 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91(25):12027-30. Lyzinové skupiny mohou také být trinitrofenyl upravený reakcí s trinitrobenzensulfonovou



kyselinou nebo s výhodou s jejími solemi. Takové metody se popisují dále v textu v příkladu 5.

Alespoň tyrozinový zbytek erytropoetinu může být upravený v poloze aromatického kruh elektrofilním činidlem, jako je nitrace nebo jodace. Erytropoetin může reagovat s tetranitrometanem (Nestler et al., 1985, J. Biol. Chem. 260(12):7316-21 nebo může být jodován, jak se popisuje v příkladu 5.

Například zbytky kyseliny asparagové nebo glutamové v erytropoetinu se mohou upravit například reakcí s karbodiimidem a následovanou reakcí s aminem, jako například s glycinamidem. Příklady takové úpravy se popisují v příkladu 5.

V jiném příkladu tryptofanový zbytek erytropoetinu se může upravit například reakcí s n-bromosukcinimidem nebo n-chlorosukcinimidem způsobem, který se popisuje v publikaci Josse et al., Chem. Biol. Interact 199 May 14, 119-120.

V jiném příkladu se molekula erytropoetin může připravit odstraněním alespoň jedné aminokyseliny, což se může dosáhnout reakcí s ninhydridem, po níž následuje redukce následné karbonylové skupiny reakcí s hydroboritanem.

V dalším příkladu se erytropoetin připravuje tak, aby měl otevřenou alespoň jednu z cysteinových vazeb v molekule erytropoetinu reakcí s redukčním činidlem, jako je dithiothreitol, pak následuje reakce následných sulfylhydrlů s amidem kyseliny jódoctové nebo jiného elektrofilu, aby se předešlo opětovnému vytvoření disulfidových můstků.

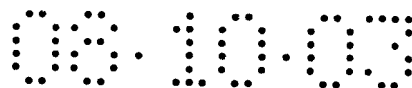


Erytropoetin se připravuje tak, že má alespoň jednu substituci v libovolném počtu aminokyselin, jako je leucin s alespoň jedním lyzinem, argininem, tryptofanem, tyrozinem nebo cysteinem, která se provede použitím metod molekulární biologie.

Upravený erytropoetin se může připravit vystavením erytropoetinu limitované chemické proteolýze, která je cílena na specifické zbytky například dochází k štěpení po tryptofanových zbytcích. Vynález zahrnuje také erytropoetinové fragmenty.

Jak se popisuje shora v textu, erytropoetin použitelný pro zde popsané účely může mít alespoň jednu ze shora uvedených modifikací, ale může také mít více jak jednu ze shora uvedených úprav. Upravený erytropoetin může existovat s jednou úpravou v sacharidové části molekuly a s jednou úpravou v aminokyselinové části. Upraveným erytropoetinem může být asialoerytropoetin, jehož lyzinové zbytky jsou upravené biotinem nebo karbamylem.

Vynález popisuje uvedené různé molekuly erytropoetinu a farmaceutické prostředky, které je obsahují. Takové erytropoetinové molekuly zahrnují ale nejsou omezeny na asialoerytropoetin, N-deglykosylovaný erytropoetin, O-deglykosylovaný erytropoetin, erytropoetin s redukováným obsahem sacharidů, erytropoetin se změněným glykosylačním paternem, erytropoetin se sacharidy, které jsou oxidovány a pak redukovány, erytropoetin upravený arylglyoxalem, erytropoetin upravený alkylglyoxalem, erytropoetin upravený 2,3-butandionem, erytropoetin upravený cyklohexandionem, erytropoetin upravený biotinem, N-alkyllysylerytropoetin, glucitolyllyzinerytropoetin, alfa-deoxy-alfa-fruktosyllyzinerytropoetin, erytropoetin upravený karbamylem, acetylovaný



erytropoetin, sukcinylovaný erytropoetin, alfa-karboxyalkylerytropoetin, nitrátovaný erytropoetin, jodovaný erytropoetin. Výhodné jsou shora upravené formy založené na lidském erytropoetinu.

Jisté shora uvedené erytropoetiny jsou nové a vynález popisuje takové sloučeniny stejně jako farmaceutické prostředky, které je obsahují. Takové nové erytropoetiny zahrnují erytropoetin oxidovaný jodistanem, glucitolylyllyzinerytropoetin, fruktosyllyzinerytropoetin, 3-deoxyglukosonerytropoetin a asialoerytropoetin upravený karbamylem.

K produkci erytropoetinů a molekul příbuzných erytropoetinu se mohou použít vektorové systémy, které se exprimují v hostiteli. Takové systémy exprimující se v hostiteli reprezentují nástroje, kterými se mohou připravovat erytropoetiny podle vynálezu a mohou se následně čistit. Také reprezentují buňky, které mohou, když se transformují nebo transfekují s vhodnými nukleotidovými kódujícími sekvencemi, produkovat upravený erytropoetinový genový produkt *in situ*. Tyto zahrnují, ale nejsou omezeny na bakteriální, hmyzí, rostlinný, savčí hostitelské systémy, přičemž poslední jmenovaný zahrnuje lidské hostitelské systémy. Hostitelské systémy jsou například hmyzí buněčné systémy infikované rekombinantními virovými expresivními vektory (například bakulovirus) obsahující sekvence kódující upravený erytropoetinový produkt, rostlinné buněčné systémy infikované rekombinantními virovými expresivními vektory (například kvěťákový mozaikový virus, CaMV, tabákový mozaikový virus, TMV) nebo transformovaný s rekombinantními plazmidovými expresivními vektory (například plazmid Ti) obsahujícími sekvence kódující molekulu příbuznou erytropoetinu, nebo savčí buněčné systémy zahrnující lidské buněčné systémy (například

HT1080, COS, CHO, BHK, 293, 3T3) nesoucí rekombinantní expresivní konstrukce obsahující promotory získané z genomu savčích buněk (například metalothionenový promotor) nebo ze savčích virů (například adenovirový pozdní protmotor, 7.5K promotor z viru vakcínie).

Může se vybrat hostitelský buněčný kmen, který upravuje expresi začleněných sekvencí nebo upravuje a zpracovává genový produkt do požadované specifické podoby. Takové úpravy (například glykosylace) a zpracování (například štěpení) proteinových produktů mohou být důležité pro funkci proteinu. Různé hostitelské buňky mají charakteristické a specifické mechanismy pro posttranslační zpracování a úpravu proteinů a genových produktů. Aby se potvrdily správné úpravy a zpracování exprimovaného cizorodého proteinu, mohou se vybrat vhodné buněčné linie nebo hostitelské systémy. Nakonec se mohou použít eukaryontní hostitelské buňky, které vykazují buněčný mechanismus pro správné zpracování primárního transkriptu, glykosylace a fosforylace genového produktu. Takové savčí hostitelské buňky zahrnující lidské hostitelské buňky obsahují HT1080, CHO, VERO, BHK, HeLa, COS, MDCK, 293, 3T3 a WI38.

V případě dlouhotrvající produkce rekombinantních proteinů s vysokým výtěžkem je výhodná stabilní exprese. Například se mohou vytvořit buněčné linie, které stabilně exprimují molekulu genového produktu příbuzného erythropoetinu. Spíše než použití expresivních vektorů, které obsahují virový počátek replikace, hostitelské buňky se mohou transformovat DNA řízenou vhodnými elementy řídícími expresi (například promotor, zesilovač, sekvence, terminátor transkripce, polyadenylační místa, atd.) a selekční marker. Po zavedení cizorodé DNA se takto upravené buňky nechají růst po dobu 1 až 2 dní v obohaceném kultivačním médiu a pak se kultivační

médium změni na selekční médium. Selekční marker vnáší do rekombinantního plazmidu rezistenci vůči selekčnímu činidlu a umožňuje buňkám stabilně začlenit plazmid do svého chromozomu a růst za vzniku foci, které se naopak mohou klonovat a mohou se rozšířit za vzniku buněčné linie. Tuto metodu je možné s výhodou použít k přípravě buněčných linií, které exprimují genový produkt molekuly příbuzné erythropoetinu. Takové připravené buněčné linie se mohou zvláště použít při testování a hodnocení sloučenin, které ovlivňují endogenní aktivitu genového produktu molekuly příbuzné erythropoetinu.

V jiném případě se exprese charakteristická pro endogenní erythropoetinový gen v buněčné linii nebo organismu může upravit začleněním regulačního elementu heterogenní DNA do genomu stabilní genové linie nebo do klonovaného organismu tak, že začleněný regulační element je operativně spojen s endogenním erythropoetinovým genem. Například endogenní erythropoetinový gen, který je v normálním případě „transkripčně tichý“, to znamená, že erythropoetinový gen není v normálním případě exprimován nebo jeho exprese je v buněčné linii pouze velice slabá, se může aktivovat začleněním regulačního elementu, který je schopný podporovat expresi normálně exprimovaného genového produktu v uvedené buněčné linii nebo mikroorganismu. V jiném případě transkripčně tichý endogenní erythropoetinový gen se může aktivovat začleněním promiskuitního regulačního elementu, který funguje ve všech buněčných typech.

Heterogenní regulační element se může začlenit do stabilní buněčné linie nebo do klonovaného mikroorganismu. Je například operativně spojen s endogenním erythropoetinovým genem za použití metod, jako je cílené homologní rekombinace, která je dobře známa v oboru a popisuje se například ve francouzském

patentovém dokumentu č. 2646438 (Pastérův Institut), v patentovém dokumentu USA č. 4 215 051 (Chappel) a č. 5 578 461 (Sherwin et al.), v mezinárodní patentové přihlášce č. PCT/US92/09627 (WO93/09222) (Selden et al.,) a v mezinárodní patentové přihlášce č. PCT/US90/06436 (WO91/06667) (Skoultchi et al.).

V jednom provedení vynálezu se může v savčí buňce produkovat molekula příbuzná erythropoetinu, která je deficitní v počtu sialových zbytků nebo neobsahuje žádné sialové zbytky. Tyto savčí buňky zahrnují lidskou buňku. Takové buňky se mohou upravit tak, že jsou deficitní, co se týká enzymů nebo jim chybí aktivity, které se přičítají kyselině sialové, to je aktivita  $\beta$ -galaktozid- $\alpha$ -2,3-sialyltransferázy ( $\alpha$ -2,3-sialyltransferáza) a  $\beta$ -galaktozid- $\alpha$ -2,6-sialyltransferázy ( $\alpha$ -2,6-sialyltransferáza). V jednom provedení podle vynálezu se používá savčí buňka, ve které je deletován buď gen  $\alpha$ -2,3-sialyltransferázy a/nebo  $\alpha$ -2,6-sialyltransferázy nebo oba geny. Takové delece je možné zkonstruovat za použití metod vyřazení genu, které jsou dobře známy v oboru. V jiném provedení vynálezu se používají jako hostitelské buňky při produkci rekombinantních molekul příbuzných erythropoetinu buňky vaječníků čínských křečků (CHO), které jsou deficitní v dihydrofolátové reduktáze (DHFR). Buňky CHO neexprimují enzym  $\alpha$ -2,6-sialyltransferázu a proto se kyselina sialová napodílí na 2,6-vazbě s N-spojenými oligosacharidy glykoproteinů produkovaných v těchto buňkách. Výsledkem je, že rekombinantní proteiny produkované v buňkách CHO neobsahují kyselinu sialovou v 2,6-vazbě s galaktózou (popisuje se v publikaci Sasaki et al (1987), Takeuchi et al., Mutsaers et al. Eur. J. Biochem. 156, 651 (1986), Takeuchi et al., J. Chromatogr. 400, 207 (1987)). V jednom provedení vynálezu se za účelem produkce asialoerythropoetinu v hostitelské buňce deletoval v buňce CHO gen kódující  $\alpha$ -2,3-sialyltransferázu.

Takové buňky CHO, které neobsahují  $\alpha$ -2,3-sialytransferázu, zcela postrádají aktivitu sialytransferázy a je možné je použít při rekombinantní expresi a produkci asialoerytropoetinu.

V jednom provedení vynálezu se asialoglykoproteiny mohou produkovat interferencí s transportem kyseliny sialové do Golgiho aparátu (popisuje se například v publikaci Eckhardt et al., 1998, J. Biol. Chem. 273:20189-95). Za použití metod, které jsou dobře známy v oboru (popisuje se například v publikaci Oelmann et al., 2001, J. Biol. Chem. 276:26291-300), je možné provést mutagenezi transportéru kyseliny CMP-sialové nukleotidového cukru za vzniku mutantů buněk vaječníků čínských křečků. Tyto buňky pak nezačleňují zbytky kyseliny sialové do glykoproteinů, jako erytropoetin a produkují pouze asialoerytropoetin. Transfekované savčí buňky produkující erytropoetin také produkují cytosolickou sialidázu, která v případě, že uniká do kultivačního média degraduje s vysokou účinností sialoerytropoetin (popisuje se například v publikaci Gramer et al., 1995 Biotechnology 13: 692-698). Za použití metod dobře známých v oboru (například informace uvedené v publikaci Farrari et al., 1994, Glycobiology 4: 367-373), se mohou buněčné linie transfekovat, mutovat nebo jinak upravovat, aby došlo ke konstitutivní produkci sialidázy. Tímto způsobem je možné během výroby asialoerytropoetinu produkovat asialoerytropoetin.

Při praktickém použití podle vynálezu se farmaceutický prostředek podle vynálezu popsany shora v textu obsahující erytropoetin může aplikovat savci způsobem, který poskytuje dostatečné množství erytropoetinu ve vaskulárním systému, což umožňuje translokaci skrz endoteliální buněčnou bariéru a výhodné účinky působení na buňky odpovídající na erytropoetin. Když se používají pro účely perfúze tkáně nebo orgánů,

požadují se stejné orgány. V případě, kde se používá erytropoetin ex-vivo, pak erytropoetin může být libovolná forma erytropoetinu, jako jsou shora v textu popsané erytropoetiny zahrnující přirozené erytropoetiny s lidským erytropoetinem. V případě, že buňky nebo tkáň nejsou vaskularizovány a/nebo aplikace se provádí máčením buněk nebo tkáň v prostředí podle vynálezu, pak farmaceutický prostředek poskytuje účinné množství erytropoetinu výhodné pro buňky odpovídající na erytropoetin. Endoteliální buněčné bariéry, kterými erytropoetin může procházet zahrnují pevná spojení, perforovaná spojení, fenestrovaná spojení a libovolné jiné typy endoteliálních bariér přítomných u savce. Výhodnou bariérou je endoteliální buněčné pevné spojení.

Shora popsané erytropoetiny jsou v obecném případě použitelné pro terapeutickou nebo profylaktickou léčbu lidského onemocnění centrálního nervového systému nebo periferního nervového systému, který vykazuje primárně neurologické nebo psychiatrické symptomy, oční onemocnění, kardiovaskulární onemocnění, kardiopulmonární onemocnění, respirační onemocnění, ledvin, močového ústrojí a poruchy reprodukce, gastrointestinální onemocnění a endokrinologické a metabolické abnormality. Takové stavy a onemocnění zahrnují hypoxické stavy, které negativně ovlivňují dráždivé tkáň, jako dráždivé tkáň v tkáni centrálního nervového systému, v tkáni periferního nervového systému nebo kardiální tkáň nebo retinální tkáň, jako například mozek, oči, srdce nebo sítnice/oči. Vynález je proto možné použít při léčbě nebo prevenci poškození dráždivé tkáň, což je výsledkem hypoxických stavů při různých stavech a okolnostech. Neomezující příklady takových stavů a okolností jsou uvedeny v tabulce dále v textu.

V příkladu ochrany před patologickým stavem neuronové tkáně léčitelné v souladu s vynálezem, takové patologické stavy zahrnují ty, které vznikají omezenou oxydací neuronové tkáně. Libovolný stav, který omezuje dostupnost kyslíku do neuronové tkáně je výsledkem stresu, poškození a konečně odumírání neuronových buněk. Tyto stavy je možné léčit metodami podle vynálezu. Hypoxie a/nebo ischemie zahrnují mrtvici, vaskulární okluzi, prenatální nebo postnatální nedostupnost kyslíku, udušení, uškrcení, utopení, otravu oxidem uhelnatým, inhalaci kouře, trauma zahrnující chirurgický zákrok a radioterapii, asfyxii, epilepsii, hypoglykémii, chronické obstruktivní pulmonární onemocnění, emfyzém, syndrom stavu respirační tísně u dospělých, hypotenzivní šok, krizi srpkovitých buněk, srdeční zástava, arytmie, narkóza dusíkem a neurologické deficity způsobené bapyssem srdce-plíce.

V jednom provedení se může například specifické prostředky EPO aplikovat, aby se předešlo poranění nebo poškození tkáně, ke kterému může dojít na základě chirurgického zásahu, jako například resekce nádoru nebo reparace aneuryzmatu. Další patologické stavy způsobené hypoglykemií, které mohou být léčeny zde popsanými metodami, zahrnují předávkování inzulinem také introgenní hyperinzulinémie, insulinom, nedostatek růstového hormonu, hypokortisolizmus, předávkování léků a jisté nádory.

Jiné patologické stavy, které jsou výsledkem poškození dráždivé neuronové tkáně zahrnují záchvaty, jako je epylepsie, křeče nebo chronické záchvaty. Jiná léčitelné stavy a onemocnění zahrnují mrtvici, roztroušenou sklerózu, vysoký tlak, srdeční zástavu, Alzheimerovu nemoc, Parkinsonovu nemoc, mozkovou obrnu, poškození míchy, demence spojená s AIDS, ztráta kognitivní funkce spojená se stářím, amyotrofni



laterální skleróza, záchvaty, alkoholizmus, retinální ischemie, poškození očního nervu způsobené zeleným zákalem a poklesem počtu neuronů.

Specifické prostředky a metody podle vynálezu se mohou použít při léčbě stavů a poškození retinální tkáně. Takové poruchy zahrnují, ale nejsou omezeny na retinální ischemii, degeneraci makuly, ablace sítnice, retinitis pigmentosa, arteriosklerotickou retinopatii, hypertenzní retinopatii, zablokování retinální artérie, zablokování retinální cévy, vysoký tlak a diabetická retinopatie.

V jiném provedení vynálezu principy metod podle vynálezu se mohou použít k ochraně nebo k léčbě poranění, které je výsledkem poškození dráždivé tkáně radiací. Další využití metod podle vynálezu je při léčbě otravy neurotoxinem, jako je otrava korýši, neurolatyrizmus a Guamova nemoc, amyotrofni laterální skleróza a Parkinsonova nemoc.

Vynález také popisuje způsobe zesílení funkce dráždivé tkáně u savců periferní aplikací erytropoetinu, jak se popisuje shora v textu. Různá onemocnění a stavy jsou léčitelné použitím uvedené metody a dále tuto metodu je možné použít při podpoře kognitivní funkce, aniž dochází k libovolnému onemocnění nebo stavům. Tato využití podle vynálezu se popisují dále v textu a zahrnují podporu učení a tréninku u lidí a ostatních savců.

Stavy a onemocnění, které je možné léčit metodami podle vynálezu, určenými pro centrální nervový systém zahrnují, ale nejsou omezeny na náladovost, stavy úzkosti, deprese, autizmus, poruchy pozornosti spojené s hyperaktivitou a poruchy kognitivních funkcí. Při léčbě těchto stavů se využívá posílení neuronové funkce. Jiné poruchy léčitelné v souladu

s vynálezem zahrnují poruchy spánku, krátkodobé zastavení dýchání při spánku, kinetózy, subarachnoidální a aneurizmální krvácení, hypotenzivní šok, otřes mozku, septický šok, anafylaktický šok a následné stav po prodělání různých encefalitid a meningitid, například cerebritida spojená s onemocněním konektivní tkáně, jako je lupénka. Jiná použití zahrnují prevenci nebo ochranu před otravou neurotoxinů, jako je otrava korýši, neurolatyrimus a Guamova nemoc, amyotrofni laterální skleróza, Parkinsonova nemoc, postoperační léčba embolie a ischemického poranění, ozáření celého mozku, krize srpkovitých buněk a křeče.

Další skupina stavů, které je možné léčit metodami podle vynálezu zahrnují mitochondriální poruchy a to buď dědičné nebo získané, které způsobují různá neurologická onemocnění, pro které je typické neuronové poranění a úmrtí. Například Leighova nemoc (subakutní nekrotizující encefalopatie) je charakterizována postupující ztrátou vidění a encefalopatií v důsledku ztráty neuronů a myopatií. V těchto případech defektní mitochondriální metabolismus selhává při poskytnutí dostatečně energeticky bohatého substrátu pro metabolismus dráždivých buněk. Modulator aktivity receptoru erythropoetinu optimalizuje nedostatečnou funkci při různých mitochondriálních onemocnění. Jak se zmiňuje shora v textu, hypoxické stavy negativně ovlivňují dráždivé tkáně. Dráždivé tkáně zahrnují, ale nejsou omezeny na tkáň centrálního nervového systému, tkáň periferního nervového systému a srdeční tkáň. Vedle stavů popsaných shora v textu metody podle vynálezu je možné použít při léčbě stavů způsobených inhalací jedů, jako oxidu uhelnatého a kouře, vážného astma, dušnost, šoky a utopení. Další stavy, které vedou k vyvolání hypoxických stavů nebo jinými způsoby vyvolávají porušení dráždivé tkáně zahrnují hypoglykemii, která se může objevit

při nesprávném dávkování inzulínu nebo při existenci nádorů, které produkují inzulín (inzulinom).

Různé neuropsychologické poruchy, které pravděpodobně vznikají na základě poškození dráždivé tkáně, je možné léčit uvedenými metodami. Chronické poruchy, které zahrnují neuronové poškození, a jejichž léčba je popsána vynálezem, zahrnují poruchy, které se vztahují k centrálnímu nervovému systému a/nebo periférnímu nervovému systému zahrnující ztrátu kognitivní funkce spojenou s věkem a senilní demence, chronické záchvatové poruchy, Alzheimerovu nemoc, Parkinsonovu nemoc, demenci, ztrátu paměti, amyotrofní laterální sklerózu, roztroušenou sklerózu, tuberózní sklerózu, Wilsonovu chorobu, mozkovou a postupující supranukleární obrnu, Guamovu nemoc, Lewyovu demenci, prionové onemocnění, jako je spongiformní encefalopatie, například Creutzfeldt-Jakobova nemoc, Huntingtonova nemoc, myotonickou dystrofie, Freidrichovu ataxii a jiné ataxie, jako je Gilles de la Touretteův syndrom, záchvatové poruchy, jako je epilepsie a chronické záchvatové poruchy, mrtvice, poškození moku a míchy, AIDS demence, alkoholismus, autizmus, retinální ischemií, glaukom, poruchy autonomních funkcí, jako je vysoký tlak, poruchy spánku a neuropsychiatrické poruchy, které zahrnují, ale nejsou omezeny na schizofrenii, schizoafektivní poruchy, poruchy pozornosti, mrzutost, deprese, mánie, nutkavé poruchy, poruchy spojené s použitím psychoaktivních látek, stavy úzkosti, panické stavy, jako unipolární a bipolární afektivní poruchy. Další neuropsychiatrické a neurodegenerativní poruchy zahrnují například ty uvedené v současném vydání publikace „American Psychiatric Association's Diagnostic and Statistical Manual o Mental Disorders (DSM).

V jednom provedení vynálezu rekombinantní molekuly chimerického toxinu obsahující erythropoetin se mohou použít

při terapeutickém zavedení toxinů k léčbě proliferativní poruchy, jako je zhoubné bujení nebo virová porucha, jako subakutní sklerotizující panencefalitida.

V následující tabulce se uvádějí další příklady stavů a nemocí, které je možné léčit shora v textu popsanými erytropoetiny

| Buňka, tkáň<br>nebo orgán | Porucha nebo<br>patologie | Stav nebo<br>onemocnění                                                                              | Typ                                                                 |
|---------------------------|---------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------|
| srdce                     | ischemie                  | onemocnění<br>koronární<br>arterie                                                                   | akutní,<br>chronická,<br>stabilní,<br>nestabilní                    |
|                           |                           | infarkt<br>myokardu                                                                                  | Dresskerův<br>syndrom                                               |
|                           |                           | angína                                                                                               |                                                                     |
|                           |                           | kongenitální<br>onemocnění<br>srdce                                                                  | valvulární<br>kardiomyopatie                                        |
|                           |                           | Prinzmetalova<br>angína                                                                              |                                                                     |
|                           |                           | ruptura<br>myokardu                                                                                  | aneurysmatická<br>septální<br>perforace                             |
|                           |                           | angiitida                                                                                            |                                                                     |
|                           | arytmie                   | tachyarytmie,<br>bradyarytmie,<br>supraventrikulá<br>rní,<br>ventrikulární,<br>abnormality<br>vedení | stabilní,<br>nestabilní,<br>zvýšená<br>citlivost nodus<br>caroticus |
|                           | městnavé                  | levá, pravá,                                                                                         | kardiomyopatie,                                                     |

|            |                                     |                                     |                                                                                                                                                                                                |
|------------|-------------------------------------|-------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|            | srdeční selhání                     | obě komory                          | jako je<br>idiopatická<br>rodinná,<br>infekční,<br>metabolická,<br>poruchy<br>ukládání, nedost<br>atečnost,<br>porucha<br>konektivní<br>tkáně,<br>infiltrace a<br>granulom,<br>neurovaskulární |
|            |                                     | myokarditida                        | autoimunní,<br>infekční,<br>idiopatická                                                                                                                                                        |
|            |                                     | cor pulmonale                       |                                                                                                                                                                                                |
|            | uzavřené a<br>otevřené<br>poškození |                                     |                                                                                                                                                                                                |
|            | toxiny                              | kokain                              |                                                                                                                                                                                                |
| vaskulární | vysoký tlak                         | primární,<br>sekundární             |                                                                                                                                                                                                |
|            | choroba<br>z dekomprese             |                                     |                                                                                                                                                                                                |
|            | fibromuskulární<br>hyperplázie      |                                     |                                                                                                                                                                                                |
|            | aneuryzmus                          | disekce,<br>ruptura,<br>zvětšení    |                                                                                                                                                                                                |
| plíce      | obstruktivní                        | astma,<br>chronická<br>bronchitida, |                                                                                                                                                                                                |

|          |                                            |                                                                                                |                                                      |
|----------|--------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------|
|          |                                            | emfyzém a<br>ucpání<br>dýchacích cest                                                          |                                                      |
|          | ischemické<br>plicní<br>onemocnění         | pulmonární<br>embolie,<br>pulmonární<br>trombóza,<br>tuková embolie                            |                                                      |
|          | onemocnění plic<br>způsobené<br>prostředím |                                                                                                |                                                      |
|          | ischemické<br>onemocnění plic              | pulmonární<br>embolie,<br>pulmonární<br>trombóza                                               |                                                      |
|          | intersticiální<br>onemocnění plic          | idiopatická<br>pulmonární<br>fibróza                                                           |                                                      |
|          | kongenitální                               | cystická<br>fibróza                                                                            |                                                      |
|          | cor pulmonale                              |                                                                                                |                                                      |
|          | trauma                                     |                                                                                                |                                                      |
|          | pneumonie a<br>pneumonitida                | infekční,<br>parazitická,<br>toxická,<br>traumatická,<br>aspirační, na<br>základě<br>popálenin |                                                      |
|          | sarkoidóza                                 |                                                                                                |                                                      |
| pankreas | endokrinní                                 | cukrovka typ I<br>a II                                                                         | selhání nebo<br>porucha buněk<br>beta,<br>diabetická |

|       |                        |                                                              |                                                                                                                                                                                                        |
|-------|------------------------|--------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|       |                        |                                                              | neuropatie                                                                                                                                                                                             |
|       |                        | selhání funkce<br>dalších<br>endokrinních<br>buněk pankreasu |                                                                                                                                                                                                        |
|       | exokrinní              | selhání<br>exokrinní<br>sekrece<br>pankreasu                 | pankreatitida                                                                                                                                                                                          |
| kosti | osteopenie             | primární,<br>sekundární                                      | hypogonadizmus,<br>imobilizace,<br>postmenopauza,<br>spojená<br>s věkem,<br>hyperparaty-<br>roidizmus,<br>hypertyreo-<br>dizmus,<br>nedostatek<br>vápníku,<br>hořčíku,<br>fosforu a/nebo<br>vitaminu D |
|       | osteomyelitida         |                                                              |                                                                                                                                                                                                        |
|       | avaskulární<br>nekróza |                                                              |                                                                                                                                                                                                        |
|       | trauma                 |                                                              |                                                                                                                                                                                                        |
|       | Pagetova nemoc         |                                                              |                                                                                                                                                                                                        |
| kůže  | alopecie               | lokalizovaná<br>celková                                      | primární,<br>sekundární,<br>plešatost<br>mužského typu                                                                                                                                                 |
|       | vitiligo               | lokalizované,<br>generalizované                              | primární,<br>sekundární                                                                                                                                                                                |

|                                      |                                                                                                                               |                                 |                         |
|--------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------|-------------------------|
|                                      | diabetická<br>ulcerace                                                                                                        | lokalizovaná,<br>generalizovaná | primární,<br>sekundární |
|                                      | onemocnění<br>periferních cév                                                                                                 |                                 |                         |
|                                      | popáleniny                                                                                                                    |                                 |                         |
| poruchy<br>autoimunity               | lupus<br>erythematodes,<br>Sjogren,<br>revmatická<br>artritida,<br>glomerulonefri-<br>tida, angiitida                         |                                 |                         |
|                                      | Langerhanova<br>histiocytóza                                                                                                  |                                 |                         |
| oči                                  | zánět zřetkového<br>nervu                                                                                                     |                                 |                         |
|                                      | tupé a<br>penetrační<br>poranění,<br>infekce,<br>sarkoid,<br>srpkovitá<br>anémie, ablace<br>sítnice,<br>dočasná<br>arteritida |                                 |                         |
| embryonální a<br>fetálním<br>poruchy | asfyxie                                                                                                                       |                                 |                         |
|                                      | ischemie                                                                                                                      |                                 |                         |
| CNS                                  | syndrom<br>chronické<br>únavy, akutní a<br>chronické                                                                          |                                 |                         |

|  |                                                                                                    |                                                                                                                   |  |
|--|----------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|
|  | hypoosmolární a hyperosmolární syndromy, AIDS, demence, usmrcení elektrickým proudem               |                                                                                                                   |  |
|  | encefalitida                                                                                       | vzteklina, herpes                                                                                                 |  |
|  | meningitida                                                                                        |                                                                                                                   |  |
|  | subdurální hematom                                                                                 |                                                                                                                   |  |
|  | závislost na nikotinu                                                                              |                                                                                                                   |  |
|  | zneužití léku a vynechání léku                                                                     | kokain, heroin, marihuana, LSD, PCP, aplikace více drog, extáze, opioidy, sedativa, hypnotika, amfetaminy, kofein |  |
|  | nutkavé porucha                                                                                    |                                                                                                                   |  |
|  | spinální stenóza, myelitis transversa, Guillian Barre, poškození, komprese kořene nervu, tumorální |                                                                                                                   |  |

|              |                                                    |                                                                 |                                                                                                                                             |
|--------------|----------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|              | komprese,<br>přehřátí                              |                                                                 |                                                                                                                                             |
| ENT          | tinitus,<br>Meunierův<br>syndrom, ztráta<br>sluchu |                                                                 |                                                                                                                                             |
|              | traumatické<br>poranění,<br>barotrauma             |                                                                 |                                                                                                                                             |
| ledviny      | selhání ledvin                                     | akutní,<br>chronické                                            | vaskulární/<br>ischemické,<br>intersticiální<br>onemocnění,<br>diabetické<br>ledvinové<br>onemocnění,<br>nefrotické<br>syndromy,<br>infekce |
|              | Henochova-<br>Schoenleinova<br>purpura             |                                                                 |                                                                                                                                             |
| příčné svaly | poruchy<br>autoimunity                             | myastenie<br>gravis,<br>dermatomyozitó-<br>za,<br>polymyozitida |                                                                                                                                             |
|              |                                                    | myopatie                                                        | dědičná<br>metabolická<br>endokrinní a<br>toxická                                                                                           |
|              | přehřátí                                           |                                                                 |                                                                                                                                             |
|              | zranění<br>rozdrčením                              |                                                                 |                                                                                                                                             |

|                         |                                             |                                                                                          |  |
|-------------------------|---------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------|--|
|                         | rabdomylóza                                 |                                                                                          |  |
|                         | mitochondriální<br>onemocnění               |                                                                                          |  |
|                         | infekce                                     | nekrotizující<br>fasciitida                                                              |  |
| sexuální<br>poruchy     | centrální a<br>periferní                    | impotence po<br>medikaci                                                                 |  |
| játra                   | hepatitida                                  | cirová,<br>bakteriální,<br>parazitická                                                   |  |
|                         | ischemické<br>onemocnění                    |                                                                                          |  |
|                         | cirhóza,<br>steatóza                        |                                                                                          |  |
|                         | infiltrativní/<br>metabolické<br>onemocnění |                                                                                          |  |
| gastrointestiná<br>lní  | ischemické<br>onemocnění<br>střev           |                                                                                          |  |
|                         | zánětlivé<br>onemocnění<br>střev            |                                                                                          |  |
|                         | nekrotizující<br>enterokolitida             |                                                                                          |  |
| transplantace<br>orgánu | ošetření dárce<br>a recipienta              |                                                                                          |  |
| rozmnožovací<br>systém  | neploďnost                                  | vaskulární,<br>autoimunitní,<br>abnormality<br>močového<br>traktu, poruchy<br>implantace |  |

|            |                                  |  |  |
|------------|----------------------------------|--|--|
| endokrinní | hyperfunkce a<br>hypofunkce žláz |  |  |
|------------|----------------------------------|--|--|

Jak se zmiňuje shora v textu, tyto onemocnění, poruchy nebo stavy pouze ilustrují pozitivní účinky erytropoetinů podle vynálezu.

Vynález popisuje terapeutickou a profylaktickou léčbu následků mechanického poškození nebo lidských onemocnění. Výhodná je terapeutická nebo profylaktická léčba onemocnění, poruch nebo stavů CNS a/nebo periferního nervového systému. Popisuje se terapeutická a profylaktická léčba onemocnění, poruch nebo stavů, které vykazují psychiatrické složky. Vynález popisuje terapeutickou a profylaktickou léčbu onemocnění, poruch nebo stavů, které zahrnují, ale nejsou omezeny na oční, kardiovaskulární, kardiopulmonární, respirační, ledvinové, urinární, reprodukční, gastrointestinální, endokrinní nebo metabolické složky.

V jednom provedení vynálezu se může uvedený farmaceutický prostředek obsahující erytropoetin aplikovat systémově, aby ochránil nebo posílil cílové buňky, tkáň nebo orgán. Taková aplikace může probíhat parenterálně, inhalací, sliznicí, například orálně, nasálně, rektálně, intravaginálně, sublingválně, submukozálně nebo transdermálně. Aplikace se s výhodou provádí parenterálně, například intravenózně nebo intraperitoneální injekcí a také intraarteriálně, intramuskulárně a subkutánně.

V případě dalších způsobů aplikace, jako použití promývacího roztoku, zavedení injekcí přímo do orgánu nebo jiné způsoby lokální aplikace, se popisuje farmaceutický prostředek, jehož použitím se dosáhne stejné množství

erythropoetinu, jak se popisuje shora v textu. Výhodné množství je přibližně 15 pM až 30 nM.

Farmaceutické prostředky podle vynálezu mohou obsahovat terapeuticky účinné množství sloučeniny a farmaceuticky přijatelného nosiče. Ve specifickém provedení vynálezu termín „farmaceuticky přijatelný“ znamená ověřený agenturou federální nebo státní vlády nebo uvedená na seznamu Pharmacopoeia USA nebo jiných zemí, které je možné použít v případě zvířat a zvláště pak u lidí. Termín „nosič“ znamená ředidlo, adjuvans, excipient nebo nástroj, se kterým se terapeutické činidlo aplikuje. Takovými farmaceutickými nosiči mohou být sterilní tekutiny, jako jsou fyziologické roztoky ve vodě nebo v oleji, zahrnující ty připravené z ropy, ze zvířat nebo z rostlin a nebo jsou syntetického původu. Mezi ně patří arašidový olej, sojový olej, minerální olej, sezamový olej a podobně. Fyziologický roztok je výhodný nosič, pokud se farmaceutický prostředek aplikuje intravenózně. Jako kapalné nosiče se mohou také použít fyziologické roztoky, roztok dextransu ve vodě a roztok glycerolu, zvláště v případě roztoků, které je možné aplikovat injekcí. Vhodné farmaceutické pomocné látky zahrnují škrob, glukózu, laktózu, sacharózu, želatinu, slad, rýži, mouku, křidu, silikagel, stearat sodný, glycerolmonostearát, mastek, chlorid sodný, sušené netučné mléko, glycerol, propylen, glykol, vodu, etanol a podobně. Prostředky podle potřeby také mohou zahrnovat malé množství smáčecího nebo emulgifikačního činidla nebo činidla upravující pH pufru. Tyto prostředky se také mohou vyskytovat ve formě roztoků, suspenzí, emulzí, tablet, pilulek, kapsulí, prášku, přípravků pro nepřerušované uvolňování a podobně. Prostředek se může připravit ve formě čípků s tradičními plnidly a nosiči, jako jsou triglyceridy. Látky podle vynálezu se mohou připravit v neutrální formě nebo ve formě solí. Farmaceuticky přijatelné sole zahrnují ty vytvořené s volnými aminoskupinami, jako jsou

ty získané použitím kyseliny chlorovodíkové, fosforečné, octové, šťavelové, vinné, atd.. a ty vytvořené volnými karboxylovými skupinami, jako jsou ty získané použitím hydroxidu sodného, draselného, amonného, vápenatého, železitého, izopropylaminu, triethylaminu, 2-ethylaminoetanolu, histidinu, prokainu atd.. Příklady vhodných farmaceutických nosičů se popisují v publikaci „Remington's Pharmaceutical Sciences“, E.W. Martin. Takové prostředky budou obsahovat terapeuticky účinné množství látky, s výhodou v čisté formě, spolu s vhodným množstvím nosiče tak, aby se připravila vhodná forma pro správnou aplikaci pacientovi. Vzhledem k prostředku by se měl zvolit správný způsob aplikace.

Farmaceutické prostředky upravené pro orální aplikaci se mohou vyskytovat ve formě kapsulí nebo tablet, jako prášky nebo granule, jako roztoky, sirupy nebo suspenze (jako vodné nebo nevodné tekutiny), jako požitelné pěny a krémy nebo jako emulze. Tablety nebo tvrdé želatinové kapsule mohou obsahovat laktózu, škrob nebo jeho deriváty, stearat hořečnatý, sacharin, celulózu, uhličitan hořečnatý, kyselinu stearovou a její sole. Měkké želatinové kapsule mohou obsahovat rostlinné oleje, vosky, tuky, semipevné nebo kapalné polyoly atd.. Roztoky a sirupy mohou obsahovat vodu, polyoly a cukry.

Aktivní činidlo určené pro orální aplikaci může být potaženo nebo smícháno s materiálem, které odaluje rozpad a/nebo absorpci aktivního činidla v gastrointestinálním systému (může se například použít glycerylmonostearát nebo glyceryldistearát). Pak je možné dosáhnout postupného uvolňování po řadu hodin a jestliže je to nezbytné, aktivní činidlo se může chránit, aby nedošlo k jeho rozkladu v žaludku. Farmaceutické prostředky vhodné pro orální aplikaci se mohou vytvořit tak, aby umožnily uvolnění aktivního činidla

v určitém místě gastrointestinálního systému, což je způsobeno specifickým pH nebo enzymatickými podmínkami.

Farmaceutické prostředky upravené pro transdermální aplikaci se může vyskytovat ve formě náplastí, které udržují přímý kontakt s pokožkou recipienta po delší dobu. Farmaceutické prostředky upravené pro povrchovou aplikaci mohou být ve formě mastí, krémů, suspenzí, omývacích roztoků, prášků, roztoků, past, gelů, sprejů, aerosolů nebo olejů. V případě povrchové aplikace na kůži, ústa, oči nebo jinou externí tkáň je možné s výhodou použít povrchovou mast nebo krém. Při přípravě mastí se mohou aktivní složky použít spolu s mastovým základem, kterým může být parafín nebo může být mísitelný s vodou. V jiném případě se aktivní složka může připravit ve formě krému sází olej ve vodě nebo voda v oleji. Farmaceutické prostředky upravené pro povrchovou aplikaci do očí zahrnují oční kapky. V těchto prostředcích se může aktivní složka rozpustit nebo suspendovat ve vhodném nosiči, například ve vodném rozpouštědle. Farmaceutické prostředky upravené pro povrchovou aplikaci do úst zahrnují bonbony, pastilky a ústní vody.

Farmaceutické prostředky upravené pro nasální a pulmonární aplikaci mohou obsahovat pevné nosiče, jako je prášek (velikost částic je s výhodou 20 až 500 mikrónů). Prášek je možné aplikovat šňupáním, to znamená rychlým vdechnutím nosem z nádoby, která obsahuje prášek a drží se v blízkosti nosu. V jiném případě prostředky upravené pro nasální aplikaci mohou obsahovat kapalné nosiče, například nosní spreje nebo kapky. V jiném případě se může provést vdechnutí přímo do plic hlubokou inhalací nebo pomocí náústku zavedené do orofarynxu. Prostředky pro aplikaci inhalací se mohou aplikovat zvláště upraveným zařízením, které zahrnuje stlačené aerosoly, rozprašovače, insuflátory, které se mohou zkonstruovat tak,

aby poskytly předem stanovenou dávku aktivní složky. Ve výhodném provedení vynálezu se farmaceutické prostředky podle vynálezu aplikují do nosní dutiny přímo nebo se aplikují do plic prostřednictvím nosní dutiny nebo orofarynxu. Farmaceutické prostředky upravené pro rektální aplikaci se mohou připravit ve formě čípků nebo střevního nálevu. Farmaceutické prostředky upravené pro vaginální aplikaci se připravují ve formě pesarů, tamponů, krémů, gelů, past, pěn nebo sprejů.

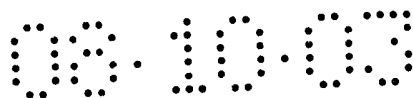
Farmaceutické prostředky upravené pro parenterální aplikaci zahrnují vodné a nevodné sterilní roztoky a suspenze, které je možné zavést injekcí a které mohou obsahovat antioxidanty, pufry, bakteriostatická činidla a rozpouštědla, která umožňují, aby prostředek byl v podstatě izotonický s krví určitého recipienta. Jiné složky, které takové prostředky mohou zahrnovat, jsou například voda, alkoholy, polyoly, glycerin a rostlinné oleje. Prostředky upravené pro parenterální aplikaci mohou být přítomny v nádobce obsahující jednotkovou dávku nebo více dávek, například v zatavených ampulích a zkumavkách a mohou se uchovávat v lyofylizovaném stavu. Pokud jsou prostředky lyofilizovány, stačí těsně před použitím přidat sterilní nosič, například sterilní fyziologický roztok. V čas potřeby je možné připravit roztoky a suspenze vhodné pro zavedení injekcí připravených ze sterilních prášků, granulí a tablet. V jednom provedení vynálezu se popisují autoinjektory, které obsahují roztoky erythropoetinu vhodné pro zavedení injekcí a které se mohou použít v případě kritických situací v ambulancích, ve stanicích první pomoci a na bojištích a dokonce při autoaplikaci v domácích podmínkách, zvláště, když může dojít k možnosti traumatické amputace, jako například při neopatrném použití žacího stroje. Pravděpodobnost, že buňky a tkáň v poraněné noze nebo prstu přežijí po opětovém přišití se zvýší

aplikací erythropoetinu na několik míst v poraněné části, co nejdříve je to možné, dokonce ještě dříve než dorazí na místo úrazu lékařský personál nebo než poraněný dorazí do místa ošetření.

Ve výhodném provedení vynálezu se prostředek připraví v souladu s rutinními postupy, jako farmaceutický prostředek upravený pro intravenózní aplikaci lidským jedincům. V typickém případě prostředky vhodné pro intravenózní aplikaci jsou roztoky ve sterilním izotonickém vodném pufru. Kde je to nezbytné, prostředek může zahrnovat rozpouštěcí činidlo a lokální anestetikum, jako je lidokain, aby se zmírnila bolest v místě aplikace injekce. V obecném případě se složky mohou aplikovat buď odděleně nebo smíchané ve formě jednotkové dávky, například, jako suchý lyofilizovaný prášek nebo v bezvodém koncentrátu v hermeticky uzavřené nádobce, jako je ampule nebo sáček indikující množství aktivního činidla. V případě, že se prostředek aplikuje infúzí, může se rozdělit do infúzních nádob obsahujících sterilní vodu nebo fyziologický roztok odpovídající farmaceutickému stupni čistoty. V případě, že se prostředek aplikuje injekcí, připraví se ampule sterilního fyziologického roztoku tak, že se složky mohou před aplikací smíchat.

Čípky v obecném případě obsahují aktivní složku v rozmezí 0,5 až 10 % (hmotnostní), přičemž orální přípravky s výhodou obsahují 10 až 95 % aktivní složky.

Prostředky určené pro promývací roztoky, které nacházejí uplatnění při použití lázní určených pro transplantované orgány, v perfúzi in situ nebo při aplikaci do vaskulárního systému dárce orgánu dříve než dojde k odnětí orgánu. Takové farmaceutické prostředky mohou obsahovat množství erythropoetinu nebo formy erythropoetinu nevhodné pro akutní



nebo chronickou, lokální nebo systémovou aplikaci jedinci, ale slouží pro promývání mrtvol, orgánů, jako perfuzát orgánů nebo při in situ promývání orgánů, dříve než dojde k jejich odejmutí, nebo snížení množství v nich obsaženého erytropoetinu dříve než dojde k expozici nebo vrácení ošetřeného orgánu do regulárního oběhového systému. Erytropietinem určeným pro tento předmět vynálezu může být libovolný erytropoetin, jako jsou přirozeně se vyskytující formy, jako je lidský erytropoetin nebo libovolné shora popsané erytropoetiny, jako je asialoerytropoetin a erytropoetiny upravené fenylglyoxalem.

Vynález dále popisuje farmaceutický balíček nebo sadu obsahující jeden nebo více nádob naplněných jednou nebo více složek farmaceutických prostředků podle vynálezu. V takových kontejnerech je příbalový leták připravený vládou agenturou regulující výrobu, použití nebo prodej farmaceutických prostředků nebo biologických produktů, který reflektuje na povolení agentury vyrábět, používat nebo prodávat uvedený výrobek pro aplikaci člověku.

V jiném provedení vynálezu se může erytropoetin například zavést do systému s řízeným uvolňováním. Polypeptid se může například aplikovat použitím intravenózní infúze, implantovatelnou osmotickou pumpou, transdermálními náplastmi, lipozomy nebo jinými způsoby aplikace. V jednom provedení vynálezu je možné použít čerpadlo (popisuje se v publikaci Langer, Sefton, 1987, CRC Cr it. Ref. Biomed. Eng. 14:201, Buchwald et al., 1980, Surgery 88: 507, Saudek et al., 1989, N. Engl. J. Med. 321:574). V jiném provedení vynálezu se sloučenina může zavést ve vezikuly, zvláště v lipozomu (popisuje se například v publikaci Langer, Science 249:1527-1533 (1990), Treat et al., Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer, Lopez-Berestein and Fidler

(eds.), Liss, New York, pp. 353-365 (1989), v patentovém dokumentu WO 91/04014, v patentovém dokumentu USA č. 4 704 355, v publikaci Lopez-Berestein and Fidler (eds.), Liss, New York, pp. 317-327 (1989)). V jiném provedení vynálezu se mohou použít polymerní materiály (popisuje se v publikaci Medical Applications of Controlled Release, Langer and Wise (eds.), CRC Press: Boca Raton, Florida, 1974, Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance, Smolen and Ball (eds.), Wiley: New York (1984), Ranger and Peppas, J. Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem. 23: 61, 1983, a také Levy et al., 1985, Science 22: 190, During et al., 1989, Ann. Neurol. 25: 351, Howard et al., 1989, J. Neurosurg. 71:105).

V jiném provedení vynálezu systém se řízeným uvolňováním se může umístit do blízkosti léčeného cíle, to znamená cílové buňky, tkáně nebo orgánu, čímž je nutná pouze část systémové dávky (popisuje se například v publikaci Goodson, pp. 115-138, Medical Applications of Controlled release, vol. 2, 1984). Další systémy s řízeným uvolňováním se popisují v publikaci Langer, 1990, Science 249:1527-1533.

V jiném provedení vynálezu se může správně připravený erythropoetin aplikovat nasálně, orálně, rektálně, vaginálně nebo sublinguálně.

Ve specifickém provedení vynálezu může být nutné aplikovat erythropoetinové prostředky podle vynálezu lokálně do oblasti, která potřebuje léčbu. Toho je možné dosáhnout například lokální infúzí během chirurgického zákroku, povrchovou aplikací, například v kombinaci s obvazováním ran po operaci, injekcí, aplikací pomocí katetru, čípky nebo implantáty, přičemž uvedené implantáty jsou porézní, neporézní nebo želatinové materiály, které zahrnují membrány, jako jsou silastické membrány nebo vlákna.

Výběr výhodné účinné dávky se stanoví na základě uvažovaných závažných faktorů, které odborník zná. Takové faktory zahrnují určitou formu erythropoetinu a jeho farmakokinetické parametry, jako je biologická dostupnost, metabolismus, poločas rozpadu, které se stanoví během obvyklých postupů vývoje a které se používají při získání povolení aplikace v případě farmaceutické látky. Další faktory ovlivňující dávku zahrnují léčený stav nebo onemocnění nebo pozitivní účinky, které se dosáhnou u normálního jedince, tělesná hmotnost pacienta, způsob aplikace, zda aplikace je akutní nebo chronická, průvodní medikace a jiné faktory, o kterých je známo, že ovlivňují účinnost aplikovaných farmaceutických činidel. Na základě odhadu praktického lékaře a okolnostech každého pacienta (například stav a status imunitního systému) by se měla stanovit přesná dávka.

V jiném provedení vynálezu se připravuje perfúzátní nebo perfúzní roztok ze účelem promývání a uchovávání orgánů vhodných pro transplantaci, perfúzní roztok zahrnující množství erythropoetinu účinného pro ochranu buněk odpovídajících na erythropoetin a asociovaných buněk, tkání nebo orgánů. Transplantace zahrnuje xenotransplantaci, kde orgán (zahrnující buňky, tkáň nebo jiné části orgánu) se získává z jednoho dárce a transplantuje se do odlišného příjemce, a autotransplantaci, kde se orgán získal z jedné části těla a nahradí jinou část těla. Tyto transplantace zahrnují chirurgické postupy, při kterých se může orgán vyjmout z těla, ex vivo resekovat, upravit nebo jinak manipulovat, jako je například odstranění nádoru, a pak se vrátí na původní místo. V jednom provedení vynálezu je promývacím roztokem roztok vzniklý v instituci University of Wisconsin (UW) (popisuje se v patentovém dokumentu USA č. 4 798 824). Uvedený roztok obsahuje přibližně 1 až 25 U/ml

erythropoetinu, 5 % hydroxyetylový škrob (který má molekulovou hmotnost přibližně od 200 000 až 300 000 a v podstatě neobsahuje etylenglykol, etylenchlorhydrin, chlorid sodný a aceton), 25 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 3 mM glutathion, 5 mM adenosin, 10 mM glukózu, 10 mM pufr HEPES, 5 mM glukonát hořečnatý, 1,5 mM  $\text{CaCl}_2$ , 105 mM glukonát sodný, 200 000 jednotek penicilinu, 40 jednotek inzulinu, 16 mg dexametazonu, 12 mg fenolové červení a hodnota pH je 7,4 až 7,5 a osmolalita je přibližně 320 mOsm/l. Roztok se používá k udržení kadaverózních ledvin a pankreasu před transplantací. Za použití roztoku, se může ochrana prodloužit na 30 hodinový limit, který je doporučený pro ochranu kadaverózní ledviny. Tento určitý promývací roztok složí jako neomezující příklad. Existuje řada takových roztoků, které se mohou upravit za účelem popsaného použití začleněním účinného množství erythropoetinu. V jiném provedení vynálezu promývací roztok obsahuje přibližně 5 až 35 U/ml erythropoetinu nebo přibližně 10 až 30 U/ml erythropoetinu. Jak se uvádí shora v textu, pro účely vynálezu je možné použít libovolnou formu erythropoetinu.

Zatímco výhodným příjemcem erythropoetinu pro účely vynálezu je člověk, uvedené způsoby lze aplikovat na jiné savce, zvláště domácí zvířata, dobytek, domácí miláčky a zvířata žijící v zajetí. Vynález však není limitující a výhody je možné aplikovat v případě každého zvířete.

V dalším provedení ex vivo vynálezu se popisuje libovolný erythropoetin, jako je erythropoitin popsaný shora v textu, stejně jako přirozené erythropoetiny a jejich analogy, napodobeniny erythropoetinu a fragment erythropoetinu, hybridní molekuly erythropoetinu, molekula vázající se na receptor erythropoetinu, agonisté erythropoetinu, renální erythropoetin, mozkový erythropoetin, jeho oligomér, jeho multimér, jeho mutein, jeho obdoba, jeho přirozeně se vyskytující forma, jeho

syntetická forma, jeho rekombinantní forma, jeho glykosylační varianta, jeho deglykosylační varianta nebo jeho kombinace.

Vynález popisuje způsoby a prostředky pro zesílení životaschopnosti buněk, tkání nebo orgánů, které nejsou izolovány od vaskulárního systému endoteliální buněčnou bariérou. Tyto způsoby se provádějí vystavením buněk, tkáně nebo orgánů přímo farmaceutickému prostředku, který obsahuje erytropoetin nebo aplikací nebo kontaktem farmaceutického prostředku obsahujícího erytropoetin s vaskulárním systémem tkáně nebo orgánu. Zesílená aktivita buněk odpovídajících na erytropoetin u léčené tkáně nebo orgánu je odpovědná za dosažené pozitivní účinky.

Jak se popisuje shora v textu, vynález je založen z části na objevu, že molekuly erytropoetinu se mohou přenášet z lumenálního povrchu na povrch bazální membrány endoteliálních buněk kapilár orgánů s pevným spojením endoteliálních buněk zahrnující například mozek, sítnice a varlata. Buňky odpovídající na erytropoetin vyskytující se v bariéře jsou cíle pro pozitivní účinky erytropoetinu a jiné buněčné typy nebo tkáně nebo orgány, které obsahují a závisí zcela nebo částečně na buňkách odpovídajících na erytropoetin, jsou cíle pro metody podle vynálezu. Po transcytóze erytropoetinu může erytropoetin reagovat s receptorem erytropoetinu na buňce odpovídající na erytropoetin, což je například na neuronové, retinální, svalové, srdeční, plicní, jaterní, ledvinové buňce, buňce nadledvinové kůry, buňky tenkého střeva, dřeně nadledvin, buněk endotelia kapilár, buněk varlat, buněk vaječníků, nebo endometriálních buněk. Navázání receptoru může iniciovat kaskádu signální transdukce, která vede k aktivaci programu exprese genu v buňkách nebo tkáních odpovídajících na erytropoetin před poškozením, které je způsobeno toxiny, chemoterapeutickými činidly, radiační terapií, hypoxií atd.. Metody ochrany tkáně odpovídající na

erythropoetin před zraněním nebo hypoxickým stresem a zesílení funkce takové tkáně se popisuje dále v textu.

V jednom provedení vynálezu se pacient, kterým je savec, podrobil systémové chemoterapii v případě léčby zhoubného bujení zahrnující radioterapii, která v běžném případě vykazuje nežádoucí účinky, jako je poškození nervů, plic, srdce, vaječníků nebo varlat. Aplikace farmaceutického prostředku obsahující erythropoetin, jak se popisuje shora v textu, se provádí před a během chemoterapie a/nebo radioterapie, aby se ochránily různé tkáně a orgány před poškozením chemoterapeutickým činidlem, jako je ochrana varlat. Léčba může pokračovat až do okamžiku, kdy množství chemoterapeutického činidla klesne pod hodnotu, které znamená potencionální nebezpečí pro tělo savce.

V jiném provedení vynálezu se plánuje, že je možné získat různé orgány pro transplantaci pro řadu příjemců z obětí automobilových nehod, přičemž některé z nich vyžadují transport na dlouhé vzdálenosti a dlouhou dobu. Dříve než dojde k odebrání orgánu, oběti se aplikuje infúze s farmaceutickým prostředkem, který obsahuje erythropoetin. Odebrané orgány určené pro přepravu se máčely v lázni s promývacím roztokem obsahujícím erythropoetin a uchovávaly se v lázni obsahující erythropoetin. Jisté orgány se nepřerušovaně omývaly za použití pulzního perfúzního zařízení, které využívá perfuzát obsahující erythropoetin v souladu s vynálezem. Během transportu dochází k minimální degeneraci funkce a při implantaci se provádí opětová perfúze orgánů *in situ*.

V jiném provedení vynálezu chirurgický zákrok provádějící úpravu srdeční chlopně vyžadoval dočasnou kardioplegii a arteriální okluzi. Před zákrokem se pacientovi aplikovala infúze s 500 jednotkami erythropoetinu na jeden kilogram

tělesné hmotnosti. Taková léčba předchází hypoxickému ischemickému buněčnému poškození, zvláště po perfúzi.

V jiném provedení vynálezu při libovolném chirurgickém zákroku, jako je kardiopulmonární bypass, je možné použít přirozeně se vyskytující erytropoetin nebo libovolný erytropoetin podle vynálezu. V jednom provedení vynálezu se provedla před, během a po provedení bypasu aplikace farmaceutického prostředku obsahujícího erytropoetin za účelem chránit funkci mozku, srdce a jiných orgánů.

V následujících příkladech, kde se erytropoetin podle vynálezu zahrnující přirozeně se vyskytující erytropoetin používá při ex vivo aplikacích nebo při ošetření buněk odpovídajících na erytropoetin, jako je neuronová tkáň, retinální tkáň, srdeční, plicní, jaterní, ledvinové buňky nebo tkáň a buňky nebo tkáň tenkého střeva, kůry nadledvinek, dřeně nadledvin, endotelia kapilár, varlat, vaječníků nebo endometrických buněk nebo tkáň. Vynález popisuje farmaceutický prostředek ve formě jednotkové dávky upravené pro ochranu nebo zesílení buněk, tkání nebo orgánů odpovídajících na erytropoetin oddělených od vaskulárního systému, který obsahuje v jednotkové dávce účinné netoxické množství v rozmezí 50 000 až 500 000 jednotek, 60 000 až 500 000 jednotek, 70 000 až 500 000 jednotek, 80 000 až 500 000 jednotek, 90 000 až 500 000 jednotek, 100 000 až 500 000 jednotek, 150 000 až 500 000 jednotek, 200 000 až 500 000 jednotek, 250 000 až 500 000 jednotek, 300 000 až 500 000 jednotek, 350 000 až 500 000 jednotek, 400 000 až 500 000 jednotek nebo 450 000 až 500 000 jednotek erytropoetinu, modulátor aktivity erytropoetinového receptoru nebo modulátor receptoru aktivovaného erytropoetinem a farmaceuticky přijatelný nosič. Ve výhodném provedení vynálezu účinné netoxické provedení vynálezu je v rozmezí 50 000 až 500 000

jednotek. Ve výhodném provedení vynálezu erytropoetin ve shora popsaném provedení vynálezu není erytropoietický.

Ukázalo se, že aplikace erytropoetinu obnovuje kognitivní funkci u zvířat, která prodělala trauma mozku. Když se aplikace erytropoetinu zpozdila o 5 až 30 dní, erytropoetin byl stále schopen obnovit funkci ve srovnání se fiktivně ošetřenými zvířaty, což indikuje schopnost erytropoetinu regenerovat nebo obnovit aktivitu mozku. Vynález se také popisuje použití erytropoetinu při přípravě farmaceutického prostředku při léčbě mozkového traumatu a jiných kognitivních dysfunkcí, která zahrnují léčbu po poranění (například tři dni, pět dní, týden, měsíc nebo déle). Vynález také popisuje způsob léčby kognitivní dysfunkce po poranění aplikací účinného množství erytropoetinu. Vynález popisuje použití libovolného zde popsaného erytropoetinu.

Vynález dále popisuje použití libovolného z erytropoetinů pro přípravu farmaceutického prostředku pro obnovení poruchy funkce tkáně, tkáně nebo orgánu, kde léčbu je možné začít po počátečním inzultu, který odpovídá za poruchu funkce. Léčba použitím erytropoetinů podle vynálezu může probíhat v průběhu onemocnění nebo stavu během akutní fáze stejně jako chronické fáze.

V případě, že erytropoetin podle vynálezu má erytropoietickou aktivitu, pak ve výhodném provedení vynálezu se může erytropoetin aplikovat systémově, přičemž dávka se pohybuje přibližně mezi 300 a 10 000 jednotkami na jeden kilogram tělesné hmotnosti, s výhodou přibližně 500 až 5 000 jednotek na jeden kilogram tělesné hmotnosti, výhodněji přibližně 1 000 jednotek na jeden kilogram tělesné hmotnosti. Tato účinná dávka by měla být dostatečná k dosažení koncentrace erytropoetinu v séru vyšší než přibližně 10 000, 15 000 nebo 20 000 mU/ml. Uvedeného množství erytropoetinu

v séru je možné dosáhnout přibližně 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 nebo 10 hodin po aplikaci. Je-li to nezbytné, je možné aplikaci opakovat. Aplikaci je možné denně opakovat, pokud je to z klinického hlediska nutné, nebo se opakuje ve vhodném časovém intervalu, například každých 1 až 12 týdnů, s výhodou každé 1 až 3 týdny. V jednom provedení vynálezu se účinné množství erytropoetinu a farmaceuticky přijatelný nosič může sbalit do zkumavky nebo jiné nádoby obsahující jedinou dávku. V jiném provedení vynálezu erytropoetin použitelný pro tyto zde popsané účely není erytropoietický, což znamená, že je schopen vyvinout zde popsané aktivity, ale není schopen zvýšit koncentraci hemoglobinu nebo hematokrit. Taková neerytropoietická forma erytropoetinu je výhodná například tam, kde se metody podle vynálezu budou aplikovat trvale. V jiném provedení vynálezu se erytropoetin podává v dávce, která je vyšší než dávka nezbytná pro maximální stimulaci erytropoiezy. Jak se uvádí shora v textu, není nutné, aby erytropoetin podle vynálezu vykazoval erytropoietickou aktivitu, a proto shora v textu uvedené dávky vyjádřené v hematopoietických jednotkách jsou pouze příklady pro erytropoetiny, které vyjadřují erytropoietickou aktivitu. Shora v textu se uvádějí molární ekvivalenty dávek, které je možné aplikovat pro libovolný erytropoetin.

Vynález dále popisuje způsob umožňující transport molekuly endoteliální buněčnou bariérou u savce aplikací prostředku, který obsahuje určitou molekulu ve spojení s erytropoetinem, jak se popisuje shora v textu. Pevná spojení mezi endoteliálními buňkami v jistých orgánech v těle tvoří bariéru pro vstup jistých molekul. V případě léčby různých stavů, které se týkají orgánu odděleného uvedenou bariérou, jsou nutné metody umožňující průchod farmaceutických činidel. Erytropoetin podle vynálezu je možné použít jako nosič pro zavedení jiných molekul přes hematoencefalickou bariéru a jiné podobné bariéry. Připravil se prostředek obsahující molekulu,

která má překonat bariéru, a erytropoetin a periferní aplikace prostředku vede k transcytóze prostředku skrz bariéru. Spojení molekuly transportované přes bariéru s erytropoetinem může být labilní kovalentní vazba, přičemž molekula se po průchodu bariérou uvolní ze spojení s erytropoetinem. V případě, že požadovaná farmakologická aktivita molekuly je zachována nebo není ovlivněna spojením s erytropoetinem, pak je možné aplikovat přímo uvedený komplex.

Odborník zná různé způsoby spojení molekul s erytropoetinem podle vynálezu a s jinými činidly popsányi shora v textu. Jsou to kovalentní a nekovalentní vazby a jiné způsoby spojení. V experimentálním systému je možné snadno zhodnotit účinnost prostředku. Spojení molekul s erytropoetinem je možné dosáhnout libovolným počtem způsobů, které zahrnují labilní, kovalentní vazbu, řetězení atd.. Mohou se také uplatnit interakce biotin/avidin. Jak se popisuje shora v textu, hybridní molekula se může připravit rekombinací nebo syntézou. Molekula může zahrnovat oblast molekuly s požadovanou farmakologickou aktivitou a oblast odpovědnou za úpravu aktivity receptoru erytropoetinu.

Molekula se může konjugovat s erytropoetinem prostřednictvím polyfunkční molekuly, to je polyfunkční řetězíci činidlo. Termín „polyfunkční molekula“ zahrnuje molekuly obsahující jednu funkční skupinu, která může postupně reagovat více jak jednou, jako je formaldehyd, stejně jako molekuly s více jak jednou reaktivní skupinou. Termín „reaktivní skupina“ znamená funkční skupinu na řetězíci činidle, která reaguje s funkční skupinou na molekule (například peptid, protein, sacharid, nukleová kyselina, zvláště hormon, antibiotika nebo činidlo působící proti zhoubnému bujení, které se transportuje skrz endoteliální buněčnou bariéru) tak, že vzniká kovalentní vazba mezi řetězíci činidlem a uvedenou molekulou. Termín „funkční

skupina" si ponechává standardní význam v oboru organické chemie. Polyfunkční molekuly, které se mohou použít, jsou s výhodou biologicky kompatibilní linkery, to znamená, že jsou nekarcinogenní, netoxické a v podstatě neimunogenní *in vivo*. Polyfunkční řetězící činidla, jako jsou ty známé v oboru a zde popsané, se mohou snadno testovat na zvířecích modelech, aby se stanovila jejich biologická kompatibilita. Polyfunkční molekula je s výhodou bifunkční. Termín „bifunkční molekula“ znamená molekulu se dvěma reakčními skupinami. Bifunkční molekulou může být heterobifunkční nebo homobifunkční molekula. Heterobifunkční řetězící činidlo umožňuje vektorové spojení. V případě polyfunkční molekuly je zvláště výhodné být dostatečně rozpustný ve vodě, protože ve vodných roztocích dochází k řetězícím reakcím. Vodné roztoky mají pH 6 až 8 a výsledné konjugáty zůstávají ve vodě rozpustné za účelem účinnější bio-distribuce. V typickém případě se polyfunkční molekula kovalentně váže s aminoskupinou nebo sulfhydrylovou funkční skupinou. Polyfunkční molekuly však reagují s jinými funkčními skupinami, jako jsou karboxylové kyseliny nebo hydroxylové skupiny. Homobifunkční molekuly mají alespoň dvě reaktivní funkční skupiny, které jsou stejné. Reaktivní funkční skupiny na homobifunkční molekuly zahrnují například aldehydové skupiny a aktivní esterové skupiny. Homobifunkční molekuly vykazující aldehydové skupiny zahrnují například glutaraldehyd a subaraldehyd. Použití glutaraldehydu jako řetězícího činidla se popisuje v publikaci Poznansky et al., Science 223, 1304-1306 (1984). Homobifunkční molekuly, které mají alespoň dvě aktivní esterové jednotky zahrnují estery dikarboxylových kyselin a N-hydroxysukcinimid. Některé příklady takových N-sukcinimidylesterů zahrnují disukcinimidylsuberát a dithio-bis-(sukcinimidylpropionát) a jejich rozpustnou bis-sulfonovou kyselinu a bis-sulfonátové sole, jako jsou jejich sodné a draselné sole. Tato

homobifunkční činidla jsou dostupná u firmy Pierce, Rockford, Illinois.

Heterobifunkční molekuly mají alespoň dvě odlišné reaktivní skupiny. Reaktivní skupiny reagují s odlišnými funkčními skupinami, které se například nacházejí na erythropoetinu a molekule. Tyto dvě různé funkční skupiny, které reagují s reaktivní skupinou na heterobifunkčním řetězcím činidle jsou obvykle aminoskupiny, například  $\epsilon$ -aminoskupina lyzinu, sulphydrylová skupina, například thiolová skupina cysteinu, karboxylová kyselina, například karboxylát na kyselině asparágové nebo hydroxylová skupina, například hydroxylová skupina na serinu.

Různé molekuly erythropoetinu samozřejmě nemusí mít vhodné reaktivní skupiny dostupné pro použití s jistým řetězcím činidlem, avšak odborníkovi je zřejmé, že volba řetězcího činidla je založena na dostupných skupinách vhodných pro řetězení erythropoetinu podle vynálezu.

Když reaktivní skupina heterobifunkční molekuly tvoří kovalentní vazbu s aminokyselinovou skupinou, pak kovalentní vazbou bude obvykle amidová nebo imidová vazba. Reaktivní skupina, která tvoří kovalentní vazbu s aminoskupinou, může být například aktivována karboxylátovou skupinou, halokarbonylovou skupinou nebo esterovou skupinou. Výhodná halokarbonylová skupina je chlorokarbonylová skupina. Esterovými skupinami jsou s výhodou reaktivní esterové skupiny, jako je například N-hydroxysukcinimidesterová skupina.

Jinou funkční skupinou je v typickém případě buď thiolová skupina, skupina schopná se přeměnit na thiolovou skupinu nebo skupina, která tvoří kovalentní vazbu s thiolovou skupinou. Kovalentní vazbou bude obvykle thioeterová nebo disulfidová vazba. Reaktivní skupinou, která tvoří kovalentní vazbu

s thiolovou skupinou může například být dvojná vazba, která reaguje s thiolovými skupinami nebo aktivovaným disulfidem. Reaktivní skupina obsahující dvojnou vazbu schopnou reagovat s thiolovou skupinou je maleimidová skupina, ačkoliv jiné skupiny, jako je akrylnitrilová, jsou také možné. Reaktivní disulfidovou skupinou může například být 2-pyridyldithioskupina nebo skupina 5,5'-disthio-bis-(2-nitrobenzoová kyselina). Některé příklady heterobifunkčních činidel obsahující reaktivní disulfidové vazby zahrnují N-sukcinimidyl-3-(2-pyridyldithio)propionát (popisuje se v publikaci Carlsson, et al., 1978, Biochem J., 173:723-737), S-4-sukcinimidyl-oxokarbonyl-alfa-metylbenzylthiosulfát sodný a 4-sukcinimidyl-oxokarbonyl-alfa-metyl-(2-pyridyldithio)toluen. Výhodný je N-sukcinimidyl-3-(2-pyridyldithio)propionát. Některé příklady heterobifunkčních činidel obsahující reaktivní skupiny vykazující dvojnou vazbu a reagující s thiolovou skupinou zahrnují sukcinimidyl-4-(N-maleimidometyl)cyklohexan-1-karboxylát a sukcinimidyl-m-maleimidobenzoát.

Jiné heterobifunkční molekuly zahrnují sukcinimidyl-3-(maleimido)propionát, sulfosukcinimidyl-4-(p-maleimidofenyl)butyrát, sulfosukcinimidyl-4-(N-maleimidometylcyklohexan)-1-karboxylát, maleimidobenzoyl-N-hydroxysukcinimidester. Výhodná je sodiumsulfonátová sůl sukcinimidyl-m-maleimidobenzoátu. Řada ze shora v textu popsaných heterobifunkčních činidel a jejich sulfonátových solí je možné získat u firmy Pierce Chemical Co., Rockford, Illinois, USA.

Pro odborníka je snadné zjistit, zda je nutné, aby shora popsané konjugáty byly vratné nebo nestabilní. U konjugátu je možné snadno tetsovat in vitro přítomnost erythropoetinu a požadovanou farmakologickou aktivitu. Jestliže konjugát vykazuje obě vlastnosti, jeho vhodnost se testuje in vivo. Jestliže konjugovaná molekula musí být od erythropoetinu

oddělena, aby vykazala požadovanou aktivitu, je výhodná nestabilní vazba nebo reverzibilní spojení s erythropoetinem. Dříve než dojde k testování *in vivo*, mohou se testovat charakteristiky lability za použití standardů *in vitro*.

Další informace, které se týkají přípravy a použití uvedených stejně jako dalších polyfunkčních činidel, je možné získat v následujících publikacích nebo v jiném dostupném stavu techniky:

- 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.* 254:3375-3381.
- 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.* 160:483-488.
- Hashida, S. et al., 1984, *J. Applied Biochem.* 6:56-63.

Dále metody řetězení se popisují v publikaci Means and Feeney, 1990, Bioconjugate Chem. 1:2-12.

Bariéry, které je možné překonat použitím shora v textu popsaných metod a prostředků podle vynálezu, zahrnují hematoencefalickou bariéru, bariéru krev-oči, krev-varlata, krev-vaječníky a krev-děloha.

Kandidáti molekul vhodné pro transport přes endoteliální buněčnou bariéru zahrnují například hormony, jako je růstový hormon, neurotrofické faktory, antibiotika nebo antifungicidní činidla, jako jsou ty vylučovaná v mozku a jiných orgánech oddělených bariérou, peptidové radiofarmaceutické prostředky, protilátky proti biologicky aktivním činidlům, farmaceutické prostředky a činidla působící proti zhoubnému bujení. Příklady takových molekul zahrnují růstový hormon, nervový růstový faktor (NGF), neurotrofický faktor získaný z mozku (BDNF), ciliární neurotrofický faktor (CNTF), růstový faktor bazálních fibroblastů (bFGF), transformační růstový faktor  $\beta 1$  (TGF $\beta 1$ ), transformační růstový faktor  $\beta 2$  (TGF $\beta 2$ ), transformační růstový faktor  $\beta 3$  (TGF $\beta 3$ ), interleukin 1, interleukin 2, interleukin 3 a interleukin 6, AZT, protilátky proti faktoru nekrotizujícímu nádor a imunosupresivní činidla, jako je cyklosporin.

Vynález dále popisuje prostředek obsahující molekulu, která se přenese prostřednictvím transcytózy bariérou pevného spojení endoteliálních buněk, a erythropoetin, jak se popisuje shora v textu. Vynález dále popisuje použití konjugátu mezi molekulou a erythropoetinem, jak se popisuje shora v textu, při přípravě farmaceutického prostředku pro zavedení molekuly skrz bariéru, jak se popisuje shora v textu.

Přehled obrázků na výkrese

Obr. 1 znázorňuje translokaci parenterálně aplikovaného erytropoetinu do mozkomíšního moku.

Obr. 2 znázorňuje ochranu myokardia před ischemickým poškozením erytropoetinem po dočasné vaskulární okluzi.

Obr. 3 zobrazuje udržování funkce srdce připraveného pro transplantaci pomocí erytropoetinu.

Na Obr. 4 se porovnává účinnost erytropoetinu a asialoerytropoetinu na životaschopnost buněk P19, které trpí nedostatkem séra, *in vitro*.

Na Obr. 5 je zobrazen jiný experiment, který porovnává účinnost erytropoetinu a asialoerytropoetinu na životaschopnost buněk P19, které trpí nedostatkem séra, *in vitro*.

Na Obr. 6 se porovnává účinnost erytropoetinu a erytropoetinu upraveného fenylglyoxalem na životaschopnost buněk P19, které trpí nedostatkem séra, *in vitro*.

Obr. 7 zobrazuje ochranu erytropoetinem a asialoerytropoetinem v kryším modelu fokální cerebrální ischemie.

Obr. 8 zobrazuje odezvu na dávku porovnávající účinnost lidského erytropoetinu a lidského asialoerytropoetinu při střední okluzi cerebrální arterie v modelu ischemické mrtvice.

Obr. 9 zobrazuje účinek biotinylovaného erytropoetinu a asialoerytropoetinu v testu s buňkami P19.

Obr. 10 zobrazuje aktivitu jodovaného erytropoetinu v testu s buňkami P19.

Obr. 11 zobrazuje účinky léčby erytropoetinem v kryším modelu zeleného očního zákalu.

Obr. 12 zobrazuje rozsah ochrany retinální funkce erytropoetinu v kryším modelu zeleného očního zákalu.

Obr. 13 zobrazuje obnovení kognitivní funkce po poškození mozku aplikací erytropoetinu, která začíná pět dní po poškození.

Obr. 14 zobrazuje obnovení kognitivní funkce po poškození mozku aplikací erytropoetinu, která začíná 30 dní po poškození.

Obr. 15 zobrazuje účinnost lidského asialoerytropoetinu v kainitovém modelu cerebrální toxicity.

#### Příklady provedení vynálezu

Příklad 1: Erytropoetin prochází hematoencefalickou bariérou

Provedla se narkóza dospělých samců krys Sprague-Dawley a intraperitoneálně se aplikoval rekombinantní lidský erytropoetin. Ve 30 minutových intervalech až po dobu 3 hodin se odebíral z místa cisterna magna mozkomíšní mok a koncentrace erytropoetinu se stanovila za použití citlivého a specifického testu ELISA. Jak je zobrazeno na Obr. 1 bazální koncentrace erytropoetinu v CSF je 8 mU/ml. Po několika hodinách množství erytropoetinu zjištěné v CSF začíná růst a po 2,5 hodinách a déle se podstatně liší od bazální koncentrace, přičemž hodnota p je menší než 0,01. Maximální

hodnota přibližně 100 mU/ml je v rozmezí, které vykazuje ochranné účinky *in vitro* (0,1 až 100 mU/ml). Čas odpovídající maximální hodnotě odpovídá 3,5 hodinám, což je podstatně delší čas ve srovnání maximální hodnotou v séru (méně než 1 hodina). Výsledky uvedeného experimentu ukazují, že podstatné množství erythropoetinu se může dostat přes pevná buněčná spojení jednorázovou parenterální aplikací erythropoetinu ve vhodných koncentracích.

#### Příklad 2: Udržování funkce srdce připraveného pro transplantaci

Krysím samcům Wistar, jejichž tělesná hmotnost je 300 až 330 g, se 24 hodin před odstraněním srdce za účelem studie *ex vivo* aplikoval erythropoetin (500 jednotek na jeden kilogram tělesné hmotnosti) nebo pomocná látka. Postupovalo se podle protokolu popsaného v publikaci Delcayre et al., 1992, Amer. J. Physiol. 263:H1537-45. Zvířata se usmrtila s pentobarbitalem (0,3 ml) a intravenózně se aplikoval heparin (0,2 ml). Srdce se na začátku nechaly uvést do rovnováhy po dobu 15 minut. Levý ventrikulární balon se pak nafoukl na objem, přičemž tlak na konci diastoly je 8 mm rtuťového sloupce. Křivka závislosti tlaku v levé komoře na objemu se zkonstruovala postupným nafukováním objemu balonu v krocích 0,02 ml. Nulový objem se definoval jako bod, ve kterém tlak na konci diastoly levé komory je roven nule. Při dokončení křivky tlak-objem se balon levé komory vypustil, aby se tlak na konci diastoly upravil zpět na hodnotu 8 mm rtuťového sloupce a po kontrole korkonárního průtoku pokračuje kontrola po dalších 15 minut. Pak se srdce zastaví 50 ml přípravku Celsior plus molekula a nechá se ležet při teplotě 4 °C za tlaku 60 cm vodního sloupce. Srdce se pak odstraní a uchovává se po dobu 5 hodin při teplotě 4 °C v plastové nádobě naplněné stejným roztokem a obklopené drceným ledem. Pak se srdce přenesse do

Langendorfova přístroje. Katetr balónu se zavedl do levé komory a znovu se nafoukl na stejný objem jako během preischemického období. Srdce je opět perfundováno po dobu alespoň 2 hodiny při teplotě 37 °C. Perfúzní tlak je nastaven na hodnotu 50 cm vodního sloupce po dobu 15 minut během průtoku a pak po dobu dalších 2 hodin se hodnota tlaku upravuje zpět na hodnotu 100 cm vodního sloupce. Kardiostimulátor se znovu nastavil na hodnotu 320 úderů za minutu. Izovolumetrické měření kontrakčních indexů a diastolického tlaku se provádí vždy třikrát v 25, 45, 60, 120 minutách promývání. V těchto časových bodech se se vynesou křivky tlak-objem a shromáždí se koronární efluent během 45 minut promývání, přičemž se měří únik kreatinové kinázy. Porovnávají se dvě testované skupina za použití nepárováního t-testu, lineární regrese využívající hodnot tlaku na konci diastoly se používá k navržení křivek compliance. Jak je zobrazeno na obrázku č. 2, ošetřením erytropoetinem se dosáhlo podstatné zlepšení tlaku v levé komoře stejně jako se zlepšila křivka tlak-objem, snížil se levý diastolický ventrikulární tlak a snížil se únik kreatinové kinázy.

#### Příklad 3: Erytropoetin chrání srdeční svalovinu před ischemickým poraněním

Dospělým samcům krys se aplikoval rekombinantní lidský erytropoetin (5 000 jednotek na jeden kilogram tělesné hmotnosti), přičemž 24 před tím se provedla anestezie a zvířata se připravila na okluzi koronární arterie. Další dávka erytropoetinu se aplikovala na začátku postupu a levá hlavní koronární arterie se uzavřela po dobu 30 minut a pak se opět uvolnila. Po ošetření se aplikuje denně stejná dávka erytropoetinu po dobu jednoho týdne. U zvířat se pak studovala funkce srdce. Jak je zobrazeno na obrázku č. 3, zvířata, kterým se aplikovala injekce pouze z fyziologickým roztokem

vykazují vysoké zvýšení tlaku na konci levé diastoly, což ukazuje vedle infarktu myokardu na sekundární dilatované strnutí srdce. Naopak zvířata, kterým se aplikoval erytropoetin, nevykazují ve srovnání s kontrolními zvířaty sníženou funkci srdce (rozdíl je podstatný, hodnota  $p$  je nižší než 0,001).

#### Příklad 4: Molekuly erytropoetinu

Přirozený erytropoetin se může upravit tak, že jeho aktivity vyhovují specifické tkáni nebo tkáním. Může se provést velké množství neomezuujících strategií za účelem dosažení požadované tkáňové specifity. Tyto strategie zahrnují úpravy, které odstraňují nebo upravují glykosylační části, přičemž erytropoieitn zahrnuje tři N-spojené a jednu O-spojenou glykosylační část. Takové varianty glykosylovaného erytropoetinu se produkují řadou způsobů. Například kyseliny sialové, které ukončují konec cukerných řetězců se mohou odstranit specifickými sialidázami v závislosti na chemické vazbě spojující kyselinu sialovou s cukerným řetězcem. V jiném případě glykosylovaná struktura může být rozebrána různými způsoby za použití jiných enzymů, které štěpí specifické vazby. Aby se potvrdila platnost těchto principů, u rekombinantního lidského erytropoetinu se odstranily sialoskupiny použitím sialidázy A (od firmy Prozyme Inc.), přičemž se postupovalo podle protokolu výrobce. Úspěch chemické úpravy se potvrdil analýzou reakčního produktu na SDS polyakrylovém gelu a obarvením výsledných pruhů, které ukazují, že chemicky upravený erytropoieitn má zjevnou molekulovou hmotnost přibližně 31 000, jak se očekávalo, ve srovnání s neupraveným erytropoetinem, jehož molekulová hmotnost je přibližně 34 000, a stanovením množství zbývajících zbytků sialové kyseliny chemickými postupy,

příčemž získaná hodnota by měla být nižší než 0,1 mol/mol erythropoetinu.

Při jiné úpravě, kdy se upravují aminokyselinové zbytky erythropoetinu, argininové zbytky se upravují použitím fenylglyoxalu podle protokolu popsaného v publikaci Takahashi 1977, J. Biochem. 81:395-402 provedené pro variabilní délky času v rozmezí 0,5 do 3 hodin při teplotě místnosti. Reakce se zakončila dialýzou reakční směsi proti vodě. Vynález popisuje použití takových upravených forem erythropoetinu.

Asialoerythropoetin a fenylglyoxalerythropoetin byly stejně účinné jako přirozený erythropoetin v případě neuronových buněk *in vitro*, jak je zobrazeno na obrázku č. 4 až 6. Testování *in vitro* se provedlo za použití embryonálních buněk zhoubného bujení podobných neuronovým buňkám (P19), které při vyčerpání séra podléhají apoptóze. Dvacet čtyři hodin před odstraněním séra se do kultur přidal erythropoetin nebo upravený erythropoetin v koncentraci 1 až 1 000 ng/ml. Následující den se odstranilo kultivační médium, buňky se promyly čerstvým kultivačním médiem, které neobsahuje sérum, a zbytky se dalo kultivační médium obsahující testovanou látku (bez séra). Kultivace pokračovala dalších 48 hodin. Aby se stanovil počet životaschopných buněk, provedl se redukční test s tetrazoliem (CellTiter 96, Pormega Inc.). Jak je zobrazeno na Obr. 4 až 5, asialoerythropoetin se jeví být při prevenci odumírání buněk stejně účinný jako samotný erythropoetin. Erythropoetin upravený fenylglyoxalem se testoval za použití buněk P19, které jsou podobné neuronovým buňkám. Jak je zobrazeno na Obr. 6, tento chemicky upravený erythropoetin si zcela uchovává své neuroprotektivní účinky.

Uchování neuroprotektivní aktivity *in vivo* se potvrdilo použitím krysího fokálního ischemického modelu, ve kterém se

vytvořila reverzibilní léze v oblasti střední cerebrální artérie způsobem popsáným v publikaci Brines et al., 2000, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:10526-31. Při vzniku okluze arterie se krysám Dawley aplikoval intraperitoneálně asialoerytropoetin nebo erytropoetin (5 000 jednotek na jeden kilogram tělesné hmotnosti) nebo pomocná látka. O 24 hodin později se zvířata usmrtila a jejich mozky se izlovaly pro účely studie. Nařezaly se sekce a obarvily se solemi tetrazolia, aby se identifikovaly živé oblasti mozku. Jak zobrazuje Obr. 7 asialoerytropoetin je stejně účinný jako přirozený erytropoetin při poskytnutí ochrany funkce mozku v době aplikace od jedné hodiny po ischemii. Obr. 8 zobrazuje výsledky jiného modelu fokální ischemie, ve kterém se dosáhlo porovnatelné odezvy na dávku erytropoetinu a asialoerytropoetinu. Při aplikaci nejnižší dávky 250 U/kg asialoerytropoetin poskytl ochranu na rozdíl od neupraveného erytropoetinu.

#### Příklad 5: Úpravy primární struktury erytropoetinu a účinnost při ochraně neuronů

Popisuje se řada mutantních molekul erytropoetinu, které se neváží erytropoetinový receptor erytrocytů a tak nepodporují erytropoieézu *in vivo* nebo *in vitro*. Některé z těchto molekul přesto napodobují působení samotného erytropoieitnu v jiných tkáních nebo orgánech. 17-mér obsahující aminokyselinovou sekvenci 31 až 47 přirozeného erytropoetinu není aktivní v případě erytropoieézy, ale je plně aktivní v případě neurálních buněk *in vitro* (Campana and O'Brien, 1998:Int. J. Mol. Med.1:235-41).

Odvozené erytropoetiny nutné pro zde popsané použití se mohou vytvořit úpravou guanidinem, amidací, trinitrofenylací, acetylací, sukcinylací, nitrací nebo úpravou argininových

zbytků nebo karboxylových skupin atd. za vzniku erythropoetinů, které si uchovávají své aktivity pro specifické orgány a tkáně, ale nejsou specifické pro jiné, jako v případě erytrocytů. Když se erythropoetin podrobí shora v textu popsaným reakcím, zjistilo se, že v obecném případě výsledná molekula postrádá *in vivo* i *in vitro* erythropoietickou aktivitu (popisuje se například v publikaci Satake et al., 1990, Biochim. Biophys. Acta 1038:125-9). Některé příklady přípravy upravených erythropoetinů se popisují dále v textu.

Biotinylace volných aminoskupin erythropoetinu.

N-hydroxysukcinimidester kyseliny D-biotinoyl-e-aminokapronové (Boehringer Mannheim, kat. č. 1418165) se rozpustil ve 100  $\mu$ l DMSO. Tento roztok se kombinoval se 400  $\mu$ l PBS obsahujícím přibližně 0,2 mg erythropoetinu ve zkumavce pokryté folií. Po inkubaci po dobu 4 hodin při teplotě místnosti se oddělil nezreagovaný biotin gelovou filtrací na koloně Centricon 10. Jak ukazuje Obr. 10, tento biotinylovaný erythropoetin chrání buňky p19 před vyčerpáním séra.

V publikaci Biotinylated recombinant human erythropoietins: Bioactivity and Utility as a receptor ligand" Wojchowski et al., Blood, 1989, 74(3):952-8 se popisuje použití třech odlišných způsobů úpravy erythropoetinu biotinem. Biotin se aduje (1) na částí kyseliny sialové, (2) karboxylové skupiny a (3) aminoskupiny. Používá se test proliferace myších slezinných buněk, aby se prokázalo, že

- (1) adice biotinu na částí kyseliny sialové neporušuje biologickou aktivitu erythropoetinu,
- (2) adice biotinu na karboxylové skupiny vede k podstatné biologické dezaktivaci erythropoetinu,
- (3) adice biotinu na aminoskupiny vede k úplné biologické dezaktivaci erythropoetinu.

Tyto metody a úpravy se popisují ve vynálezu. Obr.9 zobrazuje aktivitu biotinylovaného erytropoetinu a asialoerytropoetinu v testu s buňkami P19, které trpí nedostatkem séra.

Jodace erytropoetinu.

Metoda 1- jodované kuličky

Jedna jodovaná kulička (Pierce, Rockford, Il) se inkubovala se 100  $\mu$ l PBS (20 mM fosforečnan sodný, 0,15 M NaCl, pH7,5) obsahující 1 mCi volného  $\text{Na}^{125}\text{I}$  po dobu 5 minut. Do směsi se pak přidalo 100  $\mu$ g erytropoetinu ve 100  $\mu$ l PBS. Po deseti minutách inkubace při teplotě místnosti se reakce zastavila odebráním 200  $\mu$ l roztoku z reakční nádoby (v reakční nádobě se nechala jodovaná kulička). Nadbytek jódu se odstranil gelovou filtrací na koloně Centricon 10. Jak ukazuje Obr. 11 takto připravený jodovaný erytropoetin účinně chrání buňky P19 před vyčerpáním séra.

Metoda 2-chloramin T

100  $\mu$ g erytropoetinu ve 100  $\mu$ l PBS se přidalo k 500  $\mu$ Ci  $\text{Na}^{125}\text{I}$  a vše se promýchalo v Eppendorfově zkumavce. Pak se přidalo 25  $\mu$ l chloraminu T (2 mg/ml) a směs se inkubovala po dobu 1 minuty při teplotě místnosti (2,4 mg/ml metabisulfitu sodného, 10 mg/ml tyrozinu, 10 % glycerolu, 0,1 % xylenu v PBS). Jódtyrozin a jodovaný erytropoetin se pak oddělily gelovou filtrací na koloně Centricon 10.

Úpravy lyzinu:

Karbamylace: erytropoetin (100  $\mu$ g) se upravil kyanátem draselným, jak se popisuje v publikaci Plapp et al., Activity of bovine pancreatic deoxyribonuclease A with modified amino groups. 1971, J. Biol. Chem. 246, 939-845.

Trinitrofenylace:

Erythropoetin (100  $\mu\text{g}$ ) se upravil s 2,4,6-trinitrobenzensulfonátem jak se popisuje v publikaci Plapp et al., Activity of bovine pancreatic deoxyribonuclease A with modified amino groups. 1971, J. Biol. Chem. 246, 939-845.

#### Acetylace:

Erythropoetin (100  $\mu\text{g}$ ) se inkuboval v 0,3 M fosforečnanovém pufru (pH 7,2), který obsahuje stejné množství anhydridu kyseliny octové při teplotě 0 °C po dobu 1 hodina. Reakce se zastavila dialýzou proti destilované vodě.

#### Sukcinylace:

Erythropoetin (100  $\mu\text{g}$ ) v 0,5 M  $\text{NaHCO}_3$  (pH 8) se inkuboval s 15 molárním nadbytkem sukcinanhydridu při teplotě 15 °C po dobu 1 hodiny. Reakce se zastavila dialýzou proti destilované vodě.

#### Úpravy argininu:

Erythropoetin se upravil 2,3-butandionem, jak se popisuje v publikaci Riordan J.F., Functional arginyl residues in carboxypeptidase A. Modification with butanedione. Biochemistry 1973, 12(20):3915-3923.

Erythropoetin se upravil cyklohexynonem, jak se popisuje v publikaci Patthy, L., Smith E.L. et al., Identification of functional arginine residues in ribonuclease A and lysozyme. J. Biol. Chem 1975, 250(2):565-9.

Erythropoetin se upravil fenylglyoxalem, jak se popisuje v publikaci Werber, M.M., Sokolovsky M., Proceedings: Carboxypeptidase B: modification of functional arginyl residues. Isr. j. Med. Sci 1975, 11(11):1169-70.

#### Úpravy tyrozinu:

Erythropoetin (100 µg) se inkuboval tetranitrometanem, jak se popisuje v publikaci Nestler et al., Stimulation of rat ovarian cell steroidogenesis by high density lipoproteins modified with tetranitromethane, Nestler J.E., Chacko, G.K., Strauss J.F., 3<sup>rd</sup>. J. Biol. Chem. 1985, Jun 25, 260(12):7316-21.

#### Úpravy glutamové kyseliny (a kyseliny asparágové):

Za účelem upravit karboxylové skupiny, se erythropoetin (100 µg) inkuboval s 0,02 M EDC v 1 M glycinamidu s hodnotou pH 4,5 při teplotě místnosti a po dobu 60 minut, jak se popisuje v publikaci Carraway K.L., Spoerl P., Koshland D.E., Jr., J. Mol. Biol. 1969, May 28, 42(1):133-7.

#### Úpravy tryptofanu:

Erythropoetin (100 µg) se inkuboval s 20 µM n-bromosukcinimidem v 20 mM pufru fosforečnanu draselného (pH 6,5) při teplotě místnosti, jak se popisuje v publikaci Ali et al., J. Biol. Chem. 1995, Mar. 3, 270(9):4570-4. Řada oxidovaných tryptofanových zbytků se stanovila způsobem popsáným v publikaci Korotchkina. L.G. et al., Protein Expr. Purif. 1995: Feb. 6(1):79-90.

#### Odstranění aminoskupin:

Za účelem odstranění aminoskupin se erythropoetin (100 µg) inkuboval s PBS (pH 7,4) obsahujícím 20 mM ninhydrinu (Pierce Chemical, Rockford, IL) při teplotě 37 °C po dobu 2 hodiny, jak se popisuje v publikaci Kokkini et al., Modification of hemoglobin by ninhydrin. Blood, vol. 556, No 4, 1980:701-705). Redukce výsledného anhydridu se provedla reakcí produktu s tetrahydroboritanem sodným nebo hydridem litno-hlinitým. Specificky, erythropoetin (100 µg) se inkuboval s 0,1 M tetrahydroboritanem sodným v PBS po dobu 30 minut při teplotě místnosti. Redukce se ukončila ochlazením vzorku na ledu po

dobu 10 minut a dialýzou proti PBS (3 krát) přes noc (popisuje se v publikaci Kokkini, G., Blood, vol. 556, No. 4, 1980:701-705). Redukce za použití hydridu litno-hlinitého se provedla inkubací erytropoetinu (100 µg) s 0,1 M hydridu litno-hlinitého v PBS po dobu 30 minut při teplotě místnosti. Redukce se ukončila ochlazením vzorků na ledu po dobu 10 minut a dialýzou proti PBS (3 krát) přes noc.

Redukce disulfidem a stabilizace:

Erytropoetin (100 µg) se inkuboval s 500 mM DTT po dobu 15 minut při teplotě 60 °C. Ke směsi se pak přidal 20 mM jodacetamid ve vodě a inkuboval se po dobu 25 minut při teplotě místnosti ve tmě.

Omezená proteolýza:

Erytropoietin se vystavil působení omezené chemické proteolýzy, která je zaměřena na specifické zbytky. Erytropoetin reagoval s 2-(2-nitrofenylsulfenyl)-3-metyl-3'-bromindoleninem, který specificky štěpí po tryptofanových zbytcích v 50-ti násobném nadbytku v 50 % kyselině octové po dobu 48 hodin ve tmě při teplotě místnosti ve zkumavkách uzavřených atmosférou dusíku. Reakce se ukončila tryptofanem a odstraněním solí.

Příklad 6: Předcházení retinální ischemii periferně aplikovaným erytropoetinem

Retinální buňky jsou velmi citlivé vůči ischemii tak, že řada odumírá po 30 minutách ischemického stresu. Při subakutní nebo chronická ischemii dochází k degeneraci zraku, což je doprovázeno řadou běžných lidských onemocnění, jako je cukrovka, glaukom a makulární degenerace. V současné době neexistuje žádná účinná terapie na ochranu buněk před ischemií. Mezi krví a sítnicí existuje endoteliální bariéra,

která znemožňuje průchod největších molekul. Aby se testovalo, zda periferně aplikovaný erytropoetin bude chránit buňky citlivé vůči ischemii, akutní reverzibilní krysí model glaukomu se využívá, jak se popisuje v publikaci Rosenbaum et al. 1997, Vis. Res. 37:3443-51. Fyziologický roztok se zavedl injekcí do přední oční komory dospělých samců krys, aby se dosáhl shora uvedený systémový arteriální tlak a udržoval se po dobu 60 minut. 24 hodin před vyvoláním ischemie se zvířatům aplikoval fyziologický roztok nebo 5 000 jednotek erytropoetinu na jeden kilogram tělesné hmotnosti intraperitoneálně a pak se s aplikací pokračovalo po dobu 3 dní. Jeden týden po léčbě se provedl elektroretinograf u myší adaptovaných na tmu. Obr. 11 až 12 ukazuje, že aplikace erytropoetinu je spojena s dobrou konzervací elektroretinogramu (ERG) (panel D). U zvířat ošetřených samotným fyziologickým roztokem (panel C) dochází k zachování pouze mizivé funkce sítnice. Obr. 11 znázorňuje elektroretinogram amplitud vln a a b v případě skupin zvířat, kterým se aplikoval erytropoetin a fyziologický roztok a ukazuje podstatnou ochranu způsobenou erytropoetinem.

Příklad 7: Obnovovací účinky erytropoetinu v případě poškozené kognitivní funkce, ke které dochází poraněním mozku

Za účelem demonstrovat schopnost erytropoetinu obnovit poškozenou kognitivní funkci u myší způsobenou traumatem mozku, samicím myší Balb/c se způsobilo uzavřené poškození mozku, jak se popisuje v publikaci Brines et al., PNAS 2000, 97, 10295-10672 a o pět dní později se začalo s denní intraperitoneální aplikací 5 000 jednotek erytropoetinu na jeden kilogram tělesné hmotnosti. Dvanáct dní po zranění se u zvířat testovala kognitivní funkce v Morrisově vodním bludišti čtyřikrát za den. Zatímco jak ošetřená tak neošetřená zvířata

v testu příliš neprospívala (čas plavání přibližně 80 vteřin z možných 90 vteřin), Obr. 13 ukazuje, že zvířata ošetřená erytropoetinem byla lepší (při tomto vyjádření jsou negativní hodnoty lepší). Dokonce jestliže se počátek léčby erytropoetinem se oddálí na 30 dní po traumatu (Obr. 14), je možné stále prokázat obnovu kognitivní funkce.

#### Příklad 8: Kainitový model

V kainitovém neurotoxickém modelu se asialoerytropoetin aplikoval v souladu s protokolem popsáným v publikaci Brines et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2000, 97, 10295-10672 v dávce 5 000 jednotek na jeden kilogram tělesné hmotnosti intraperitoneálně 24 hodin před aplikací kainitu v koncentraci 25 mg/kg. Ukázalo se, že asialoerytropoetin je stejně účinný jako erytropoetin, jak je zobrazeno časem odumírání na Obr. 15.

Vynález není limitován rozsahem specifických popsáných provedení, které jsou míněny jako jednotlivé ilustrace jednotlivých aspektů vynálezu a vynález dále popisuje funkčně ekvivalentní metody a složky. Různé úpravy vynálezu vedle těch, které jsou popsány a zobrazeny zde v textu jsou pro odborníka zřejmé z předchozího popisu a obrázků. Takové úpravy spadají do rozsahu nároků.

## P A T E N T O V É   N Á R O K Y

1. Použití erythropoetinu vybraného ze skupiny zahrnující

- i) erythropoetin vykazující alespoň žádnou část kyseliny sialové,
- ii) erythropoetin vykazující alespoň žádný N-spojený nebo žádný O-spojený sacharid,
- iii) erythropoetin vykazující alespoň omezený obsah sacharidů v důsledku ošetření přirozeného erythropoietinu alespoň jednou glykozidázou,
- iv) erythropoetin se sacharidovou částí molekuly erythropoetinu mající alespoň glykosylační patern, který neodpovídá savci, v důsledku exprese rekombinantního erythropoetinu v buňkách, které nejsou savčí,
- v) erythropoetin má alespoň jeden nebo více oxidovaných sacharidů, které mohou být také chemicky redukovány,
- vi) erythropoetin mající alespoň jeden nebo více upravených argininových zbytků,
- vii) erythropoetin vykazující alespoň jeden nebo více upravených lyzinových zbytků nebo úpravu N-terminální aminoskupiny molekuly erythropoetinu,
- viii) erythropoetin vykazující alespoň upravený tyrozinový zbytek,
- ix) erythropoetin vykazující alespoň upravený zbytek kyseliny asparágové nebo glutamové,
- x) erythropoetin vykazující alespoň upravený tryptofanový zbytek,
- xi) erythropoetin vykazující alespoň jednu odstraněnou aminoskupinu,
- xii) erythropoetin vykazující otevření alespoň jedné z cysteinových vazeb v molekule erythropoetinu,
- xiii) erythropoetin vykazující alespoň jednu substituci alespoň jedné aminokyseliny a
- xiv) zkrácený erythropoetin

pro přípravu farmaceutického prostředku pro ochranu, uchování, zesílení nebo obnovu funkce nebo životaschopnosti savčích buněk odpovídajících na erytropoetin a jejich asociovaných buněk, tkání a orgánů.

2. Použití podle nároku 1, kde uvedený erytropoetin je asialoerytropoetin.
3. Použití podle nároku 2, kde uvedený asialoerytropoetin je lidský asialoerytropoetin.
4. Použití podle nároku 1, kde uvedený erytropoetin nemá žádný N-spojené sacharidy.
5. Použití podle nároku 1, kde uvedený erytropoetin nemá žádný O-spojený sacharid.
6. Použití podle nároku 1, kde uvedený erytropoetin je ošetřený alespoň jednou glykozidázou.
7. Použití podle nároku 1, kde uvedený erytropoetin se exprimuje v hmyzí nebo rostlinné buňce.
8. Použití podle nároku 1, kde uvedený erytropoetin je erytropoetin oxidovaný jodistanem.
9. Použití podle nároku 8, kde uvedený erytropoetin oxidovaný jodistanem se chemicky redukuje kyanotetrahydroboritan sodným.
10. Použití podle nároku 1, kde uvedený erytropoetin obsahuje R-glyoxalovou část na jednom nebo více argininových zbytcích, přičemž symbol R je arylová nebo alkylová část.

11. Použití podle nároku 10, kde uvedený erythropoetin je fenylglyoxalerythropoetin.
12. Použití podle nároku 1, kde argininový zbytek uvedeného erythropoetinu se upravit reakcí s vicinálním diketonem vybraným ze skupiny obsahující 2,3-butandion a cyklohexandion.
13. Použití podle nároku 1, kde argininový zbytek uvedeného erythropoetinu reaguje s 3-deoxyglukosonem.
14. Použití podle nároku 1, kde uvedená molekula erythropoetinu vykazuje alespoň jeden biotinylovaný lizin nebo N-terminální aminoskupinu.
15. Použití podle nároku 14, kde uvedená molekula erythropoetinu je biotinylovaný erythropoetin.
16. Použití podle nároku 1, kde uvedený erythropoetin je glucitolyllyzinerythropoetin nebo fruktosyllyzinerythropoetin.
17. Použití podle nároku 1, kde lyzinový zbytek uvedeného erythropoetinu je upraven karbamylem.
18. Použití podle nároku 1, kde lyzinový zbytek uvedeného erythropoetinu je acylován.
19. Použití podle nároku 18, kde lyzinový zbytek uvedeného erythropoetinu je acetylován.
20. Použití podle nároku 18, kde lyzinový zbytek uvedeného erythropoetinu je upraven sukcinylem.

21. Použití podle nároku 1, kde lyzinový zbytek uvedeného erythropoetinu se upravil 2,4,6-trinitrobenzensulfonátem sodným nebo jinou jeho solí.
22. Použití podle nároku 1, kde tyrozinový zbytek uvedeného erythropoetinu je nitrovaný nebo jodovaný.
23. Použití podle nároku 1, kde zbytek kyseliny asparágové nebo glutamové uvedeného erythropoetinu reagoval s karbodiimidem a pak následuje reakce s aminem.
24. Použití podle nároku 21, kde uvedený amin je glycinamid.
25. Použití podle nároku 1, kde buňkou odpovídající na erythropoetin nebo tkání jsou neuronové, retinální, svalové, srdeční, plicní, jaterní, ledvinové, kapilární endoteliální nebo endometriální buňky a tkáň a buňky tenkého střeva, kůry nadlebinek, dřene nadledvin, varlat, vaječníků.
26. Farmaceutický prostředek, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e obsahuje účinné množství erythropoetinu pro ochranu, uchování, zesílení nebo obnovu buněk odpovídajících na erythropoetin, který se vybral ze skupiny zahrnující
- i) erythropoetin vykazující alespoň žádnou část kyseliny sialové,
  - ii) erythropoetin vykazující alespoň žádný N-spojený nebo žádný O-spojený sacharid,
  - iii) erythropoetin vykazující alespoň omezený obsah sacharidů v důsledku ošetření přirozeného erythropoietinu alespoň jednou glykozidázou,
  - iv) erythropoetin se sacharidovou částí molekuly erythropoetinu mající alespoň glykosylační patern, který neodpovídá

- savci, v důsledku exprese rekombinantního erytropoetinu v buňkách, které nejsou savčí,
- v) erytropoetin má alespoň jeden nebo více oxidovaných sacharidů, které také mohou být chemicky redukovány,
  - vi) erytropoetin mající alespoň jeden nebo více upravených argininových zbytků,
  - vii) erytropoetin vykazující alespoň jeden nebo více upravených lyzinových zbytků nebo úpravu N-terminální aminoskupiny molekuly erytropoetinu,
  - viii) erytropoetin vykazující alespoň upravený tyrozinový zbytek,
  - ix) erytropoetin vykazující alespoň upravený zbytek kyseliny asparagové nebo glutamové,
  - x) erytropoetin vykazující alespoň upravený tryptofanový zbytek,
  - xi) erytropoetin vykazující alespoň jednu odstraněnou aminoskupinu,
  - xii) erytropoetin vykazující otevření alespoň jedné z cysteinových vazeb v molekule erytropoetinu,
  - xiii) erytropoetin vykazující alespoň jednu substituci alespoň jedné aminokyseliny a
  - xiv) zkrácený erytropoetin.

27. Farmaceutický prostředek podle nároku 26, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e uvedený erytropoetin je asialoerytropoetin nebo fenylglyoxalerytropoetin.

28. Použití erytropoetinu při přípravě farmaceutického prostředku pro ochranu, zachování, zesílení nebo obnovu funkce nebo životaschopnosti buňky odpovídající na erytropoetin nebo její asociovaných buněk, tkání nebo orgánů, přičemž uvedené buňky, tkáně nebo orgány nejsou

dráždivé buňky, tkáně nebo orgány nebo převážně neobsahují dráždivé buňky nebo tkáně.

29. Použití podle nároku 28, kde uvedeným erytropoetinem je erytropoetin nebo přirozený erytropoetin nebo jeho analog, napodobenina a fragment, hybridní molekula, molekula vázající se na receptor erytropoetinu, agonista erytropoetinu, renální erytropoetin, mozkový erytropoetin, jeho oligomer, multimer, mutein, jeho obdoba, jeho přirozeně se vyskytující forma, jeho syntetická forma, jeho rekombinantní forma, jeho glykosylační varianta, jeho deglykosylovaná varianta nebo jejich kombinace.

30. Použití podle nároku 28, kde uvedený erytropoetin je fenylglyoxalerytropoetin.

31. Způsob ochrany, zachování nebo zesílení životaschopnosti buňky, tkáně nebo orgánu izolovaného z těla savce, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e zahrnuje expozici uvedené buňky, tkáně nebo orgánu farmaceutickému prostředku, který obsahuje erytropoetin.

32. Způsob podle nároku 31, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e uvedeným erytropoetinem je erytropoetin nebo přirozený erytropoetin nebo jeho analog, napodobenina a fragment, hybridní molekula erytropoetinu, molekula vázající se na receptor erytropoetinu, agonista erytropoetinu, renální erytropoetin, mozkový erytropoetin, jeho oligomer, multimer, mutein, jeho obdoba, jeho přirozeně se vyskytující forma, jeho syntetická forma, jeho rekombinantní forma, jeho glykosylační varianta, jeho deglykosylovaná varianta nebo jejich kombinace.

33. Způsob podle nároku 32, v y z n a č u j í c í s e t í m,  
ž e uvedeným erythropoetinem je

- i) erythropoetin vykazující alespoň žádnou část kyseliny sialové,
- ii) erythropoetin vykazující alespoň žádný N-spojený nebo žádný O-spojený sacharid,
- iii) erythropoetin vykazující alespoň omezený obsah sacharidů v důsledku ošetření přirozeného erythropoetinu alespoň jednou glykozidázou,
- iv) erythropoetin se sacharidovou částí molekuly erythropoetinu mající alespoň glykosylační patern, který neodpovídá savci, v důsledku exprese rekombinantního erythropoetinu v buňkách, které nejsou savčí,
- v) erythropoetin vykazující alespoň jeden nebo více oxidovaných sacharidů, které mohou být také chemicky redukovány,
- vi) erythropoetin mající alespoň jeden nebo více upravených argininových zbytků,
- vii) erythropoetin vykazující alespoň jeden nebo více upravených lyzinových zbytků nebo úpravu N-terminální aminoskupiny molekuly erythropoetinu,
- viii) erythropoetin vykazující alespoň upravený tyrozinový zbytek,
- ix) erythropoetin vykazující alespoň upravený zbytek kyseliny asparágové nebo glutamové,
- x) erythropoetin vykazující alespoň upravený tryptofanový zbytek,
- xi) erythropoetin vykazující alespoň jednu odstraněnou aminoskupinu,
- xii) erythropoetin vykazující otevření alespoň jedné z cysteinových vazeb v molekule erythropoetinu,
- xiii) erythropoetin vykazující alespoň jednu substituci alespoň jedné aminokyseliny nebo
- xiv) zkrácený erythropoetin.

34. Způsob podle nároku 31, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e uvedeným erythropoetinem je lidský erythropoetin.
35. Způsob podle nároku 31, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e uvedeným erythropoetinem je fenylglyoxalerythropoetin.
36. Použití erythropoetinu vybraného ze skupiny zahrnující erythropoetin nebo přirozený erythropoetin nebo jeho analog, napodobeninu a fragment, hybridní molekulu, molekulu vázající se na receptor erythropoetinu, agonistu erythropoetinu, renální erythropoetin, mozkový erythropoetin, jeho oligomer, multimer, mutein, jeho obdobu, jeho přirozeně se vyskytující formu, jeho syntetickou formu, jeho rekombinantní formu, jeho glykosylační variantu, jeho deglykosylovanou variantu nebo jejich kombinace při přípravě farmaceutického prostředku pro obnovu kognitivní funkce u savce.
37. Použití podle nároku 36, kde porucha kognitivní funkce je výsledkem zranění způsobené záchvatovými poruchami, roztroušenou sklerózou, mrtvicí, vysokým tlakem, zástavou srdce, ischemií, infarktem myokardu, záněty, ztrátou kognitivní funkce způsobnou stářím, poškozením radiací, mozkovou obrnou, neurodegenerativním onemocněním, Alzheimerovou nemocí, Parkinsonovou nemocí, Leighovou nemocí, AIDS demencí, ztrátou paměti, amyotrofní laterální sklerózou, alkoholizmem, poruchami nálady, stavy úzkosti, poruchami pozornosti, autizmem, Creutzfeld-Jakobovou nemocí, traumatem mozku a míchy, nebo ischemií, bypassem srdce-plíce, chronickým selháním srdce, degenerací makuly, diabetickou neuropatií, diabetickou retinopatií, glaukomem, retinální ischemií nebo poškozením sítnice.

38. Použití podle nároku 36, kde uvedený erythropoetin je fenylglyoxalerythropoetin.

39. Použití podle nároku 39, kde uvedeným erythropoetinem je

- i) erythropoetin vykazující alespoň žádnou část kyseliny sialové,
- ii) erythropoetin vykazující alespoň žádný N-spojený nebo žádný O-spojený sacharid,
- iii) erythropoetin vykazující alespoň omezený obsah sacharidů v důsledku ošetření přirozeného erythropoetinu alespoň jednou glykozidázou,
- iv) erythropoetin se sacharidovou částí molekuly erythropoetinu mající alespoň glykosylační patern, který neodpovídá savci, v důsledku exprese rekombinantního erythropoetinu v buňkách, které nejsou savčí,
- v) erythropoetin vykazující alespoň jeden nebo více oxidovaných sacharidů, které mohou také být chemicky redukovány,
- vi) erythropoetin mající alespoň jeden nebo více upravených argininových zbytků,
- vii) erythropoetin vykazující alespoň jeden nebo více upravených lyzinových zbytků nebo úpravu N-terminální aminoskupiny molekuly erythropoetinu,
- viii) erythropoetin vykazující alespoň upravený tyrozinový zbytek,
- ix) erythropoetin vykazující alespoň upravený zbytek kyseliny asparágové nebo glutamové,
- x) erythropoetin vykazující alespoň upravený tryptofanový zbytek,
- xi) erythropoetin vykazující alespoň jednu odstraněnou aminoskupinu,
- xii) erythropoetin vykazující otevření alespoň jedné z cysteinových vazeb v molekule erythropoetinu,

- xiii) erytropoetin vykazující alespoň jednu substituci alespoň jedné aminokyseliny nebo
- xiv) zkrácený erytropoetin.

40. Způsob umožňující transcytózu molekuly přes endoteliální buněčnou bariéru v savci, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e zahrnuje aplikaci prostředku uvedenému savci, přičemž prostředek obsahuje uvedenou molekulu ve spojení s erytropoetinem vybraným ze skupiny obsahující

- i) erytropoetin vykazující alespoň žádnou část kyseliny sialové,
- ii) erytropoetin vykazující alespoň žádný N-spojený nebo žádný O-spojený sacharid,
- iii) erytropoetin vykazující alespoň omezený obsah sacharidů v důsledku ošetření přirozeného erytropoetinu alespoň jednou glykozidázou,
- iv) erytropoetin se sacharidovou částí molekuly erytropoetinu mající alespoň glykosylační patern, který neodpovídá savci, v důsledku exprese rekombinantního erytropoetinu v buňkách, které nejsou savčí,
- v) erytropoetin má alespoň jeden nebo více oxidovaných sacharidů, které také mohou být chemicky redukovány,
- vi) erytropoetin mající alespoň jeden nebo více upravených argininových zbytků,
- vii) erytropoetin vykazující alespoň jeden nebo více upravených lyzinových zbytků nebo úpravu N-terminální aminoskupiny molekuly erytropoetinu,
- viii) erytropoetin vykazující alespoň upravený tyrozinový zbytek,
- ix) erytropoetin vykazující alespoň upravený zbytek kyseliny asparágové nebo glutamové,
- x) erytropoetin vykazující alespoň upravený tryptofanový zbytek,

- xi) erythropoetin vykazující alespoň jednu odstraněnou aminoskupinu,
- xii) erythropoetin vykazující otevření alespoň jedné z cysteinových vazeb v molekule erythropoetinu,
- xiii) erythropoetin vykazující alespoň jednu substituci alespoň jedné aminokyseliny a
- xiv) zkrácený erythropoetin.

41. Způsob podle nároku 40, v y z n a č u j í c í s e t í m, že uvedeným spojením je labilní kovalentní vazba, stabilní kovalentní vazba nebo nekovalentní spojení s vazebným místem pro uvedenou molekulu.

42. Způsob podle nároku 40, v y z n a č u j í c í s e t í m, že uvedená endoteliální buněčná bariéra se vybrala ze skupiny obsahující hematoencefalickou bariéru, bariéru krev-oči, krev-varlata, krev-vaječníky, krev-placenta.

43. Způsob podle nároku 40, v y z n a č u j í c í s e t í m, že uvedená molekula je agonista receptoru nebo antagonistický hormon, neutrofní faktor, antimikrobiální činidlo, radiofarmakum, nesmyslný oligonukleotid, protilátka, imunosupresivní činidlo nebo lék proti zhoubnému bujení.

44. Prostředek pro transport molekuly prostřednictvím transcytózy přes endoteliální buněčnou bariéru, v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje uvedenou molekulu spojenou s erythropoetinem vybraným ze skupiny zahrnující

- i) erythropoetin vykazující alespoň žádnou část kyseliny sialové,
- ii) erythropoetin vykazující alespoň žádný N-spojený nebo žádný O-spojený sacharid,

- iii) erytropoetin vykazující alespoň omezený obsah sacharidů v důsledku ošetření přirozeného erytropoetinu alespoň jednou glykozidázou,
- iv) erytropoetin se sacharidovou částí molekuly erytropoetinu mající alespoň glykosylační patern, který neodpovídá savcí, v důsledku exprese rekombinantního erytropoetinu v buňkách, které nejsou savčí,
- v) erytropoetin má alespoň jeden nebo více oxidovaných sacharidů, které také mohou být chemicky redukovány,
- vi) erytropoetin mající alespoň jeden nebo více upravených argininových zbytků,
- vii) erytropoetin vykazující alespoň jeden nebo více upravených lyzinových zbytků nebo úpravu N-terminální aminoskupiny molekuly erytropoetinu,
- viii) erytropoetin vykazující alespoň upravený tyrozinový zbytek,
- ix) erytropoetin vykazující alespoň upravený zbytek kyseliny asparágové nebo glutamové,
- x) erytropoetin vykazující alespoň upravený tryptofanový zbytek,
- xi) erytropoetin vykazující alespoň jednu odstraněnou aminoskupinu,
- xii) erytropoetin vykazující otevření alespoň jedné z cysteinových vazeb v molekule erytropoetinu,
- xiii) erytropoetin vykazující alespoň jednu substituci alespoň jedné aminokyseliny a
- xiv) zkrácený erytropoetin.

45. Prostředek podle nároku 44, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e uvedené spojení je labilní kovalentní vazba, stabilní kovalentní vazba nebo nekovalentní spojení s vazebným místem pro uvedenou molekulu.

46. Prostředek podle nároku 44, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e uvedená molekula je agonista receptoru nebo antagonistický hormon, neutrofní faktor, antimikrobiální činidlo, radiofarmakum, nesmyslný oligonukleotid, protilátka, imunosupresivní činidlo nebo lék proti zhoubnému bujení.

47. Použití erytropoieitnu vybraného ze skupiny zahrnující

- i) erytropoetin vykazující alespoň žádnou část kyseliny sialové,
- ii) erytropoetin vykazující alespoň žádný N-spojený nebo žádný O-spojený sacharid,
- iii) erytropoetin vykazující alespoň omezený obsah sacharidů v důsledku ošetření přirozeného erytropoetinu alespoň jednou glykozidázou,
- iv) erytropoetin se sacharidovou částí molekuly erytropoetinu mající alespoň glykosylační patern, který neodpovídá savci, v důsledku exprese rekombinantního erytropoetinu v buňkách, které nejsou savčí,
- v) erytropoetin vykazující alespoň jeden nebo více oxidovaných sacharidů, které také mohou být chemicky redukovány,
- vi) erytropoetin mající alespoň jeden nebo více upravených argininových zbytků,
- vii) erytropoetin vykazující alespoň jeden nebo více upravených lyzinových zbytků nebo úpravu N-terminální aminoskupiny molekuly erytropoetinu,
- viii) erytropoetin vykazující alespoň upravený tyrozinový zbytek,
- ix) erytropoetin vykazující alespoň upravený zbytek kyseliny asparágové nebo glutamové,
- x) erytropoetin vykazující alespoň upravený tryptofanový zbytek,

- xi) erytropoetin vykazující alespoň jednu odstraněnou aminoskupinu,
- xii) erytropoetin vykazující otevření alespoň jedné z cysteinových vazeb v molekule erytropoetinu,
- xiii) erytropoetin vykazující alespoň jednu substituci alespoň jedné aminokyseliny a zkrácený erytropoetin spojený s molekulou pro přípravu farmaceutického prostředku pro transport uvedené molekuly prostřednictvím transcytózy přes endoteliální buněčnou bariéru.

48. Použití podle nároku 47, kde uvedené spojení je labilní kovalentní vazba, stabilní kovalentní vazba nebo nekovalentní spojení s vazebným místem pro uvedenou molekulu.

49. Použití podle nároku 47, kde uvedená molekula je agonista receptoru nebo antagonistický hormon, neutrofický faktor, antimikrobiální činidlo, radiofarmakum, nesmyslný oligonukleotid, protilátka, imunosupresivní činidlo nebo lék proti zhoubnému bujení.

50. Prostředek, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e zahrnuje erytropoetin oxidovaný jodistanem.

51. Prostředek, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e zahrnuje glucitolylyzinerytropoetin.

52. Prostředek, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e zahrnuje fruktosyllyzinerytropoetin.

53. Prostředek, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e zahrnuje 3-deoxyglukosonerytropoetin.

54. Prostředek, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e  
zahrnuje asialoerythropoetin upravený karbamylem.

55. Prostředek, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e  
zahrnuje biotinylovaný asialoerythropoetin.

56. Prostředek, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e  
zahrnuje sukcinylovaný asialoerythropoetin.

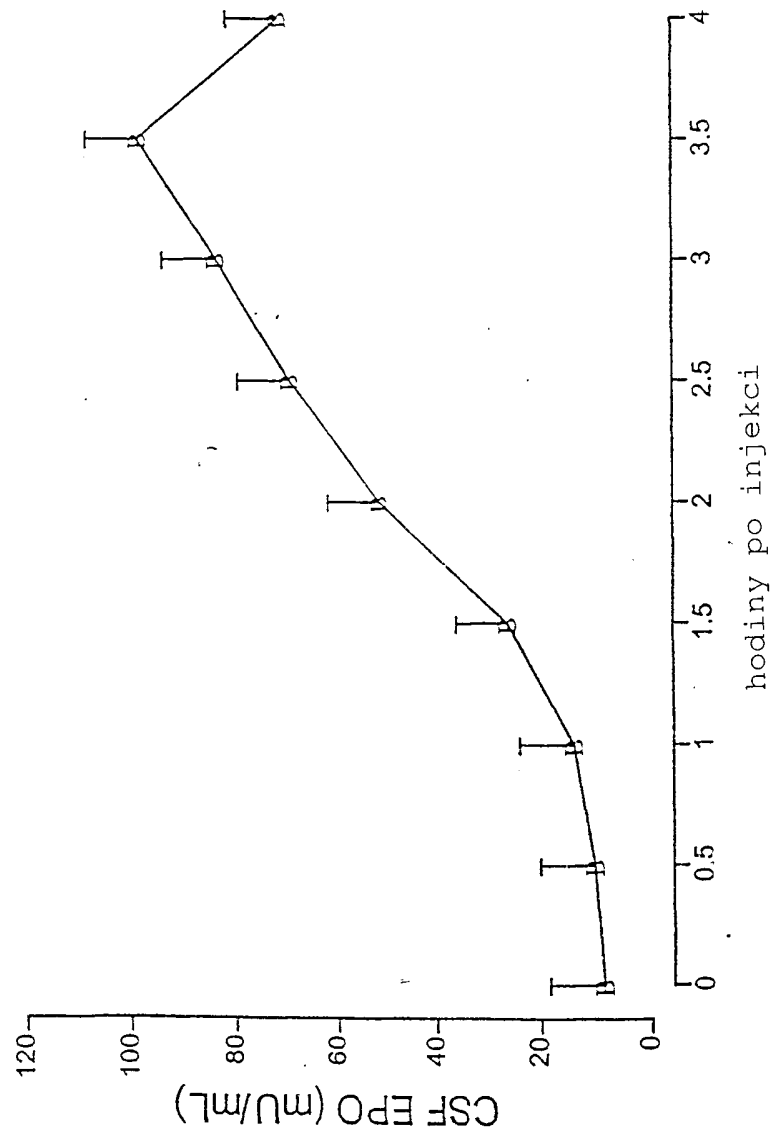
57. Prostředek, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e  
zahrnuje acetylovaný asialoerythropoetin.

08.10.03

Pv 2003-2059

Obr. 1

koncentrace kryšího CSF EPO po parenterální aplikaci rH-EPO (5  
000 jednotek na jeden kilogram tělesné hmotnosti I.P.)



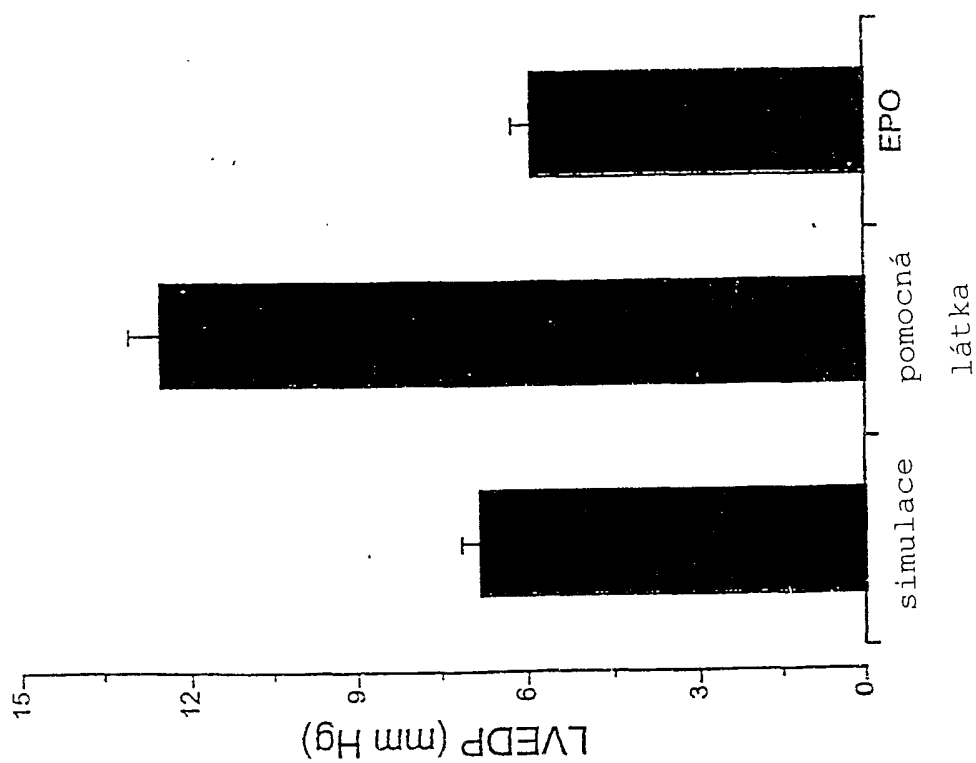
2,5 hodiny a déle  $p < 0,01$  ve srovnání se základními výsledky

08.10.03

Pr 2003 - 2059

Obr. 2

Krysí srdce 7 dní po 30 minutové ischemii

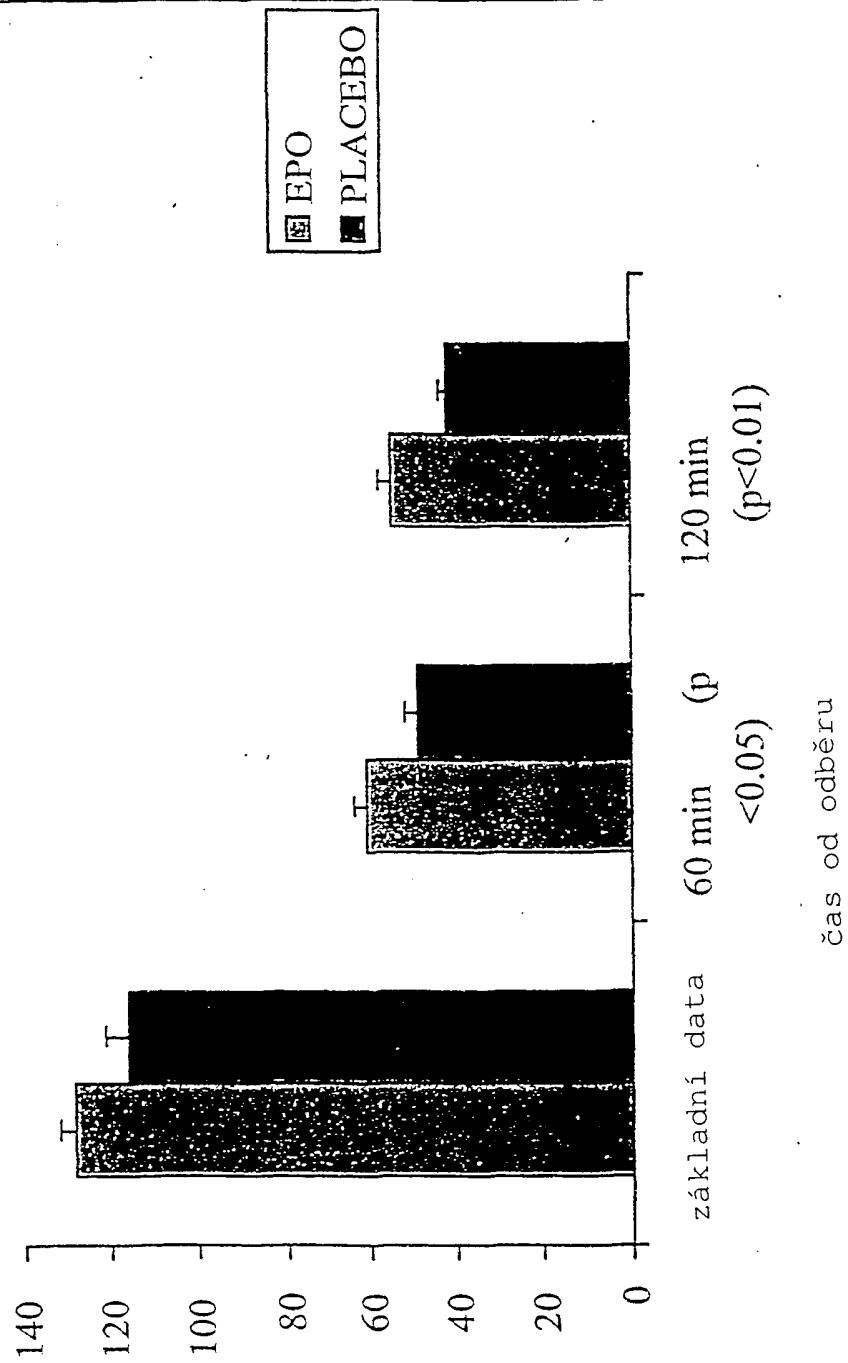


08.10.03

PV 2003-2059

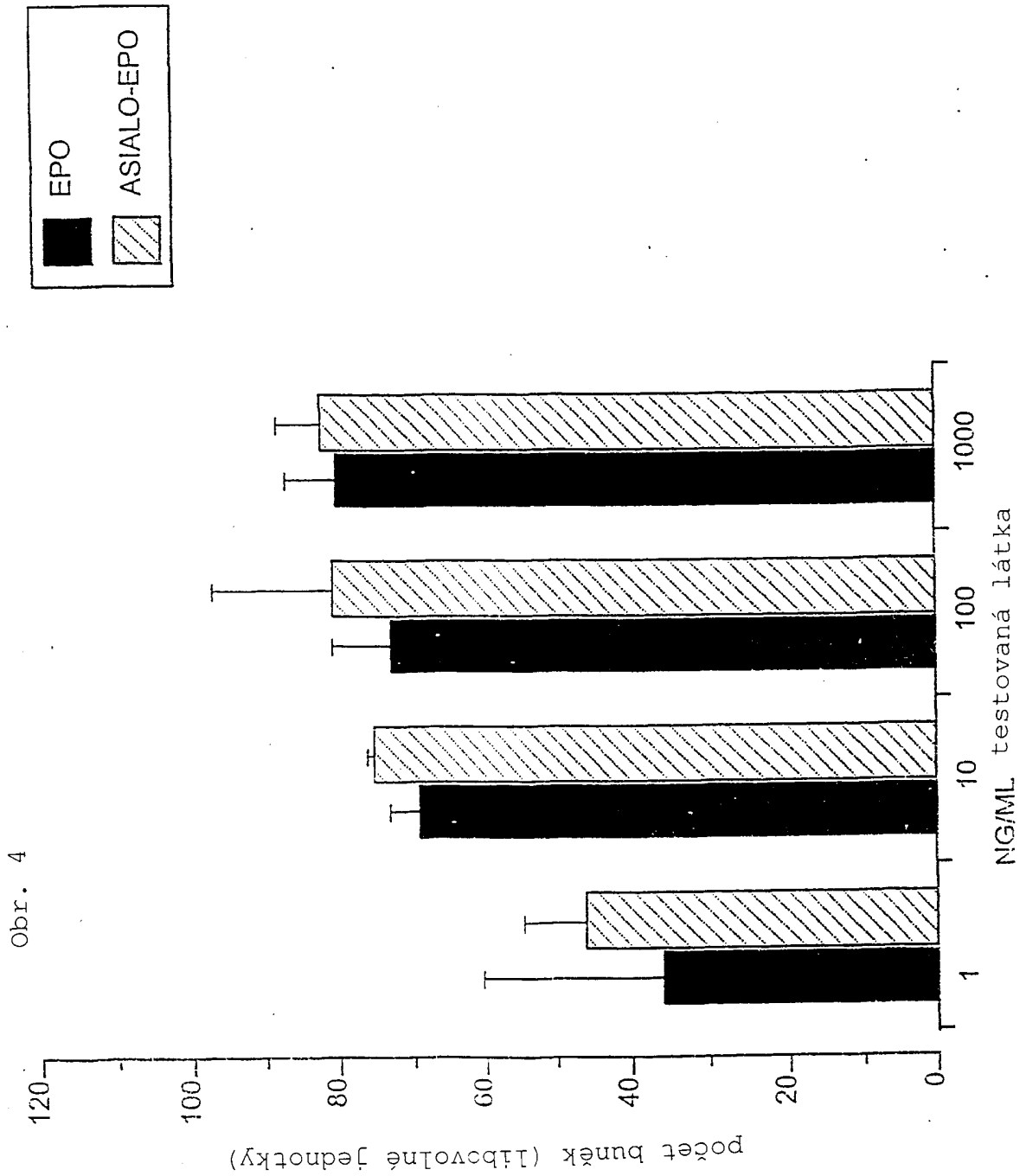
Obr. 3

Erythropoietin zlepšuje kardiální funkci u  
srdce odebraného pro transplantaci



08.10.03

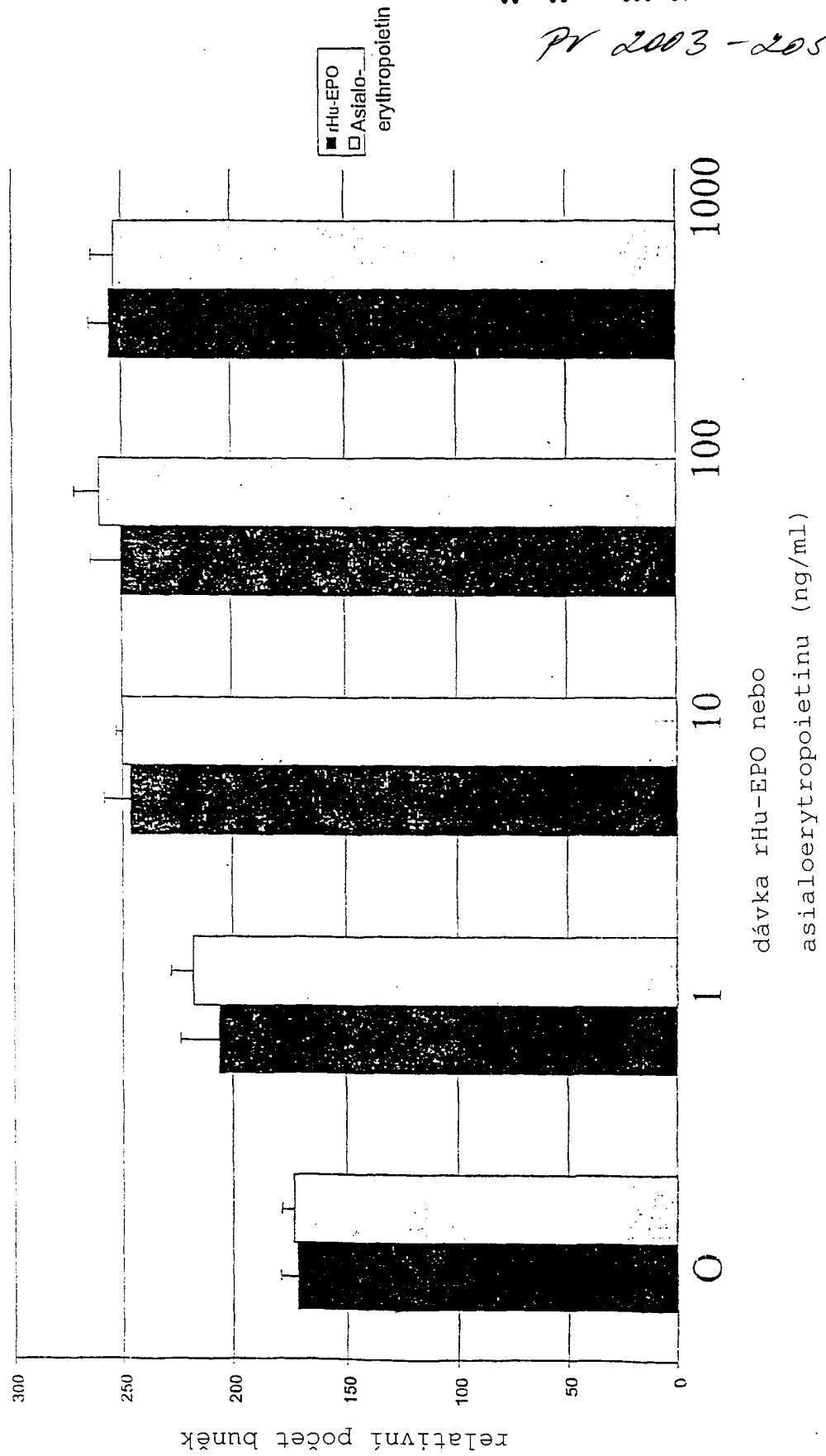
PV 2003-2059



08.10.03

Pr 2003-2059

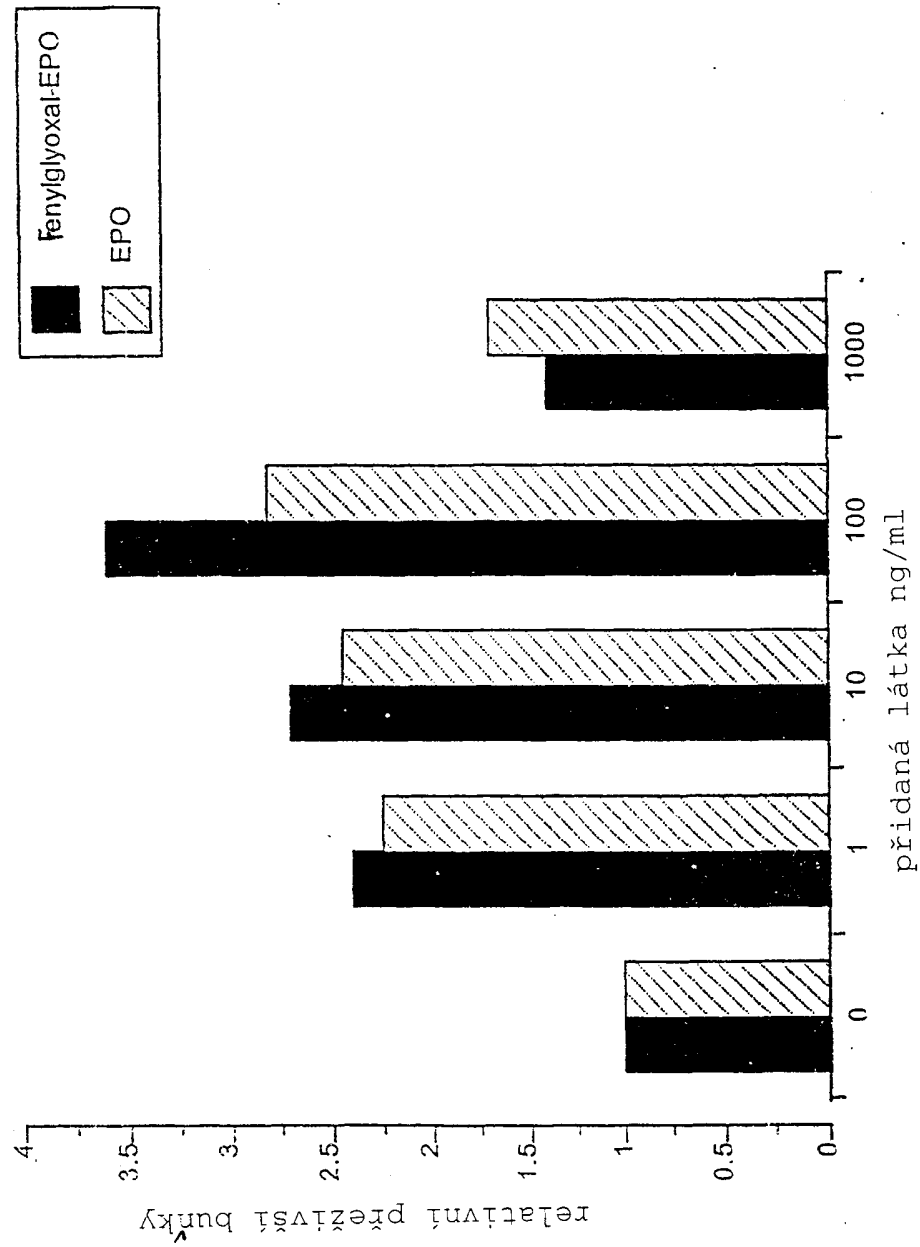
Obr. 5



08.10.03

PV 2003-2059

Obr. 6  
přežití buněk p19 po vyčerpání séra

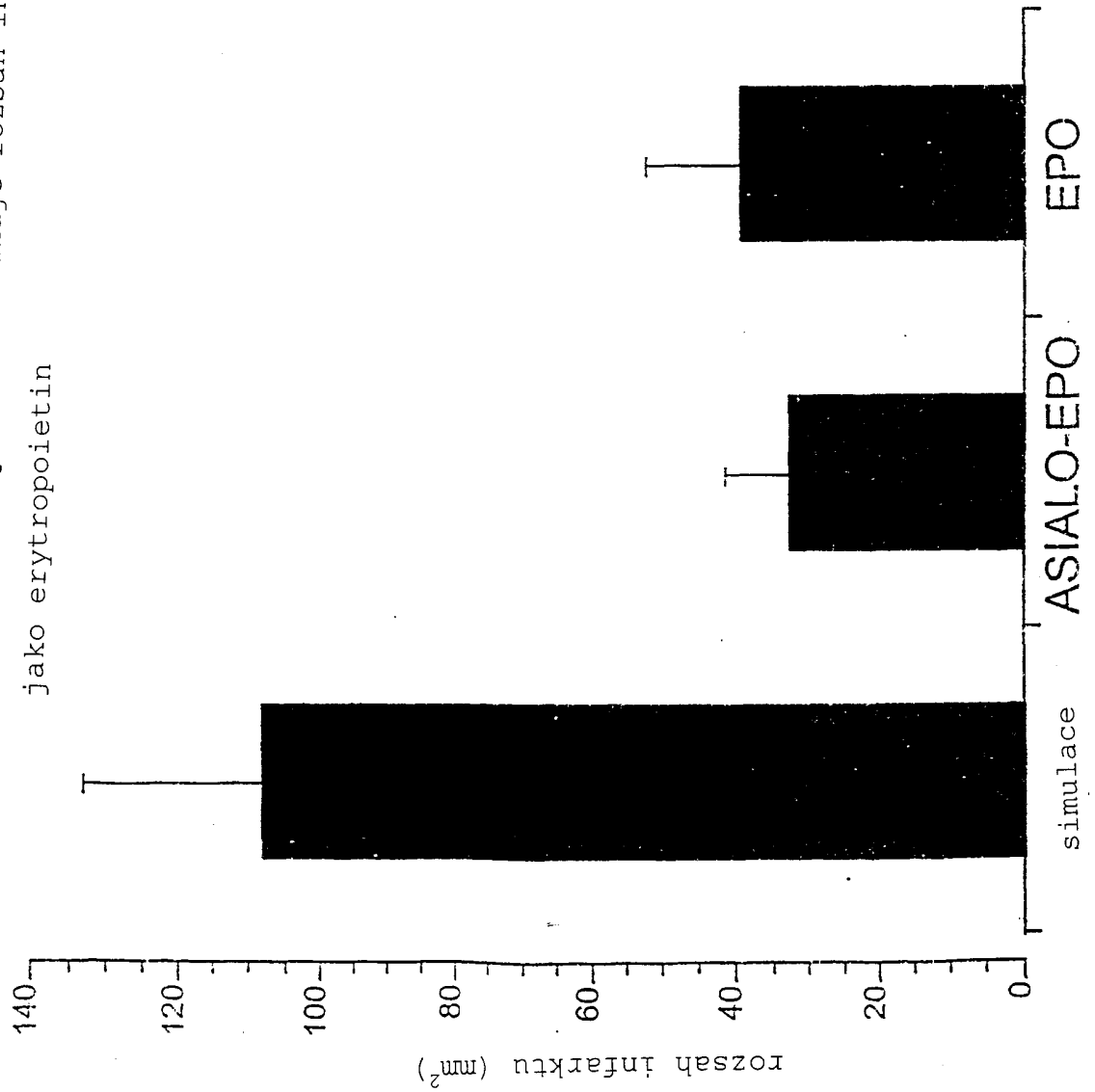


08.10.03

PV 2003 - 2059

Obr.7

asialoerythropoietin redukuje rozsah infarktu stejne  
jako erythropoietin

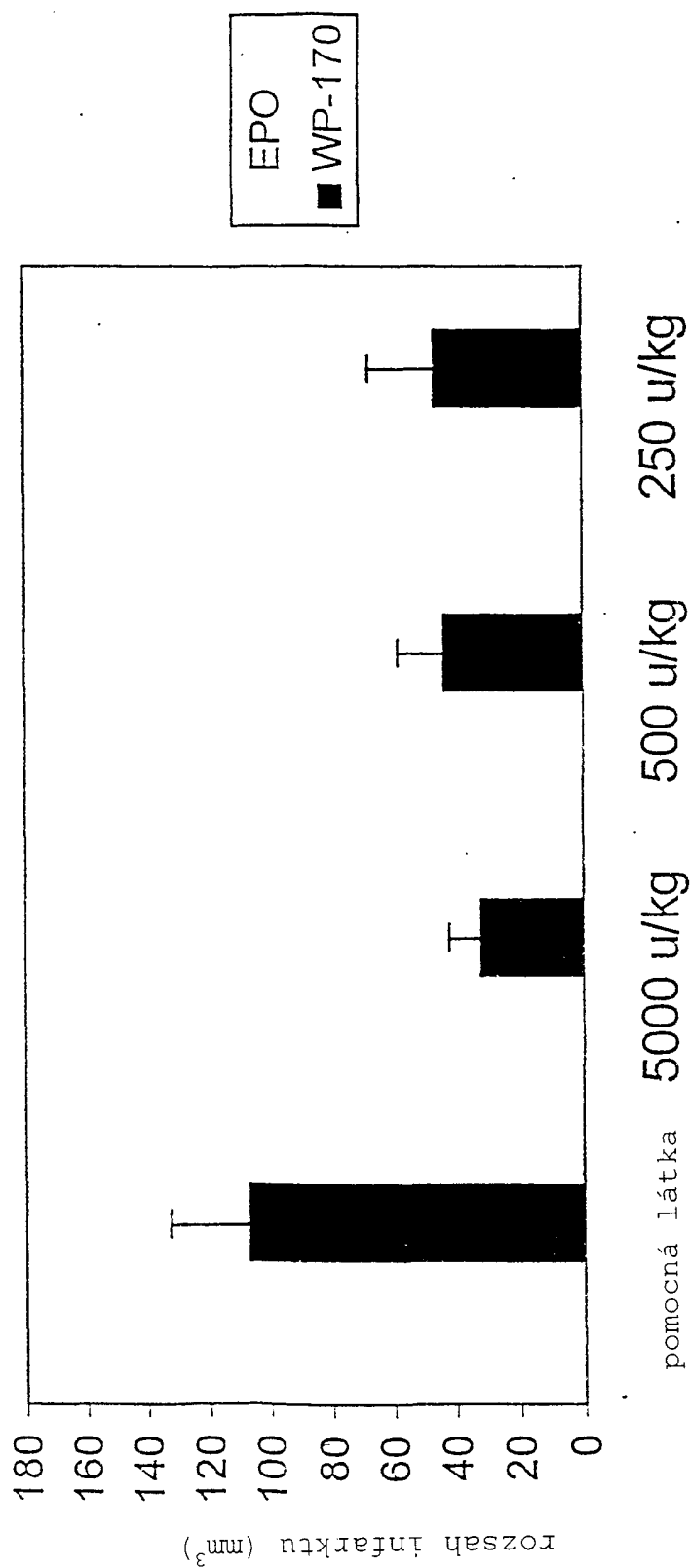


08.10.03

PV 2003 - 2059

Obr. 8

asialoerythropoietin (dávková odezva)



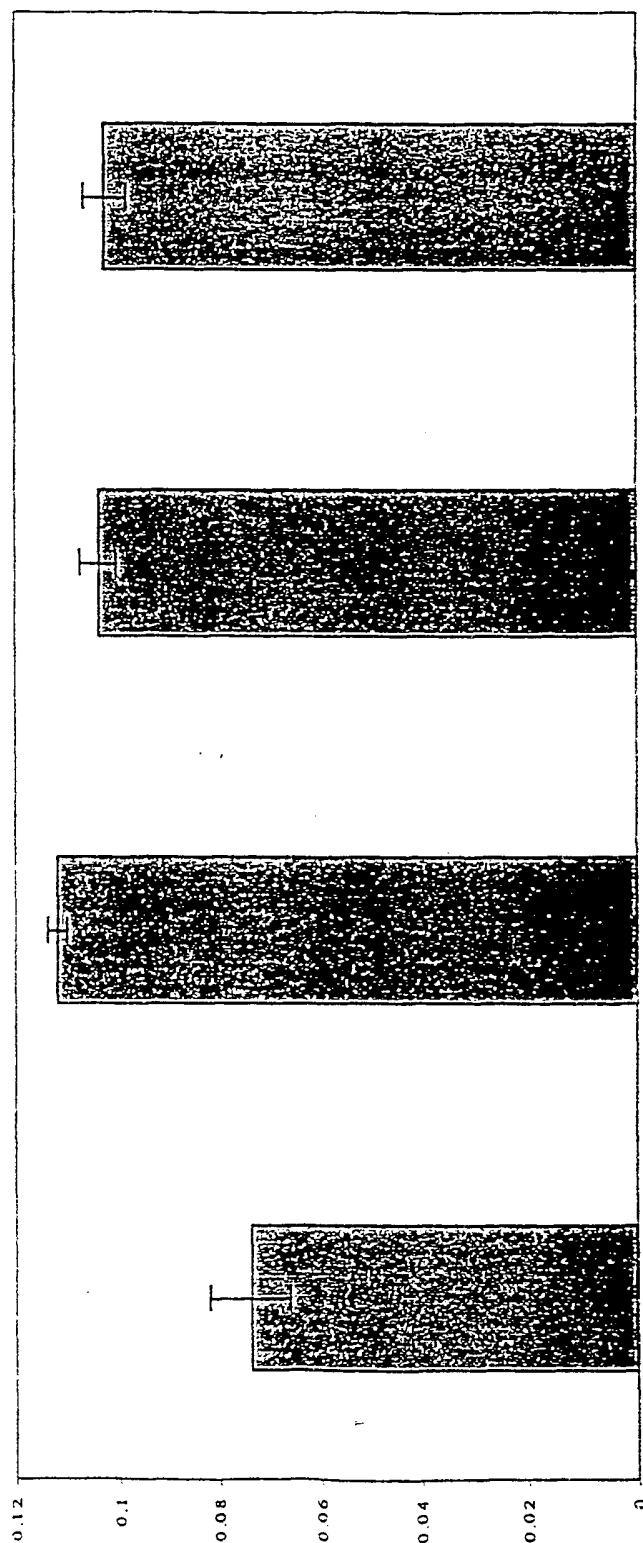
n pro každou skupinu je větší nebo rovno 4

08.10.03

Pr 2003-2059

Obr. 9

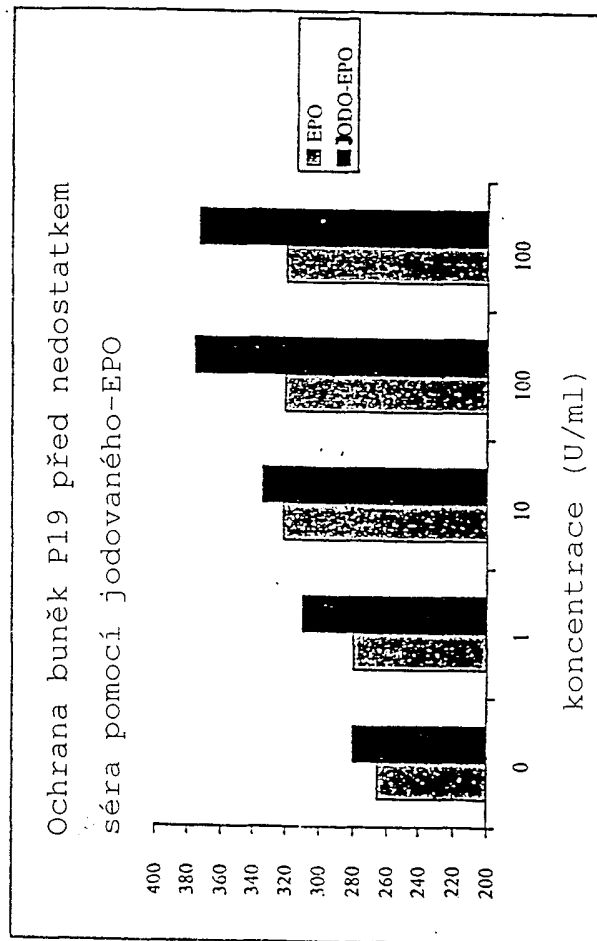
biotinylovaný-EPO a asialo-EPO si udržuje aktivitu v testu s buňkami P19



08.10.03

PV 2003-2059

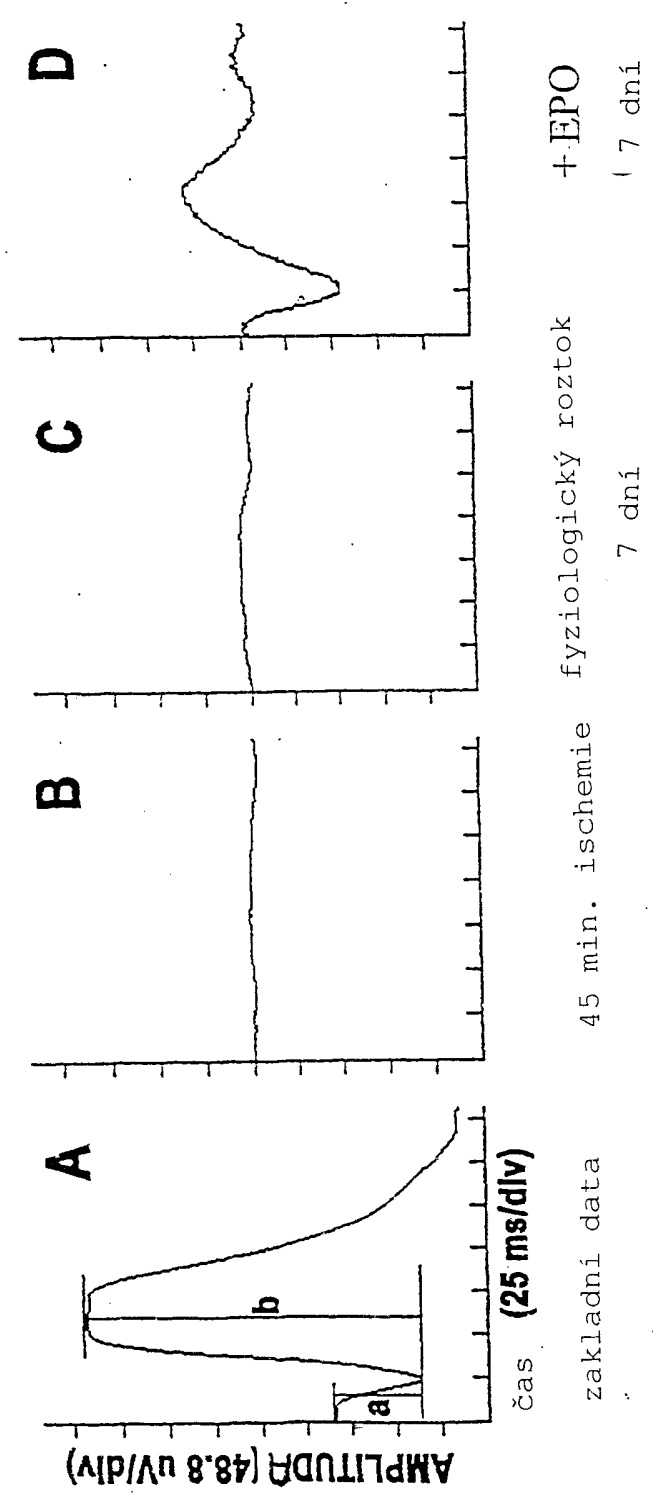
Obr. 10



08.10.03

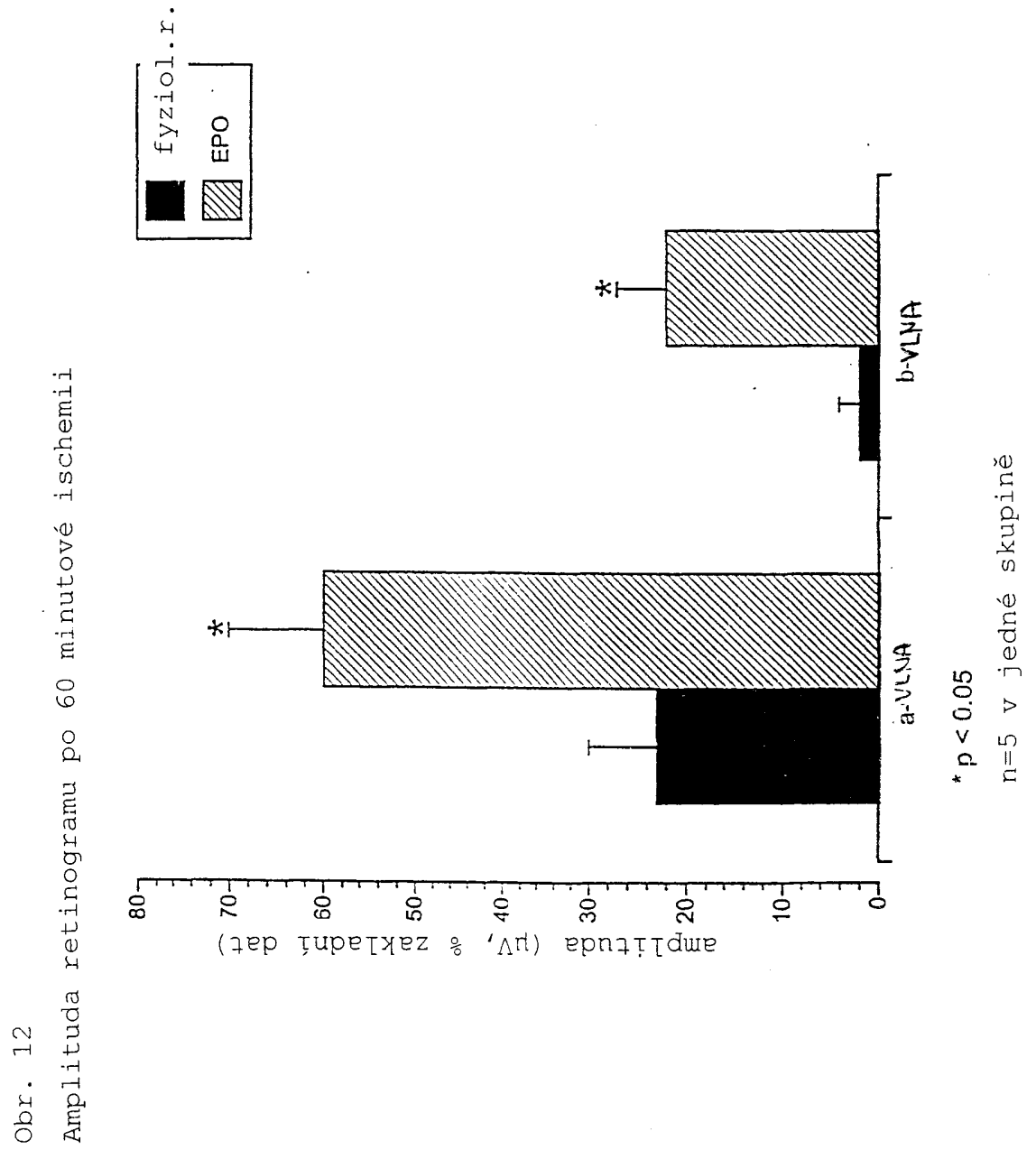
PV 2003-2059

Obr. 11  
Elektroretinogramy z krys vystavených 60 minutové ischemii



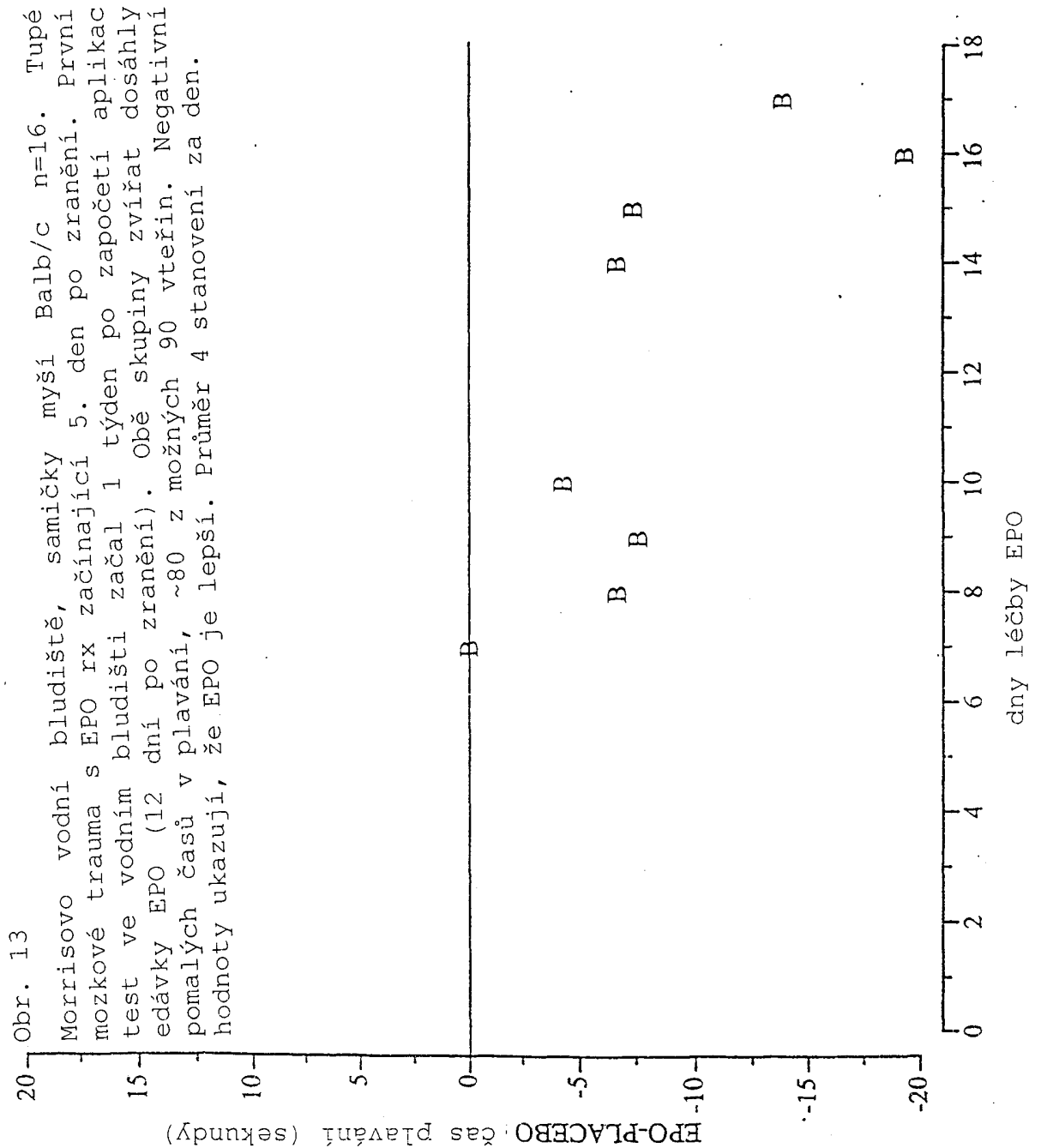
08.10.03

PV 2003 - 2059



08.10.03

PV 2003-2059

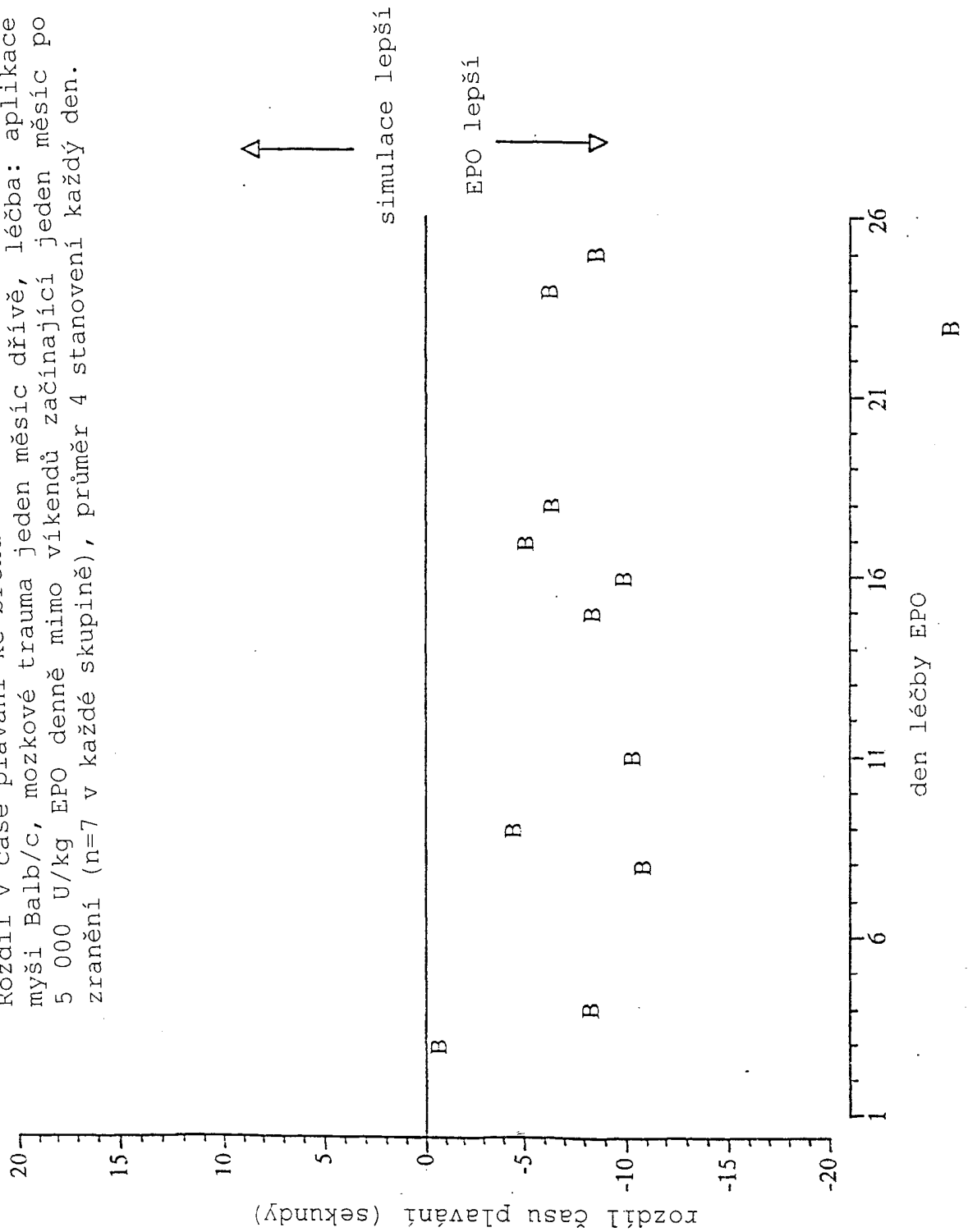


08.10.03

PV 2003-2059

Obr. 14

Rozdíl v čase plavání ke břehu v Morrisově vodním bludišti.  
 myši Balb/c, mozkové trauma jeden měsíc dříve, léčba: aplikace  
 5 000 U/kg EPO denně mimo víkendů začínající jeden měsíc po  
 zranění (n=7 v každé skupině), průměr 4 stanovení každý den.



08.10.03

PV 2003-2059

Kainitový model

Obr. 15

