



(19) REPUBLIKA HRVATSKA
DRŽAVNI ZAVOD ZA
INTELEKTUALNO VLASNIŠTVO



(10) Identifikator
dokumenta:

HR P20030515 A2

HR P20030515 A2

(12) PRIJAVA PATENTA

(51) Int. Cl.⁷: C 07 K 14/00
C 07 K 14/505

(21) Broj prijave u HR: P20030515A
(22) Datum podnošenja prijave patenta u HR: 24.06.2003.
(43) Datum objave prijave patenta u HR: 30.04.2005.
(86) Broj međunarodne prijave: PCT/US01/49479
Datum podnošenja međunarodne prijave: 28.12.2001.
(87) Broj međunarodne objave: WO 02/053580
Datum međunarodne objave: 11.07.2002.

(31) Broj prve prijave: 60/259,245
09/753,132

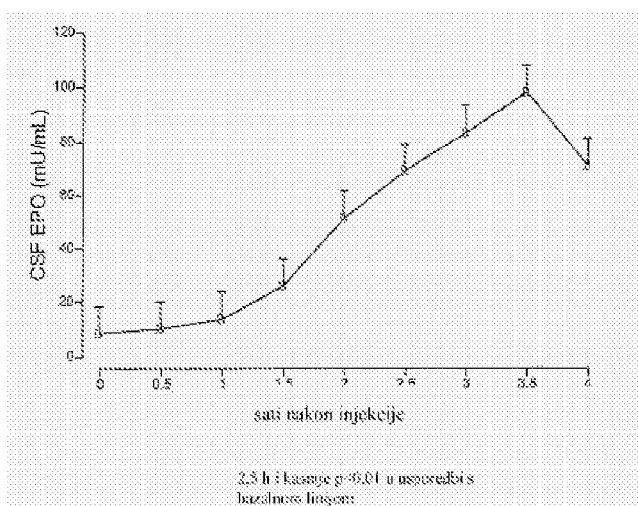
(32) Datum podnošenja prve prijave: 29.12.2000.
29.12.2000.

(33) Država ili organizacija podnošenja prve prijave: US
US

(71) Podnositelj prijave: The Kenneth S. Warren Institute, Inc., 712 Kitchawan Road, Ossining, 10562 NY, US
(72) Izumitelji: Michael Brines, 1 Wepawaug Road, Woodbridge, 06525 CT, US
Anthony Cerami, 170 Mercer Street, New York, 10012 NY, US
Carla Cerami, 121 Farrington Avenue, Sleepy Hollow, 10591 NY, US
(74) Punomoćnik: Hraste & Partneri odvjetničko društvo, Zagreb, HR

(54) Naziv izuma: **ZAŠTITA, OBNAVLJANJE I POVEĆANJE STANICA, TKIVA I ORGANA KOJI REAGIRAJU NA ERITROPOETIN**

(57) Sažetak: Dani su postupci i pripravci za zaštitu ili povećanje stanica koje reagiraju na eritropoetin, te utječu na funkciju ili vijabilnost tkiva, organa ili dijela tijela in vivo, in situ ili ex vivo u sisavaca, uključujući ljudska bića, sistemskim ili lokalnim davanjem modulatora aktivnosti eritropoetskog receptora, kao što su eritropoetin ili modificirani eritropoetin.



HR P20030515 A2

OPIS IZUMA

Prednost privremene prijave br. 60/259 245 podnesene 29. prosinca 2000., koja je ovdje u potpunosti uključena referencom, zahtijevana je u 35 U.S.C. § 119(e)(1).

Podloga izuma

Dugo vremena je jedina poznata fiziološka uloga eritropoetina bila kontrola proizvodnje crvenih krvnih stanica. Odnedavno, na temelju višestrukih dokaza smatra se da eritropoetin, kao član nadobitelji citokina, provodi i druge važne fiziološke uloge posredovane međudjelovanjem s eritropoetinskim receptorom (eritropoetin-R). Ta djelovanja uključuju mitogenezu, modulaciju ulaska kalcija u stanice glatkih mišića i živčane stanice, i učinke na posredni metabolizam. Smatra se da eritropoetin omogućuje kompenzacijske odgovore koji služe poboljšanju hipoksične stanične mikrookoline, kao i da modulira programiranu staničnu smrt uzrokovanu metaboličkim stresom. Iako su studije utvrdile da intrakranijalno injicirani eritropoetin štiti neurone od hipoksičnog oštećenja, intrakranijalno davanje je nepraktičan i neprihvatljiv put davanja u terapijske svrhe, naročito za normalne pojedince. Nadalje, ranije studije anemičnih pacijenata kojima je davan eritropoetin pokazale su da se periferno uvedeni eritropoetin ne prenosi u mozak (Marti i sur., 1997, *Kidney Int.* 51:416-7; Juul i sur., 1999, *Pediatr. Res.* 46:543-547; Buemi i sur., 2000, *Nephrol. Dial. Transplant.* 15:422-433).

Opisani su različiti modificirani oblici eritropoetina čija je aktivnost usmjerena prema poboljšanoj eritropoetskoj aktivnosti molekule, kao što su oblici s promijenjenim aminokiselinama na karboksilnom kraju opisani u U.S. patentu 5,457,089 i U.S. patentu 4,835,260; izoforme eritropoetina s različitim brojem sijalnokiselinskih ostataka po molekuli, kao u U.S. patentu 5,856,292; polipeptidi opisani u U.S. patentu 4,703,008; agonisti opisani u U.S. patentu 5,767,078; peptidi koji se vežu na eritropoetinski receptor kao u U.S. patentu 5,773,569 i 5,830,851; i mimetici u obliku malih molekula kao u U.S. patentu 5,835,382.

Ovaj je izum usmjeren prema upotrebi eritropoetina u zaštiti, održavanju, povećanju ili obnavljanju stanica koje reagiraju na eritropoetin i njima pridruženih stanica, tkiva i organa *in situ* kao i *ex vivo*, i provođenju eritropoetina kroz barijeru endotelnih stanica s ciljem zaštite i povećanja stanica koje reagiraju na eritropoetin i njima pridruženih stanica, tkiva i organa distalno od krvnih žila, ili prenošenju srodnih molekula.

Kratak sažetak izuma

U jednom aspektu, ovaj je izum usmjeren prema upotrebi eritropoetina u pripremi farmaceutskih pripravaka za zaštitu, održavanje, povećanje ili obnavljanje funkcije ili vijabilnosti stanica sisavaca koje reagiraju na eritropoetin i njima pridruženih stanica, tkiva i organa. U jednom posebnom pogledu, stanice sisavaca koje reagiraju na eritropoetin i njima pridružene stanice, tkiva i organi udaljeni su od vaskulature postojanjem čvrste barijere endotelnih stanica. U drugom posebnom pogledu, stanice, tkiva i organi ili drugi dijelovi tijela izolirani su od tijela sisavca, kao što je to slučaj kod pripreme presađivanja organa. Kao neograničavajući primjeri, stanice ili tkiva koja reagiraju na eritropoetin mogu biti neuralne, retinalne, mišićne, srčane, plućne, jetrene, bubrežne, crijevne, kore ili srži nadbubrežne žlijezde, kapilarno endotelne, testisa, jajnika, gušterače ili endometrijske stanice ili tkiva. Ovi primjeri stanica koje reagiraju na eritropoetin su samo ilustrativni. U jednom pogledu, stanice koje reagiraju na eritropoetin ili njima pridružene stanice, tkiva ili organi nisu ekscitabilne stanice, tkiva ili organi, ili ne obuhvaćaju samo ekscitabilne stanice ili tkiva. U naročitom ostvarenju, stanica, tkivo ili organ sisavca za koje je upotrijebljen prethodno spomenuti eritropoetin, su istrošeni ili će se istrošiti u vremenskom periodu pod bar jednim uvjetom štetnim za vijabilnost stanice, tkiva ili organa. Takvi uvjeti uključuju traumatsku hipoksiju *in situ* ili poremećaj metabolizma, kirurški izazvanu hipoksiju *in situ* ili poremećaj metabolizma, ili *in situ* izlaganje toksinu, što može biti povezano s kemoterapijom ili radioterapijom. U posebnom slučaju, štetni uvjeti su posljedica srčano-plućne prenosnice (aparata srca-pluća), što se koristi u nekim kirurškim postupcima.

Eritropoetini se koriste za terapijsko ili profilaktičko liječenje ljudskih bolesti CNS ili perifernog živčanog sustava koje imaju prvenstveno neurološke ili psihijatrijske simptome, kao i očnih bolesti, kardiovaskularnih bolesti, kardiopulmonarnih bolesti, dišnih bolesti, bolesti bubrega, mokraćnog i reproduktivnog trakta, gastrointestinalnih bolesti, te endokrinih i metaboličkih poremećaja.

Izum je također usmjeren prema farmaceutskim pripravcima koji sadrže određeni derivat eritropoetina za davanje životinji sisavcu, poželjno čovjeku. Takvi farmaceutski preparati mogu biti formulirani za oralno, intranazalno ili parenteralno davanje, ili u obliku perfuzijske otopine za održanje vijabilnosti stanica, tkiva ili organa *ex vivo*.

Derivati eritropoetina korisni za spomenute namjene mogu biti nativni eritropoetin ili analog eritropoetina, njegovi mimetici, fragmenti eritropoetina, hibridna molekula eritropoetina, molekula koja se veže za eritropoetinski receptor, agonist eritropoetina, bubrežni eritropoetin, moždani eritropoetin, njihov oligomer, multimer, mutein, srodnik, prirodni

oblik, sintetski oblik, rekombinantni oblik, glikozilacijska varijanta, deglikozilirana varijanta ili kombinacija. Bilo koji oblik eritropoetina koji može koristiti stanicama koje reagiraju na eritropoetin uključen je u ovaj aspekt izuma.

Ostali derivati eritropoetina korisni za spomenute namjene i farmaceutski pripravci uključuju native eritropoetine, kao i eritropoetine promijenjene bar jednom modifikacijom u usporedbi s nativnim eritropoetinom, a poželjno u usporedbi s nativnim humanim eritropoetinom. Bar jedna modifikacija može biti modifikacija bar jedne aminokiseline molekule eritropoetina, ili modifikacija bar jednog ugljikohidrata u molekuli eritropoetina. Naravno, molekule eritropoetina korištene za ove namjene mogu imati mnoštvo modifikacija u usporedbi s nativnom molekulom, kao što su višestruke modifikacije aminokiselinskog dijela molekule, višestruke modifikacije ugljikohidratnog dijela molekule ili bar jedna modifikacija aminokiselinskog dijela molekule i bar jedna modifikacija ugljikohidratnog dijela molekule. Modificirana molekula eritropoetina zadržava svoje svojstvo zaštite, održavanja, povećanja ili očuvanja funkcije ili vijabilnosti stanica sisavaca koje reagiraju na eritropoetin, dok neka druga svojstva molekule eritropoetina, koja nisu u vezi s prethodno spomenutim, poželjnim svojstvom, mogu izostati u usporedbi s nativnom molekulom. U poželjnoj izvedbi, derivat eritropoetina je ne-eritropoetski.

U jednom ostvarenju, eritropoetinu iz ovog izuma nedostaju bar jedinice sijalne kiseline. U poželjnom ostvarenju, modificirani eritropoetin je asijaloeritropoetin, a najbolje humani asijaloeritropoetin. U drugom ostvarenju, modificirani eritropoetin ima 1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12 ili 13 jedinica sijalne kiseline.

U drugom ostvarenju, modificiranom eritropoetinu nedostaju bar N-vezani ili O-vezani ugljikohidrati.

U trećem ostvarenju, modificirani eritropoetin ima, u najmanju ruku, smanjen sadržaj ugljikohidrata, i to pomoću djelovanja bar jedne glikozilaze na eritropoetin s nativnim ugljikohidratima.

U četvrtom ostvarenju, ugljikohidratni dio modificirane molekule eritropoetina ima, u najmanju ruku, stupanj glikozilacije kakav se ne javlja u sisavaca, i to pomoću ekspresije rekombinantnog eritropoetina u stanicama ne-sisavaca. U poželjnom ostvarenju, modificirani eritropoetin ekspresiran je u stanicama sisavaca ili biljnim stanicama.

U petom ostvarenju, modificirani eritropoetin ima bar jedan ili više oksidiranih ugljikohidrata koji mogu također biti kemijski reducirani. U poželjnom ostvarenju, modificirani eritropoetin je oksidiran perjodatom; u drugom povoljnom ostvarenju, eritropoetin oksidiran perjodatom kemijski je reducirani borohidridnom soli, kao što su natrijev borohidrid ili natrijev cijanoborohidrid.

U šestom ostvarenju, modificirani eritropoetin za prije spomenute upotrebe, ima jedan ili više modificiranih argininskih ostataka. U jednom ostvarenju, modificirani eritropoetin sadrži glioksalnu jedinicu na jednom ili više argininskih ostataka, kao što su arilglioksalna ili alkilglioksalna jedinica. U drugom ostvarenju, bar jedan argininski ostatak je modificiran reakcijom s vicinalnim diketonom, kao što su (ali bez ograničenja samo na njih) 2,3-butandion ili cikloheksandion.

U sedmom ostvarenju, modificirani eritropoetin sadrži bar jedan ili više modificiranih lizinskih ostataka ili modifikaciju N-terminalne amino-grupe molekule eritropoetina, kao što su modifikacije nastale reakcijom lizinskog ostatka ili N-terminalne amino-grupe sa sredstvom koje modificira amino-grupu. Modificirani lizinski ostatak može biti dodatno kemijski reducirani. U jednom povoljnom ostvarenju, eritropoetin je biotiniliran ili karbamiliran preko jedne ili više lizinskih grupa. U drugom povoljnom ostvarenju, lizin reagira s aldehidom ili reducirajućim šećerom da bi nastao imin, koji se može stabilizirati redukcijom s natrijevim cijanoborohidridom da bi nastao N-alkilirani lizin, kao što je glucitoil-lizin, ili koji se, u slučaju reducirajućeg šećera, može stabilizirati Amadorijevom ili Heynsovom pregradnjom da bi nastao alfa-deoksi-alfa-amino-šećer, kao što je alfa-deoksi-alfa-fruktozillizin. U drugom povoljnom ostvarenju, lizinska grupa se karbamilira (karbamoilira), kao npr. putem reakcije s cijanatnim ionom, alkil-karbamilira, aril-karbamilira ili aril-tiokarbamilira alkil-izocijanatom, aril-izocijanatom odnosno aril-izotiocijanatom, ili se može acilirati reaktivnim derivatom alkilkarboksilne ili arilkarboksilne kiseline, kao što je reakcija s acetatnim anhidridom, suksinatnim anhidridom ili ftalatnim anhidridom. Bar jedna lizinska grupa može se modificirati trinitrofenilom u reakciji s trinitrobenzensulfonskom kiselinom, ili bolje njezinim solima. U drugom ostvarenju, lizinski ostaci mogu se modificirati reakcijom s derivatom glioksala, kao što su reakcija s glioksalom, metilglioksalom ili 3-deoksigliukozonom da bi nastali odgovarajući alfa-karboksialkilni derivati.

U osmom ostvarenju, bar jedan tirozinski ostatak eritropoetina modificiran je na položaju aromatskog prstena elektrofilnim reagensom, kao na primjer nitracijom ili jodiranjem.

U devetom ostvarenju, može se modificirati bar jedan aspartatni ili glutamatni ostatak eritropoetinske molekule, na primjer reakcijom s karbodiimidom nakon koje slijedi reakcija s aminom, kao što je (ali bez ograničenja) glicinamid.

U desetom ostvarenju, modificira se barem triptofanski ostatak eritropoetinske molekule, kao na primjer reakcijom s n-bromosukcinimidom ili n-klorosukcinimidom.

U jedanaestom ostvarenju, modificirana molekula eritropoetina omogućena je uklanjanjem bar jedne amino-grupe, na primjer reakcijom s ninhidrinom nakon koje slijedi redukcija nastale karbonilne grupe reakcijom s borohidridom.

U dvanaestom ostvarenju, modificirani eritropoetin omogućen je otvaranjem bar jedne cistinske veze u molekuli eritropoetina reakcijom s reducirajućim sredstvom kao što je ditiotritol, nakon koje slijedi reakcija nastalih sulfhidrila s jodoacetamidom, jodoctenom kiselinom ili drugim elektrofilom, da bi se spriječilo ponovno nastajanje disulfidnih veza.

U trinaestom ostvarenju, modificirani eritropoetin omogućen je supstitucijom bar jedne od aminokiselina, kao što je leucin, lizinom, argininom, triptofanom, tirozinom ili cisteinom, upotrebom molekularno-bioloških tehnika.

U četrnaestom ostvarenju, modificirani eritropoetin podvrgnut je ograničenoj kemijskoj proteolizi usmjerenoj na specifične ostatke, na primjer, cijepanju nakon triptofanskog ostatka. Tako nastali fragmenti eritropoetina uključeni su u izum.

Kako je gore spomenuto, eritropoetin koristan za ovdje spomenute primjene može imati bar jednu od prethodno spomenutih modifikacija, ali imati i više od jedne modifikacije. Primjer modificiranog eritropoetina s jednom modifikacijom na ugljikohidratnom dijelu i jednom modifikacijom na aminokiselinskom dijelu molekule je asijalocritropoetin čiji su lizinski ostaci biotinilirani ili karbamilirani. Ovaj izum također uključuje pripravke, uključujući i farmaceutske pripravke koji sadrže jedan ili više gore spomenutih eritropoetina.

U drugom aspektu ovog izuma dana je metoda zaštite, održavanja, povećanja ili očuvanja funkcije ili vijabilnosti stanica sisavaca koje reagiraju na eritropoetin i njima pridruženih stanica, tkiva i organa, davanjem efektivne količine bilo kojeg od gore spomenutih eritropoetina. U posebnom pogledu, stanice sisavaca koje reagiraju na eritropoetin i njima pridružene stanica, tkiva i organi smješteni su distalno od vaskulature zbog čvrste barijere endotelnih stanica. U drugom posebnom pogledu, stanice, tkiva i organi ili drugi dijelovi tijela izolirani su od tijela sisavca, kao što je to slučaj kod pripreme presađivanja organa. Kao neograničavajući primjeri, stanice ili tkiva koja reagiraju na eritropoetin mogu biti neuralne, retinalne, mišićne, srčane, plućne, jetrene, bubrežne, crijevne, kore ili srži nadbubrežne žlijezde, kapilarno endotelne, testisa, jajnika, gušterače ili endometrijske stanice ili tkiva. Ovi primjeri stanica koje reagiraju na eritropoetin su samo ilustrativni. U jednom pogledu, stanice koje reagiraju na eritropoetin ili njima pridružene stanice, tkiva ili organi nisu ekscitabilne stanice, tkiva ili organi, ili ne obuhvaćaju samo ekscitabilne stanice ili tkiva. U naročito ostvarenju, stanica, tkivo ili organ sisavca za koje je upotrijebljen prethodno spomenuti eritropoetin, su istrošeni ili će se istrošiti u vremenskom periodu pod bar jednim uvjetom štetnim za vijabilnost stanice, tkiva ili organa. Takvi uvjeti uključuju traumatsku hipoksiju *in situ* ili poremećaj metabolizma, kirurški izazvanu hipoksiju *in situ* ili poremećaj metabolizma, ili *in situ* izlaganje toksinu, što može biti povezano s kemoterapijom ili radioterapijom. U jednom ostvarenju, izum štiti od štetnih uvjeta nastalih zbog ugradnje srčano-plućne prenosnice.

U drugom aspektu izuma, bilo koji od spomenutih eritropoetina, kao i bilo koja druga molekula eritropoetina, uključujući nativni humani eritropoetin, može se koristiti upripremi farmaceutskog pripravka za tretiranje stanica, tkiva i organa *ex vivo* u svrhu zaštite, održavanja, povećanja ili očuvanja funkcije ili vijabilnosti stanica sisavaca koje reagiraju na eritropoetin i njima pridruženih stanica, tkiva i organa. Takvo tretiranje *ex vivo* je korisno, na primjer, za očuvanje stanica, tkiva ili organa namijenjenih presađivanju, bilo autotransplantaciji ili ksenotransplantaciji. Stanice, tkivo ili organ može se inkubirati u otopini koja sadrži eritropoetin, ili se perfuzat ukapava u organ kroz vaskulaturu ili drugim putem, da bi se očuvalo funkcioniranje stanica tijekom perioda u kojem stanice, tkivo ili organ nisu integrirani s vaskulaturom donora ili recipijenta. Štoviše, prethodno spomenuta upotreba bilo kojeg od eritropoetina korisna je kad god je stanica, tkivo ili organ izolirana od vaskulature pojedinca i tako zapravo egzistira *ex vivo* u nekom vremenskom periodu, pri čemu se izraz «izoliran» odnosi na ograničavanje ili zatezanje vaskulature prema stanici, tkivu, organu ili dijelu tijela, kao što se može provoditi tijekom operacije, naručito tijekom ugradnje srčano-plućne prenosnice, pri čemu se premošćuje vaskulatura stanica, tkiva, organa ili dijela tijela; ili se stanica, tkivo, organ ili dio tijela uklanja iz tijela sisavca, kao što se može raditi u postupku ksenotransplantacije ili tijekom autotransplantacije; ili traumatske amputacije stanica, tkiva, organa ili dijela tijela. Tako se ovaj aspekt izuma odnosi na perfuziju eritropoetinom *in situ* i *ex vivo*. *Ex vivo*, eritropoetin se može dati u otopini za očuvanje stanica, tkiva ili organa. U svakom slučaju, način izlaganja može biti kontinuirana perfuzija, pulsirajuća perfuzija, infuzija, inkubiranje, injiciranje ili kateterizacija.

U daljnjem aspektu, izum je usmjeren prema postupku zaštite, održanja, povećanja ili očuvanja vijabilnosti stanice, tkiva, organa ili dijela tijela sisavca, što uključuje stanice ili tkiva koja reagiraju na eritropoetin, pri čemu su stanice, tkivo, organ ili dio tijela izolirani od tijela sisavca. Postupak uključuje barem izlaganje izoliranih stanica, tkiva, organa ili dijela tijela sisavca količini eritropoetina u trajanju koje je učinkovito da zaštiti, održi, poveća ili očuva navedenu vijabilnost. U primjerima koji ne ograničavaju, «izoliran» se odnosi na ograničavanje ili zatezanje vaskulature prema stanici, tkivu, organu ili dijelu tijela, kao što se može provoditi tijekom operacije, naručito tijekom ugradnje

srčano-plućne prenosnice, pri čemu se premošćuje vaskulatura stanica, tkiva, organa ili dijela tijela; ili se stanica, tkivo, organ ili dio tijela uklanja iz tijela sisavca, kao što se može raditi u postupku ksenotransplantacije ili tijekom autotransplantacije; ili traumatske amputacije stanica, tkiva, organa ili dijela tijela. Tako se ovaj aspekt izuma odnosi na perfuziju eritropoetinom *in situ* i *ex vivo*. *Ex vivo*, eritropoetin se može dati u otopini za očuvanje stanica, tkiva ili organa. U svakom slučaju, način izlaganja može biti kontinuirana perfuzija, pulsirajuća perfuzija, infuzija, inkubiranje, injiciranje ili kateterizacija.

U prethodno spomenutoj izolaciji ili ostvarenju *ex vivo*, koristan eritropoetin može biti bilo koji od prethodno spomenutih eritropoetina, uključujući bilo koji nativni eritropoetin ili analog eritropoetina, mimetik eritropoetina, fragment eritropoetina, hibridnu molekulu eritropoetina, molekulu koja se veže za eritropoetinski receptor, agonist eritropoetina, bubrežni eritropoetin, moždani eritropoetin, njihov oligomer, multimer, mutein, srodnik, prirodni oblik, sintetski oblik, rekombinantni oblik, glikozilacijsku varijantu, deglikoziliranu varijantu ili kombinaciju. Bilo koji oblik eritropoetina koji može koristiti stanicama koje reagiraju na eritropoetin uključen je u ovaj aspekt izuma. Ostali eritropoetini uključuju, ali nisu ograničeni na njih, asijaloeritropoetin, N-deglikozilirani eritropoetin, O-deglikozilirani eritropoetin, eritropoetin sa smanjenim sadržajem ugljikohidrata, eritropoetin s promijenjenim uzorkom glikozilacije, eritropoetin s oksidiranim i reduciranim ugljikohidratima, eritropoetin modificiran arilglioksalom, eritropoetin modificiran alkilglioksalom, eritropoetin modificiran 2,3-butandionom, eritropoetin modificiran cikloheksandionom, biotinilirani eritropoetin, N-alkil-lizil-eritropoetin, glucitol-lizin-eritropoetin, alfa-deoksi-alfa-fruktozillizin-eritropoetin, karbamilirani eritropoetin, acetilirani eritropoetin, sukcinilirani eritropoetin, alfa-karboksialkil-eritropoetin, nitrirani eritropoetin, jodilirani eritropoetin, da se nabroje neki od reprezentativnih, ali neograničavajućih primjera. Poželjan je humani eritropoetin, a najbolje nativni humani eritropoetin. U drugom ostvarenju, poželjan je humani asijaloeritropoetin. U još jednom ostvarenju, poželjan je humani fenilglioksal-eritropoetin.

Kao neograničavajući primjeri, stanice ili tkiva koja reagiraju na eritropoetin mogu obuhvaćati neuralne, retinalne, mišićne, srčane, plućne, jetrene, bubrežne, crijevne, kore ili srži nadbubrežne žlijezde, kapilarno endotelne, testisa, jajnika, gušterače ili endometrijske stanice ili tkiva. Ovi primjeri stanica koje reagiraju na eritropoetin su samo ilustrativni.

Svi navedeni postupci i upotrebe prvenstveno su namijenjeni ljudskim bićima, ali korisni su i za životinje, kao što su (ali bez ograničenja na njih) kućne životinje, domaće životinje, stoka i životinje u zoološkom vrtu. Način davanja spomenutih farmaceutskih pripravaka uključuje oralno, intravenozno, intranazalno, površinsko, intraluminalno, inhalacijsko ili parenteralno davanje, pri čemu ovo zadnje uključuje intravenozno, intraarterijsko, supkutano, intramuskularno, intraperitonealno, submukozno ili intradermalno davanje. Za upotrebu *ex vivo* poželjan je perfuzat ili kupka. To uključuje perfuziju izoliranog dijela vaskulature *in situ*.

U još jednom aspektu izuma, bilo koji od prethodno spomenutih eritropoetina koristan je u pripremi farmaceutskog pripravka za održanje nefunkcionalne stanice, tkiva ili organa kad se daje nakon početka bolesti ili stanja koje je dovelo do disfunkcije. Kao neograničavajući primjeri, davanje farmaceutskog sastava koji sadrži eritropoetin održava kognitivnu funkciju u životinja koje su imale traumu mozga, čak i kad se daje mnogo nakon (npr. tri dana, pet dana, tjedan dana, mjesec dana ili dulje) što se trauma dogodila. Eritropoetini korisni za takvu primjenu uključuju bilo koji od prethodno spomenutih eritropoetina ili bilo koji nativni eritropoetin, analog eritropoetina, mimetik eritropoetina, fragment eritropoetina, hibridnu molekulu eritropoetina, molekulu koja se veže za eritropoetinski receptor, agonist eritropoetina, bubrežni eritropoetin, moždani eritropoetin, njihov oligomer, multimer, mutein, srodnik, prirodni oblik, sintetski oblik, rekombinantni oblik, glikozilacijsku varijantu, deglikoziliranu varijantu ili kombinaciju. Bilo koji oblik eritropoetina koji može koristiti stanicama koje reagiraju na eritropoetin uključen je u ovaj aspekt izuma. Ostali derivati eritropoetina korisni za spomenute primjene i farmaceutski pripravci uključuju nativne eritropoetine, kao i eritropoetine promijenjene bar jednom modifikacijom u usporedbi s nativnim eritropoetinom, naročito u usporedbi s nativnim humanim eritropoetinom. «Bar jedna modifikacija» može biti modifikacija bar jedne aminokiseline u molekuli eritropoetina ili modifikacija bar jednom ugljikohidrata u molekuli eritropoetina. Naravno, molekule eritropoetina korisne za ove primjene mogu imati više modifikacija u usporedbi s nativnom molekulom, kao što su višestruke modifikacije aminokiselinskog dijela molekule, višestruke modifikacije ugljikohidratnog dijela molekule, ili bar jedna modifikacija aminokiselinskog dijela molekule i bar jedna modifikacija ugljikohidratnog dijela molekule. Modificirana molekula eritropoetina zadržava svoju sposobnost zaštite, održanja, povećanja ili očuvanja funkcije ili vijabilnosti stanica sisavaca koje reagiraju na eritropoetin, ali druga svojstva molekule eritropoetina, nevezano uz prethodno spomenuta poželjna svojstva, mogu izostati. Poželjan je humani eritropoetin, a najbolje nativni humani eritropoetin. U drugom ostvarenju, poželjan je humani asijaloeritropoetin.

U još jednom ostvarenju, ovaj izum daje postupak za upotrebu spomenutog eritropoetina u obnavljanju nefunkcionalne stanice, tkiva ili organa, kad se daje nakon početka bolesti ili stanja odgovornog za disfunkciju. Kao neograničavajući primjeri, davanje farmaceutskog sastava koji sadrži eritropoetin održava kognitivnu funkciju u životinja koje su imale traumu mozga, čak i kad se daje mnogo nakon (npr. tri dana, pet dana, tjedan dana, mjesec dana ili dulje) što se trauma dogodila. Eritropoetini korisni za takvu primjenu uključuju bilo koji od prethodno spomenutih

eritropoetina ili bilo koji nativni eritropoetin, analog eritropoetina, mimetik eritropoetina, fragment eritropoetina, hibridnu molekulu eritropoetina, molekulu koja se veže za eritropoetinski receptor, agonist eritropoetina, bubrežni eritropoetin, moždani eritropoetin, njihov oligomer, multimer, mutein, srodnik, prirodni oblik, sintetski oblik, rekombinantni oblik, glikozilacijsku varijantu, deglikoziliranu varijantu ili kombinaciju. Bilo koji oblik eritropoetina koji može koristiti stanicama koje reagiraju na eritropoetin uključen je u ovaj aspekt izuma. Ostali derivati eritropoetina korisni za spomenute primjene i farmaceutski pripravci uključuju nativne eritropoetine, kao i eritropoetine promijenjene bar jednom modifikacijom u usporedbi s nativnim eritropoetinom, naročito u usporedbi s nativnim humanim eritropoetinom. «Bar jedna modifikacija» može biti modifikacija bar jedne aminokiseline u molekuli eritropoetina ili modifikacija bar jednom ugljikohidrata u molekuli eritropoetina. Naravno, molekule eritropoetina korisne za ove primjene mogu imati više modifikacija u usporedbi s nativnom molekulom, kao što su višestruke modifikacije aminokiselinskog dijela molekule, višestruke modifikacije ugljikohidratnog dijela molekule, ili bar jedna modifikacija aminokiselinskog dijela molekule i bar jedna modifikacija ugljikohidratnog dijela molekule. Modificirana molekula eritropoetina zadržava svoju sposobnost zaštite, održanja, povećanja ili očuvanja funkcije ili vijabilnosti stanica sisavaca koje reagiraju na eritropoetin, ali druga svojstva molekule eritropoetina, nevezano uz prethodno spomenuta poželjna svojstva, mogu izostati. Poželjan je humani eritropoetin, a najbolje nativni humani eritropoetin. U drugom ostvarenju, poželjan je humani asijaloeritropoetin.

U još jednom aspektu ovog izuma, dani su postupci za olakšanje transcitoze molekule kroz barijeru endotelnih stanica u sisavaca, davanjem pripravka molekule u kombinaciji s eritropoetinom kao što je: eritropoetin koji nema jedinica sijalne kiseline; eritropoetin koji nema N-vezanih ili O-vezanih šećera; eritropoetin koji ima smanjen sadržaj ugljikohidrata zbog tretiranja nativnog eritropoetina bar jednom glikozidazom; eritropoetin s ugljikohidratnim dijelom molekule koja ima uzorak glikozilacije kakav se ne sreće u sisavaca, a što je postignuto ekspresijom rekombinantnog eritropoetina u stanicama ne-sisavaca; eritropoetin koji ima bar jedan ili više oksidiranih ugljikohidrata, koji također mogu biti i kemijski reducirani; eritropoetin koji ima bar jedan modificirani argininski ostatak; eritropoetin koji ima bar jedan ili više modificiranih lizinskih ostataka ili modifikaciju N-terminalne amino-grupe eritropoetinske molekule; eritropoetin koji ima modificiran tirozinski ostatak, eritropoetin koji ima modificirane aspartatne ili glutamatne ostatke; eritropoetin koji ima modificiran triptofanski ostatak; eritropoetin kojem je uklonjena bar jedna amino-grupa; eritropoetin koji ima otvorenu bar jednu cistinsku vezu u molekuli; eritropoetin koji ima bar jednu supstituciju bar jedne aminokiseline; ili krnji eritropoetin.

Veza između molekule koja se treba prenijeti i eritropoetina može biti, na primjer, labilna kovalentna veza, stabilna kovalentna veza ili nekovalentna asocijacija s veznim mjestom za molekulu. Barijere endotelnih stanica mogu biti krvno-moždana barijera, krvno-očna barijera, barijera krvi i testisa, barijera krvi i jajnika te krvno-placentalna barijera. Prikladne molekule za prijenos postupkom ovog izuma uključuju hormone, kao što su hormon rasta, antibiotike i sredstva za liječenje raka.

Daljnji aspekt ovog izuma daje pripravak za olakšanje transcitoze molekule kroz barijeru endotelnih stanica u sisavaca, pri čemu navedeni pripravak sadrži navedenu molekulu u asocijaciji s eritropoetinom, kao što je eritropoetin koji nema jedinica sijalne kiseline; eritropoetin koji nema N-vezanih ili O-vezanih šećera; eritropoetin koji ima smanjen sadržaj ugljikohidrata zbog tretiranja nativnog eritropoetina bar jednom glikozidazom; eritropoetin s ugljikohidratnim dijelom molekule koja ima uzorak glikozilacije kakav se ne sreće u sisavaca, a što je postignuto ekspresijom rekombinantnog eritropoetina u stanicama ne-sisavaca; eritropoetin koji ima bar jedan ili više oksidiranih ugljikohidrata, koji također mogu biti i kemijski reducirani; eritropoetin koji ima bar jedan modificirani argininski ostatak; eritropoetin koji ima bar jedan ili više modificiranih lizinskih ostataka ili modifikaciju N-terminalne amino-grupe eritropoetinske molekule; eritropoetin koji ima modificiran tirozinski ostatak, eritropoetin koji ima modificirane aspartatne ili glutamatne ostatke; eritropoetin koji ima modificiran triptofanski ostatak; eritropoetin kojem je uklonjena bar jedna amino-grupa; eritropoetin koji ima otvorenu bar jednu cistinsku vezu u molekuli; eritropoetin koji ima bar jednu supstituciju bar jedne aminokiseline; ili krnji eritropoetin.

Veza može biti, na primjer, labilna kovalentna veza, stabilna kovalentna veza ili nekovalentna asocijacija s veznim mjestom za molekulu. Barijere endotelnih stanica mogu biti krvno-moždana barijera, krvno-očna barijera, barijera krvi i testisa, barijera krvi i jajnika te krvno-placentalna barijera. Prikladne molekule za prijenos postupkom ovog izuma uključuju hormone, kao što su hormon rasta, antibiotike i sredstva za liječenje raka.

U daljnjem aspektu ovog izuma, bilo koji od prethodno spomenutih eritropoetina korisni su u pripremi farmaceutskih pripravaka za olakšanje transcitoze molekule kroz barijeru endotelnih stanica u sisavaca, pri čemu navedeni pripravak sadrži navedenu molekulu u asocijaciji s eritropoetinom, kao što je eritropoetin koji nema jedinica sijalne kiseline; eritropoetin koji nema N-vezanih ili O-vezanih šećera; eritropoetin koji ima smanjen sadržaj ugljikohidrata zbog tretiranja nativnog eritropoetina bar jednom glikozidazom; eritropoetin s ugljikohidratnim dijelom molekule koja ima uzorak glikozilacije kakav se ne sreće u sisavaca, a što je postignuto ekspresijom rekombinantnog eritropoetina u stanicama ne-sisavaca; eritropoetin koji ima bar jedan ili više oksidiranih ugljikohidrata, koji također mogu biti i kemijski reducirani; eritropoetin koji ima bar jedan modificirani argininski ostatak; eritropoetin koji ima bar jedan ili

više modificiranih lizinskih ostataka ili modifikaciju N-terminalne amino-grupe eritropoetinske molekule; eritropoetin koji ima modificiran tirozinski ostatak, eritropoetin koji ima modificirane aspartatne ili glutamatne ostatke; eritropoetin koji ima modificiran triptofanski ostatak; eritropoetin kojem je uklonjena bar jedna amino-grupa; eritropoetin koji ima otvorenu bar jednu cistinsku vezu u molekuli; eritropoetin koji ima bar jednu supstituciju bar jedne aminokiseline; ili
 5 krnji eritropoetin.

Veza može biti, na primjer, labilna kovalentna veza, stabilna kovalentna veza ili nekovalentna asocijacija s veznim mjestom za molekulu. Barijere endotelnih stanica mogu biti krvno-moždana barijera, krvno-očna barijera, barijera krvi i testisa, barijera krvi i jajnika te krvno-placentalna barijera. Prikladne molekule za prijenos postupkom ovog izuma
 10 uključuju hormone, kao što su hormon rasta, antibiotike i sredstva za liječenje raka.

Ovi i drugi aspekti ovog izuma bolje će se procijeniti referiranjem na slijedeće slike i detaljni opis.

Kratak opis slika

- 15 **Slika 1** prikazuje prijenos parenteralno danog eritropoetina u cerebrospinalnu tekućinu.
Slika 2 prikazuje zaštitu miokarda eritropoetinom od ishemičnog oštećenja nakon privremenog začepljenja krvnih žila.
Slika 3 prikazuje održanje funkcije srca pripremljenog za transplantaciju, djelovanjem eritropoetina.
 20 **Slika 4** uspoređuje učinkovitost eritropoetina i asijaloeritropoetina *in vitro* na vijabilnost P19 stanica u uvjetima izgladnjivanja bez seruma.
Slika 5 je drugi eksperiment koji uspoređuje učinkovitost eritropoetina i asijaloeritropoetina *in vitro* na vijabilnost P19 stanica u uvjetima izgladnjivanja bez seruma.
Slika 6 uspoređuje učinkovitost eritropoetina i eritropoetina modificiranog fenilgliksalom *in vitro* na vijabilnost P19 stanica u uvjetima izgladnjivanja bez seruma.
 25 **Slika 7** prikazuje zaštitno djelovanje eritropoetina i asijaloeritropoetina u modelu fokalne cerebralne ishemije štakora.
Slika 8 prikazuje odgovor ovisan o dozi, uz usporedbu učinkovitosti humanog eritropoetina i humanog asijaloeritropoetina u začepljenju središnje cerebralne arterije u modelu ishemičnog udara.
Slika 9 prikazuje učinak biotiniziranog eritropoetina i asijaloeritropoetina u testu P19.
 30 **Slika 10** prikazuje aktivnost jodiniranog eritropoetina u testu P19.
Slika 11 prikazuje učinke tretiranja eritropoetinom u modelu glaukoma štakora.
Slika 12 prikazuje razmjere očuvanja retinalne funkcije eritropoetinom u modelu glaukoma štakora.
Slika 13 prikazuje očuvanje kognitivne funkcije nakon traume mozga, davanjem eritropoteina počevši pet dana nakon traume.
 35 **Slika 14** prikazuje očuvanje kognitivne funkcije nakon traume mozga, davanjem eritropoteina počevši 30 dana nakon traume.
Slika 15 prikazuje učinkovitost humanog asijaloeritropoetina u kainatnom modelu cerebralne toksičnosti.

Detaljni opis izuma

40 «Stanica koja reagira na eritropoetin» podrazumijeva stanicu sisavca čija funkcija ili vijabilnost mogu biti očuvane, pospješene, povećane, obnovljene ili na bilo koji način poboljšane izlaganjem eritropoetinu. Neograničavajući primjeri takvih stanica uključuju neuralne, retinalne, mišićne, srčane, plućne, jetrene, bubrežne stanice, stanice tankog crijeva, kore i srži nadbubrežne žlijezde, kapilarno-endotelne stanice, stanice testisa, jajnika i endometrija. Nadalje, takve
 45 stanice koje reagiraju na eritropoetin i prednosti postignute eritropoetinom mogu se proširiti na omogućavanje zaštite ili povećanja indirektno na druge stanice koje ne reagiraju izravno na eritropoetin, ili na tkiva i organe koji sadrže takve stanice koje ne reagiraju na eritropoetin. Takve druge stanice, ili tkiva ili organi, koji indirektno imaju korist od povećanja stanica koje reagiraju na eritropoetin predstavljaju kao dio stanica, tkiva ili organa kao «pridružene» stanice, tkiva ili organi. Tako prednosti eritropoetina kako su ovdje opisane mogu biti posljedica prisutnosti malog broja ili
 50 udjela stanica koje reagiraju na eritropoetin u tkivu ili organu, na primjer, podražljivog ili živčanog tkiva prisutnog u takvom tkivu, ili Leydigovih stanica u testisima, koji proizvode testosteron. U jednom aspektu, stanice koje reagiraju na eritropoetin ili njima pridružene stanice, tkiva ili organi nisu podražljive stanice, tkiva ili organi, ili ne sadrže predominantno podražljive stanice ili tkiva.

55 Postupci ovog izuma omogućuju lokalnu ili sistemsku zaštitu ili povećanje stanica, tkiva i organa u tijelu sisavca, pod raznim normalnim i štetnim uvjetima, ili zaštitu onih namijenjenih premještanju u tijelo drugog sisavca. Nadalje, omogućeno je očuvanje i obnavljanje disfunkcije. Kako je prije spomenuto, sposobnost eritropoetina da prijeđe čvrstu barijeru endotelnih stanica i iskaže svoje pozitivne učinke na stanice koje reagiraju na eritropoetin (kao i na druge tipove stanica) distalno od vaskulature daje sposobnost sprečavanja, kao i liječenja niza stanja i bolesti koje inače uzrokuju
 60 značajna stanična i tkivna oštećenja u životinja, uključujući i čovjeka, i, štoviše, omogućuje uspjeh dosad neiskušanih kirurških postupaka čiji rizik tradicionalno prekoračuje prednosti. Trajanje i stupanj namjeranih štetnih stanja uzrokovanih za konačni dobitak, kao što su kemoterapija u visokim dozama, radijacijska terapija, produljeno

preživljenje presatka *ex vivo*, i produljeni periodi kirurški izazvane ishemije, mogu se provesti uzimajući u obzir prednost ovog izuma. Međutim, izum nije tako ograničen, ali uključuje kao jedan aspekt postupke ili pripreme u kojima su cilj stanice koje reagiraju na eritropoetin, a koje su udaljene od vaskulature pomoću barijere endotelnih stanica, i pridružene stanice, tkiva i organi na koje bi izlaganje eritropoetinu moglo korisno djelovati. Nadalje, stanična, tkivna ili organska disfunkcija mogu biti očuvane ili obnovljene izlaganjem eritropoetinu nakon akutnog štetnog događaja (kao što je trauma).

Izum je dakle usmjeren općenito upotrebi eritropoetina u pripremi farmaceutskih pripravaka za prethodno spomenute namjene u kojima se stanična funkcija održava, pospješuje, povećava, obnavlja ili na neki drugi način poboljšava. Izum je također usmjeren prema postupcima za održavanje, povećanje, pospješivanje ili obnavljanje stanične funkcije davanjem sisavcu učinkovite količine eritropoetina kako je ovdje opisano. Izum je nadalje usmjeren prema postupcima za održavanje, povećanje, pospješivanje ili obnavljanje stanične funkcije *ex vivo* izlaganjem stanica, tkiva ili organa eritropoetinu. Izum je također usmjeren prema pripravku perfuzata koji sadrži eritropoetin za upotrebu u očuvanju organa ili tkiva.

Razni postupci ovog izuma koriste farmaceutske pripravke koji sadrže eritropoetin u količini učinkovitoj za određeni način i trajanje izlaganja da bi se postigli pozitivni učinci ili prednosti na stanice koje reagiraju na eritropoetin u ili izvan tijela sisavca. Gdje ciljne stanice, tkiva ili organi u namjeravanoj terapiji zahtijevaju da eritropoetin prijede barijeru endotelnih stanica, farmaceutski pripravak uključuje eritropoetin u koncentraciji u kojoj je sposoban da, nakon prelaska barijere endotelnih stanica, iskaže svoje poželjne učinke na stanice koje reagiraju na eritropoetin. Molekule sposobne za interakciju s eritropoetinskim receptorom i moduliranje njegove aktivnosti, ovdje navedene kao eritropoetinski modulatori ili modulatori aktivnosti eritropoetinskog receptora, korisne su u kontekstu ovog izuma. Te molekule mogu biti, na primjer, prirodni, sintetski ili rekombinantni oblici eritropoetinske molekule, kako je ranije opisano, ili druge molekule koje ne moraju nužno na neki način sličiti eritropoetinu, osim da moduliraju aktivnost stanica koje reagiraju na eritropoetin, kako je ovdje opisano.

Eritropoetin je glikoproteinski hormon koji u ljudi ima molekulsku masu od oko 34 kDa. Zreli protein sadrži 165 aminokiselina, a glikozilni ostaci obuhvaćaju oko 40 % mase molekule. Oblici eritropoetina korisni u upotrebi ovog izuma sadrže prirodne, sintetske i rekombinantne oblike slijedećih eritropoetinu srodnih molekula ljudi i drugih sisavaca: eritropoetin, asijaloeritropoetin, deglikozilirani eritropoetin, analoge eritropoetina, mimetike eritropoetina, fragmente eritropoetina, hibridne molekule eritropoetina, molekule koje se vežu na eritropoetinski receptor, agoniste eritropoetina, bubrežni eritropoetin, moždani eritropoetin, njihove oligomere i multimerne, muteine i srodnike. Nadalje, oblici eritropoetina korisni u praksi ovog izuma uključuju proteine koji predstavljaju funkcionalno ekvivalentne genske produkte. Takvi ekvivalentni produkti eritropoetinskog gena uključuju mutirane eritropoetine, koji mogu sadržati delecije, uključujući i interne delecije, adicije, uključujući adicije koje daju fuzijske proteine, ili konzervativne supstitucije aminokiselinskih ostataka unutar i/ili pokraj aminokiselinskog slijeda, koje rezultiraju u «tihoj» promjeni, pri čemu promjena daje funkcionalno ekvivalentan eritropoetin. Takve aminokiselinske supstitucije mogu biti načinjene na osnovi sličnosti u polaritetu, naboju, topljivosti, hidrofobnosti, hidrofilnosti, i/ili amfipatskoj prirodi uključenih ostataka. Na primjer, nepolarne (hidrofobne) aminokiseline uključuju alanin, leucin, izoleucin, valin, prolin, fenilalanin, triptofan i metionin; polarne neutralne aminokiseline uključuju glicin, serin, treonin, cistein, tirozin, asparagin i glutamin; pozitivno nabijene (bazične) aminokiseline uključuju arginin, lizin i histidin; a negativno nabijene (kisele) aminokiseline uključuju asparaginsku i glutaminsku kiselinu. Alternativno, mogu se koristiti nekonzervativne promjene aminokiselina te veće insercije i delecije da bi se stvorili funkcionalno promijenjeni mutanti eritropoetina. Takvi mutanti mogu se koristiti za mijenjanje svojstva eritropoetina u željenom smjeru. Na primjer, u jednom ostvarenju, eritropoetin koristan za primjenu ovog izuma može biti mutirani eritropoetin promijenjen u jednoj ili više aminokiselina unutar četiri funkcionalne domene eritropoetina koje utječu na vezivanje receptora: VLQRY i/ili TKVNFYAW i/ili SGLRSLTTL i/ili SNFLRG. U drugom ostvarenju, mogu se koristiti eritropoetini koji sadrže mutacije u okolnom dijelu molekule koje utječu na kinetiku ili svojstva vezivanja molekule i receptora.

Razni analozi, fragmenti, hibridne molekule, agonisti, muteini i drugi oblici kako su ovdje opisani obuhvaćaju varijante eritropoetina, kao i mjesta glikozilacije, uključujući nativne, deglikozilirane, asijalične i druge djelomično glikozilirane oblike eritropoetina. Neograničavajući primjeri takvih varijanti opisani su u Tsuda i sur., 1990., *Eur. J. Biochem.* 188:405-411, a ovdje su uključeni referencom. Nadalje, moguće je koristiti niz domaćinskih sustava za ekspresiju i proizvodnju rekombinantnog eritropoetina, uključujući, ali bez ograničenja, bakterijske i kvaščeve stanične sustave, stanice kukaca, biljaka i sisavaca, uključujući čovjeka. Na primjer, rekombinantni eritropoetin proizveden u bakterijama, koje ne glikoziliraju produkte ili ne uvode sjetnu kiselinu, može se koristiti u proizvodnji neglikoziliranih oblika eritropoetina. Alternativno, rekombinantni eritropoetin može se proizvoditi u drugim sustacima koji glikoziliraju, npr., biljke, ljudske stanice.

Kako je gore naznačeno, izum ovdje uključuje bilo koje i sve molekule modulatora aktivnosti eritropoetinskog receptora, sposobne da iskažu pozitivnu aktivnost na stanice koje reagiraju na eritropoetin, bez obzira na strukturnu srodnost molekule s eritropoetinom.

Nadalje, sam eritropoetin može biti modificiran tako da svoje aktivnosti usmjerava prema specifičnom tkivu. Da bi se postigla željena tkivna specifičnost, mogu se provoditi različite strategije uključujući modifikacije koje skraćuju poluživot cirkulirajuće molekule i time smanjuju vrijeme u kojem eritropoetin može reagirati s eritroidnim prekursorima, ili modifikacija primarne strukture molekule eritropoetina. Jedan od pristupa skraćivanja poluživota molekule je uklanjanje ili modifikacija glikozilacijskih jedinica, od kojih eritropoetin ima tri N-vezane i jednu O-vezanu jedinicu. Takve varijante glikoziliranog eritropoetina mogu se proizvesti na različite načine. Na primjer, sijalna kiselina kojom završavaju krajevi šećernih lanaca može se ukloniti specifičnim sijalidazama, ovisno o kemijskoj vezi koja povezuje sijalnu kiselinu i šećerni lanac. Alternativno, glikozilirana struktura može se rastaviti na različite načine upotrebom drugih enzima koji cijepaju na specifičnim mjestima. Tehnike za modificiranje primarne strukture vrlo su brojne i uključuju zamjenu specifičnih aminokiselina, kemijske modifikacije aminokiselina, ili dodavanje drugih struktura koje interferiraju s vezanjem eritropoetina na neki od njegovih receptora. Upotreba takvih oblika eritropoetina ovdje je u potpunosti uključena. U poželjnom ostvarenju, poluživot ne-eritropoetskog eritropoetina ovog izuma smanjena je na oko 90 % u odnosu na nativni eritropoetin.

Neke od ovih molekula će ipak oponašati djelovanje samog eritropoetina u drugim tkivima ili organima. Na primjer, 17-mer koji sadrži aminokiselinski slijed 31-47 nativnog eritropoetina inaktivan je za eritropoezu, ali posve aktivan za živčane stanice *in vitro* (Campana & O'Brien, 1998: *Int. J. Mol. Med.* 1:235-41).

Nadalje, derivati molekule eritropoetina poželjni za ovdje opisane primjene mogu se dobiti gvanidacijom, amidinacijom, karbamilacijom (karbamoilacijom), trinitrofenilacijom, acetilacijom, sukcinilacijom, nitracijom ili modifikacijom argininskih, lizinskih, tirozinskih, triptofanskih ili cisteinskih ostataka, odnosno karboksilnih grupa, i to, između ostalog, postupcima kao što su ograničena proteoliza, uklanjanje amino-grupa i/ili mutacijska zamjena argininskih, lizinskih, tirozinskih, triptofanskih ili cisteinskih ostataka tehnikama molekularne biologije, da bi se dobili eritropoetini koji zadržavaju odgovarajuću razinu aktivnosti za specifične organe ili tkiva, ali ne i za ostala kao što su eritrociti (npr. Satake i sur; 1990, *Biochim. Biophys. Acta* 1038:125-9; ovdje u potpunosti uključeno referencom). Jedan neograničavajući, dolje opisani primjer je modifikacija argininskih ostataka u eritropoetinskoj molekuli reakcijom s glioksalom kao što je fenilglioksal (prema protokolu u Takahashi, 1977, *J. Biochem.* 81:395-402). Kako će u nastavku biti vidljivo, takva molekula eritropoetina u potpunosti zadržava svoj neurotrofički učinak. Takve molekule eritropoetina u potpunosti su uključene u različite primjene i pripravke koji su ovdje opisani.

Sintetske i rekombinantne molekule, kao što su moždani i bubrežni eritropoetin, rekombinantni oblici eritropoetina sisavaca, kao i njegove prirodne, tumorske i rekombinantne izoforme, kao što su rekombinantno eksprimirane molekule i one pripremljene homolognom rekombinacijom, uključene su u ovaj izum. Nadalje, ovaj izum uključuje molekule i peptide koji vežu eritropoetinski receptor, kao i rekombinantne konstrukte ili druge molekule koje posjeduju dio ili sva strukturne i/ili biološka svojstva eritropoetina, uključujući fragmente i multimerne eritropoetina. Eritropoetina ovdje uključuje molekule s promijenjenim svojstvima vezanja eritropoetinskog receptora, poželjno s povećanim afinitetom za receptor, naročito ako je to u vezi s povećanim transportom kroz barijeru endotelnih stanica. Muteini koji obuhvaćaju molekule s dodatnim ili smanjenim brojem glikozilacijskim mjestima također su uključeni. Kako je gore naznačeno, izrazi «eritropoetin» i «mimeti», kao i drugi izrazi, ovdje su korišteni naizmjenice, a odnose se na molekule, slične eritropoetinu i one koje mogu prijeći barijeru endotelnih stanica, a koje djeluju zaštitno na stanice koje reagiraju na eritropoetin.

Nadalje, ovdje su također sadržane molekule dobivene od transgeničnih životinja. Treba primijetiti da molekule eritropoetina obuhvaćene ovim izumom ne sliče nužno eritropoetinu strukturno, ili na bilo koji drugi način, osim po svojoj sposobnosti da se vežu na eritropoetinski receptor ili moduliraju njegovu aktivnost ili da aktiviraju signalne puteve potaknute eritropoetinom, kako je ovdje opisano.

Kao neograničavajući primjeri, oblici eritropoetina korisni u primjeni ovog izuma uključuju muteine eritropoetina, kao što su oni s promijenjenim aminokiselinama na karboksi-kraju, opisani u U.S. patentnoj prijavi 5 457 089 i U.S. patentnoj prijavi 4 835 260; asijaloeritropoetinske i eritropoetinske izoforme s različitim brojem ostataka sijalne kiseline po molekuli, kao što su one opisane u U.S. patentnoj prijavi 5 856 298; polipeptide opisane u U.S. patentnoj prijavi 4 703 008; agoniste opisane u U.S. patentnoj prijavi 5 767 078; peptide koji vežu eritropoetinski receptor, kao što je opisano u U.S. patentnim prijavama 5 773 569 i 5 830 851; niskomolekularne mimetike koji aktiviraju eritropoetinski receptor, kako je opisano u U.S. patentnoj prijavi 5 835 382; i analoge eritropoetina opisane u WO 9505465, WO 9718318 i WO 9818926. Svi prethodno spomenuti citati uključeni su ovdje u onoj mjeri ukoliko se ta otkrića odnose na različite alternativne oblike ili postupke pripreme takvih oblika eritropoetina ovog izuma.

Eritropoetin se može dobiti komercijalno, na primjer, pod trgovačkim imenima PROCRIT, dostupno od Ortho Biotech Inc., Raritan, NJ i EPOGEN, dostupno od Amgen, Inc., Thousand Oaks, CA.

Aktivnost (u jedinicama) eritropoetina i eritropoetinu sličnih molekula tradicionalno se definira na osnovi njegove učinkovitosti u stimuliranju proizvodnje crvenih krvnih stanica u modelima glodavaca (i kako je dobiveno međunarodnim standardima eritropoetina). Jedna jedinica (U) regularnog eritropoetina (M.M. oko 34 000) je ~8 ng proteina (1 mg proteina je približno 125 000 U). Međutim, budući da je učinak na eritropoezu sporedan u odnosu na ovdje poželjne aktivnosti i ne mora nužno biti zamjetno svojstvo nekih eritropoetina ovog izuma, definicija aktivnosti koja se temelji na eritropoetskoj aktivnosti je neprikladna. Tako je ovdje korištena jedinica aktivnosti eritropoetina ili eritropoetinu sličnih molekula definirana kao količina proteina potrebna da potakne istu aktivnost u živčanim ili drugim staničnim sustavima koji reagiraju na eritropoetin kako je potaknuto WHO međunarodnim standardom eritropoetina u istom sustavu. Stručnjak područja će lako odrediti jedinicu ne-eritropoetskog eritropoetina ili slične molekule u skladu s ovdje danim uputama.

Uz gore spomenute modifikacije eritropoetina, diskusija u nastavku proširena je na različite eritropoetine ovog izuma.

Eritropoetin ovog izuma može biti bez jedinica sijalne kiseline, što se naziva asijaloeritropoetin. Poželjno je da je eritropoetin ovog izuma humani asijaloeritropoetin. U alternativnim ostvarenjima, eritropoetin ovog izuma može imati barem 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 ili 13 jedinica sijalne kiseline. Može se pripremiti desijalizacijom eritropoetina upotrebom sijalidaze, kako je opisano u uputama proizvođača za Sijalidazu A od ProZyme Inc., San Leandro, California. Tipično, PROZYME® GLYCOPRO® sekvencirajuća SIALCDASE ATM (N-acetilneuraminat-glikohidrolaza, E.C. 3.2.1.18) korištena je za cijepanje svih nereducirajućih terminalnih ostataka sijalne kiseline u kompleksnim ugljikohidratima i glikoproteinima kao što je eritropoetin. Također cijepa razgranate sijalne kiseline (vezane na unutarnje ostatke). Sijalidaza A je izolirana iz klon *Arthrobacter ureafaciens*.

Eritropoetin može imati smanjen broj N-vezanih ugljikohidrata. Za uklanjanje N-vezanih ugljikohidrata, eritropoetin se može tretirati hidrazinom, u skladu, na primjer, s postupkom opisanom u Hermentin i sur., 1996, Glycobiology 6(2):217-30. Kako je gore naznačeno, eritropoetin ima tri N-vezane ugljikohidratne jedinice; ovaj izum uključuje eritropoetine s dva, jednim ili nijednim N-vezanim ugljikohidratom.

Eritropoetin ovog izuma može imati smanjen sadržaj ugljikohidrata u postupku tretiranja nativnog eritropoetina bar jednom glikozidazom. Na primjer, moguće je slijediti postupak Chen i Evangelista, 1998, Electrophoresis 19(15): 2639-44. Nadalje, uklanjanje O-vezanog ugljikohidrata može se postići postupcima opisanom u Hokke i sur., 1995, Eur. J. Biochem. 228(3):981-1008.

Ugljikohidratni dio molekule eritropoetina može imati glikozilacijski uzorak kakav se ne susreće u sisavaca, i to postupkom ekspresije rekombinantnog eritropoetina u stanicama ne-sisavaca. Poželjno je da se eritropoetin eksprimira u stanicama kukaca ili biljaka. Kao neograničavajući primjer, ekspresija eritropoetina u stanicama kukaca upotrebom bakulovirusnog ekspresijskog sustava može se provesti u skladu s Quelle i sur., 1989, Blood 74(2):652-657. Drugi postupak opisan je u U.S. patentnoj prijavi 5 637 477. Ekspresija u biljnom sustavu može se provesti u skladu s postupkom Matsumoto i sur., 1993, Biosci. Biotech. Biochem. 57 (8):1249-1252. Alternativno, ekspresija u bakterijama rezultirat će neglikoziliranim oblicima eritropoetina. Ovo su tek primjeri postupaka korisnih u proizvodnji eritropoetina ovog izuma, i ni na koji način nisu ograničavajući.

Eritropoetin ovog izuma može imati bar jedan ili više oksidiranih ugljikohidrata koji mogu također biti i kemijski reducirani. Na primjer, eritropoetin može biti oksidiran perjodatom; takav eritropoetin oksidiran perjodatom može također biti kemijski reducirani solima borohidrida kao što je natrijev borohidrid ili natrijev cijanoborohidrid. Oksidacija eritropoetina perjodatom može se provesti, na primjer, postupcima opisanom u Linsley i sur., 1994, Anal. Biochem. 219(2):207-17. Kemijska redukcija nakon oksidacije perjodatom može se provesti slijedeći postupke Tonelli i Meints., 1978, J. Supramol. Struct. 8(1):67-78.

Eritropoetin za ranije spomenute upotrebe može imati bar jedan ili više modificiranih argininskih ostataka. Na primjer, modificirani eritropoetin može uključivati R-glioksalnu jedinicu na jednom ili više argininskih ostataka, pri čemu R može biti aril, heteroaril, niža alkilna, niža alkoksi ili cikloalkilna grupa. Kako je ovdje korišteno, izraz niži «alkil» odnosi se na ravnu ili razgranatu zasićenu alifatsku ugljikovodikovu grupu koja sadrži najbolje 1-6 ugljikovih atoma. Primjeri takvih grupa su metil, etil, izopropil, izobutil, butil, pentil, heksil i slično. Izraz «alkoksi» odnosi se na nižu alkilnu grupu kako je gore definirano, vezanu na ostatak molekule pomoću kisika. Primjeri alkoksi-grupa su metoksi, etoksi, propoksi, izopropoksi i slično. Izraz «cikloalkil» odnosi se na cikličke alkilne grupe s tri do osam ugljikovih atoma, uključujući na primjer ciklopropil, ciklobutil, cikloheksil i slično. Izraz aril odnosi se na fenilne i naftilne grupe. Izraz heteroaril odnosi se na heterocikličke grupe koje sadrže 4 do 10-člani prsten i 1-3 heteroatom izabranih između kisika, dušika i sumpora. Primjeri uključuju, ali nisu ograničeni na njih, izoksazolil, fenilizoksazolil, furil, pirimidinil, kinolil, tetrahidrokinolil, piridil, imidazolil, pirodinil, 1,2,4-triazolil, tiazolil, tienil i slično. R grupa može biti supstituirana, kao što je na primjer, 2,3,4-trihidroksibutilna grupa 3-deoksiglukozona. Tipični primjeri R-glioksalnih spojeva su glioksal, metilglioksal, 3-deoksiglukozon i fenilglioksal. Poželjni R-glioksalni spojevi su metilglioksal ili

fenilglioksal. Primjer postupka za takvu modifikaciju nalazi se u radu Werber i sur., 1975, *Isr. J. Med. Sci.* 11(11):1169-70, uz upotrebu fenilglioksala.

U slijedećem primjeru, bar jedan argininski ostatak može se modificirati reakcijom s vicinalnim diketonom kao što je 2,3-butandion ili cikloheksandion, poželjno u cca 50 milimolarnom boratnom puferu pri pH 8-9. Postupak za modifikaciju 2,3-butandionom može se provesti u skladu s Riordan, 1973, *Biochemistry* 12(20):3915-3923; a cikloheksanonom u skladu s Patthy i sur., 1975, *J. Biol. Chem.* 250(2): 565-9.

Eritropoetin ovog izuma može sadržati bar jedan ili više modificiranih lizinskih ostataka ili modifikaciju N-terminalne amino-grupe eritropoetinske molekule, pri čemu su takve modifikacije rezultat reakcije lizinskog ostatka s agensom koji modificira amino-grupe. U drugom ostvarenju, lizinski ostaci mogu se modificirati reakcijom s derivatima glioksala, kao što je reakcija s glioksalom, metilglioksalom i 3-deoksiglukozonom da bi nastali alfa-cikloalkilni derivati. Primjeri su reakcije s glioksalom da bi nastao karboksimetilizin kao u Glomb i Monnier, 1995, *J. Biol. Chem.* 270(17):10017-26, ili s metilglioksalom da bi nastao (1-karboksietil)lizin, kao u Degenhardt i sur., 1998, *Cell. Mol. Biol. (Noisy-le-grand)* 44(7):1139-45. Modificirani lizinski ostatak može se dodatno kemijski reducirati. Na primjer, eritropoetin se može biotinilirati preko lizinskih grupa, u skladu s postupkom opisanom u Primjeru 5, u kojem D-biotinil-ε-aminokarpoat-N-hidroksisukcinimid-ester reagira s eritropoetinom, nakon čega slijedi uklanjanje nereagiranih biotina gel-filtracijom na koloni Centricon 10, kako je opisano u Wojchowski i Caslake, 1989, *Blood* 74(3):952-8. U ovom radu, autori koriste tri različita postupka za biotiniliranje eritropoetina, pri čemu se bilo koji od njih može upotrijebiti za pripremu eritropoetina za ovdje spomenute primjene. Biotin se može dodati na (1) jedinice sijalne kiseline, (2) ugljikohidratne grupe ili (3) amino-grupe.

U drugom poželjnom ostvarenju, lizin može reagirati s aldehidom ili reducirajućim šećerom da bi nastao imin, koji se može stabilizirati redukcijom, npr. s natrijevim cijanoborohidridom da bi nastao N-alkilirani lizin kao što je glucitol-lizin, ili se, u slučaju reducirajućih šećera može stabilizirati Amadorijevom ili Heynsovom pregradnjom da bi nastao alfa-deoksi alfa-amino šećer kao što je alfa-deoksi-alfa-fruktozilizin. Kao primjer, priprema fruktozilizin-modificiranog proteina inkubacijom s 0,5 M glukozom u natrij-fosfatnom puferu pH 7,4 krzo 60 dana opisana je u radu Makita i sur., 1992, *J. Biol. Chem.* 267:5133-5138. U drugom primjeru, lizinska grupa može biti karbamilirana, na primjer, reakcijom s cijanatnim ionom, ili alkil- ili aril-karbamilirana ili -tiokarbamilirana s alkil- ili aril-izocijanatom ili -izotocijanatom, ili može biti acilirana reaktivnim derivatom alkil- ili arilkarboksilne kiseline, kao što je reakcija s acetatnim anhidridom ili sukcinatnim anhidridom ili ftalatnim anhidridom. Primjeri su modifikacije lizinskih grupa 4-sulfofenilizotocijanatom ili acetatnim anhidridom, a oboje je opisano u Gao i sur., 1994, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91(25):12027-30. Lizinske grupe mogu također biti modificirane trinitrofenilom u reakciji s trinitrobenzensulfonskom kiselinom ili još bolje njezinim solima. Takvi postupci opisani su u nastavku u Primjeru 5.

Bar jedan tirozinski ostatak eritropoetina može se modificirati na položaju aromatskog prstena elektrofilnim reagensom, kao što je nitracija ili jodinacija. Kao neograničavajući primjer, eritropoetin može reagirati s tetranitrometanom (Nestler i sur., 1985, *J. Biol. Chem.* 260(12):7316-21); ili može biti jodiniran, kako je opisano u Primjeru 5.

Bar jedan aspartatni ili glutamatni ostatak eritropoetina može biti modificiran, kao što je u reakciji s karbodiimidom nakon čega slijedi reakcija s aminom kao što je glicinamid. Primjeri takvih modifikacija mogu se naći u Primjeru 5.

U drugom primjeru, triptofanski ostatak eritropoetina može biti modificiran, kao što je u reakciji s n-bromosukcinimidom ili n-klorosukcinimidom, slijedeći postupke opisane u Josse i sur., *Chem. Biol. Interact.* 1999 May 14; 119-120.

U još jednom primjeru, molekula eritropoetina može se prirediti uklanjanjem bar jedne amino-grupe, što se može postići u reakciji s ninhidrinom nakon čega slijedi redukcija nastale karbonilne grupe reakcijom s borohidridom.

U još jednom primjeru, dan je eritropoetin koji ima otvorenu bar jednu cistinsku vezu molekule reakcijom s reducirajućim sredstvom kao što je ditiotretitol, nakon čega slijedi reakcija nastalog sulfhidrida s jodoacetamidom, jodoctenom kiselinom ili drugim elektrofilom da bi se spriječilo ponovno nastajanje disulfidnih veza.

Dan je eritropoetin koji ima bar jednu supstituciju bilo koje aminokiseline, kao što je leucin, bar jednim lizinom, argininom, triptofanom, tirozinom ili cisteinom, upotrebom tehnika molekularne biologije.

Modificirani eritropoetin može se pripremiti podvrgavanjem eritropoetina ograničenoj kemijskoj proteolizi koja djeluje na specifične ostatke, na primjer, da cijepa poslije triptofanskih ostataka. Nastali fragmenti eritropoetina ovdje su uključeni.

Kako je ranije navedeno, eritropoetin koristan za primjenu može imati bar jednu od spomenutih modifikacija, ali može imati više od jedne modifikacije. Kao primjer modificiranog eritropoetina s jednom modifikacijom ugljikohidratnog

dijela molekule i jednom modifikacijom aminokiselinskog dijela molekule, modificirani eritropoetin može biti asijaloeritropoetin čiji su lizinski ostaci biotinilirani ili karbamilirani.

Tako su ovdje uključene različite molekule eritropoetina i farmaceutski pripravci koji ih sadrže. Takve molekule eritropoetina uključuju, ali bez ograničavanja na njih, asijaloeritropoetin, N-deglikozilirani eritropoetin, O-deglikozilirani eritropoetin, eritropoetin sa smanjenim sadržajem ugljikohidrata, eritropoetin s promijenjenim glikozilacijskim uzorkom, eritropoetin čiji su ugljikohidrati oksidirani i potom reducirani, eritropoetin modificiran arilglioksalom, eritropoetin modificiran alkilglioksalom, eritropoetin modificiran 2,3-butandionom, eritropoetin modificiran cikloheksandionom, biotinilirani eritropoetin, N-alkil-lizin-eritropoetin, glucitol-lizin-eritropoetin, alfa-deoksi-alfa-fruktozillizin-eritropoetin, karbamilirani eritropoetin, acetilirani eritropoetin, sukcinilirani eritropoetin, alfa-karboksialkil-eritropoetin, nitrirani eritropoetin, jodinirani eritropoetin, da se nabroje samo neki reprezentativni, ali neograničavajući primjeri koji se temelje na ovdje navedenim uputama. Poželjni su spomenuti modificirani oblici koji se temelje na humanom eritropoetinu.

Štoviše, neki od spomenutih eritropoetina su novi, a izum je usmjeren na takve spojeve kao i na farmaceutske sastave koji ih sadrže. Kao neograničavajući primjer, takvi novi eritropoetini uključuju eritropoetin oksidiran perjodatom, glucitol-lizin-eritropoetin, fruktozil-lizin-eritropoetin, 3-deoksiglukozon-eritropoetin i karbamilirani asijaloeritropoetin.

Moguće je koristiti niz domaćinskih ekspresijskih vektorskih sustava da bi se dobili eritropoetini i eritropoetinu slične molekule ovog izuma. Takvi domaćinski ekspresijski sustavi predstavljaju prijenosnike u kojima se eritropoetini od interesa mogu proizvesti i zatim pročitati, ali također predstavljaju stanice koje, transformirane ili transfecirane odgovarajućim kodirajućim nukleotidnim slijedovima, mogu ekspimirati modificirani eritropoetinski genski produkt *in situ*. Oni uključuju, ali bez ograničenja, bakterijske, insektne i biljne domaćinske sustave te sustave sisavaca, uključujući ljudske; na primjer, stanične sustave kukaca inficirane rekombinantnim virusnim ekspresijskim vektorima (npr. bakulovirus) koji sadrže modificiranu kodirajuću sekvencu za eritropoetinski produkt, biljni stanični sustav inficiran rekombinantnim virusnim ekspresijskim vektorom (npr. virus mozaika cvjetače, CaMV; virus mozaika duhana, TMV) ili transformirane rekombinantnim plazmidnim ekspresijskim vektorima (npr. Ti plazmid) koji sadrže kodirajuće sekvence za eritropoetinu slične molekule; ili stanični sustavi sisavaca, uključujući ljudske stanične sustave (npr. HT1080, COS, CHO, BHK, 293, 3T3) koji nose rekombinantne ekspresijske konstrukte koji sadrže promotore iz genoma stanica sisavaca (npr. metalotioneinski promotor) ili iz virusa sisavaca (npr. kasni promotor adenovirusa; 7,5 K promotor virusa vakcinije).

U nastavku, domaćinski stanični soj može se izabrati tako da modulira ekspresiju ubačene sekvence ili modificira i prerađuje genski produkt na specifičan, željeni način. Takve modifikacije (npr. glikozilacija) i prerađivanje (npr. cijepanje) proteinskih produkata mogu biti važni za funkciju proteina. Različiti domaćinski sustavi imaju karakteristične i specifične mehanizme za posttranslacijsko procesiranje i modifikaciju proteina i genskih produkata. Prikladne stanične linije i domaćinski sustavi mogu se izabrati tako da osiguraju točnu modifikaciju i procesiranje stranog proteina koji je ekspimiran. Mogu se koristiti eukariotske domaćinske stanice koje posjeduju stanični aparat za pravilnu prerađu primarnog transkripta, glikozilaciju i fosforilaciju genskog produkta. Takvi stanični sustavi sisavaca, uključujući humane domaćinske stanice uključuju, ali bez ograničenja na njih, HT1080, CHO, VERO, BHK, HeLa, COS, MDCK, 293, 3T3 i WI38.

Za dugoročnu proizvodnju rekombinantnih proteina, uz visoki prinos, poželjna je stabilna ekspresija. Na primjer, mogu se konstruirati stanične linije koje stabilno ekspimiraju genski produkt molekula sličnih eritropoetinu. Umjesto korištenja ekspresijskih vektora koji sadrže virusna ishodišta replikacije, stanice domaćina mogu se transformirati DNA kontroliranom odgovarajućim kontrolnim elementima ekspresije (npr. promotorom, pojačivačem, sekvencama, terminatorima transkripcije, poliadenilacijskim mjestima, itd.), i selektivnim markerom. Nakon uvođenja strane DNA, konstruirane stanice mogu rasti 1-2 dana u obogaćenom mediju, a zatim se prebace na selektivni medij. Selektivni marker u rekombinantnom plazmidu daje otpornost na selekciju i omogućuje stanicama da stabilno integriraju plazmid u svoje kromosome i rastu tvoreći fokuse koji se mogu klonirati i prerasti u stanične linije. Ovaj postupak može se koristiti u konstruiranju staničnih linija koje ekspimiraju genski produkt molekula sličnih eritropoetinu. Takve konstruirane stanične linije mogu naročito biti korisne u praćenju i procjeni spojeva koji utječu na endogenu aktivnost genskih produkata molekula sličnih eritropoetinu.

Alternativno, ekspresija karakteristična za endogeni eritropoetinski gen u staničnoj liniji ili mikroorganizmu može se modificirati umetanjem heterolognog regulacijskog elementa DNA u genom stabilne stanične linije ili kloniranog mikroorganizma tako da je umetnuti regulacijski element operativno povezan s endogenim eritropoetinskim genom. Na primjer, endogeni eritropoetinski gen koji je normalno «transkripcijski tih», tj. eritropoetinski gen koji normalno nije ekspimiran, ili je slabo ekspimiran u staničnoj liniji, može se aktivirati umetanjem regulacijskog elementa koji može pospješiti ekspresiju normalno ekspimiranih genskih produkata u toj staničnoj liniji ili mikroorganizmu. Alternativno, transkripcijski tih, endogeni eritropoetinski gen može se aktivirati umetanjem zajedničkog regulacijskog elementa koji djeluje u više tipova stanica.

Heterologni regulacijski element može se umetnuti u stabilnu staničnu liniju ili klonirani mikroorganizam, tako da je operativno vezan uz endogeni eritropoetinski gen, upotrebom tehnika, kao što je ciljane homologna rekombinacija, koje su dobro poznate stručnjacima područja, i opisane, npr. u francuskoj patentnoj prijavi br. 2646438 Institut Pasteur, U.S. patentnoj prijavi br. 4 215 051 Chappel; U.S. patentnoj prijavi br. 5 578 461 Sherwin i sur.; Međunarodnoj prijavi br. PCT/US92/09627 (WO93/09222) Selden i sur.; i Međunarodnoj prijavi br. PCT/US90/06436 (WO91/06667) Skoultchi i sur., pri čemu je svaka od ovih prijava ovdje u potpunosti uključena referencom.

U jednom ostvarenju ovog izuma, molekula slična eritropoetinu, koja ima smanjen broj sijalnih ostataka, ili ih uopće nema, može se proizvesti u stanicama sisavaca, uključujući i ljudske stanice. Takve stanice mogu se konstruirati tako da im manjkaju ili potpuno nedostaju enzimi koji dodaju sijalnu kiselinu, tj. β -galaktozid- α -2,3-sijalil-transferazna (« α -2,3-sijalil-transferaza») i β -galaktozid- α -2,6-sijalil-transferazna (« α -2,6-sijalil-transferaza») aktivnost. U jednom ostvarenju, korištena je stanična linija sisavaca u kojoj je jedan od, ili oba gena za enzime α -2,3-sijalil-transferazu i/ili α -2,6-sijalil-transferazu, deletiran. Takve delecije mogu se konstruirati upotrebom tehnika inaktivacije («knock-out») gena dobro poznatima u struci. U drugom ostvarenju, kao domaćinske stanice za proizvodnju rekombinantnih molekula sličnih eritropoetinu korištene su stanice jajnika kineskog hrčka (CHO) deficitarne u dihidrofolat-reduktazi (DHFR). CHO stanice ne ekspimiraju enzim α -2,6-sijalil-transferazu i, prema tome, ne dodaju sijalnu kiselinu na 2,6 vezu N-vezanih oligosaharida u glikoproteinima proizvedenima u tim stanicama. Kao rezultat, rekombinantni proteini proizvedeni u CHO stanicama nemaju sijalnu kiselinu u 2,6 vezama na galaktozu (Sasaki i sur. (1987); Takeuchi i sur. ranije; Mutsaers i sur. Eur. J. Biochem. 156, 651 (1986); Takeuchi i sur., J. Chromatogr. 400, 207 (1987)). U jednom ostvarenju, deletiran je gen koji kodira α -2,3-sijalil-transferazu u CHO stanicama, da bi se dobile domaćinske stanice za proizvodnju asijalo-eritropoetina. Takvim CHO stanicama s inaktiviranim genom za α -2,3-sijalil-transferazu posve nedostaje sijaliltransferazna aktivnost, i, kao rezultat, korisne su za ekspresiju i proizvodnju rekombinantnih asijaloeritropoetina.

U drugom ostvarenju, asijaloglikoproteini se mogu proizvesti interferiranjem s prijenosom sijalne kiseline u Golgijev aparat, npr. Eckhardt i sur., 1998, J. Biol. Chem. 273:20189-95. Upotrebom metoda dobro poznatima stručnjacima područja (npr. Oelmann i sur., 2001, J. Biol. Chem. 276:26291-300), može se izvesti mutageniza prijenosnika nukleotid-šećer CMP-sijalne kiseline da bi se dobili mutanti stanica jajnika kineskog hrčka. Te stanice ne mogu dodavati sijalnu kiselinu na glikoproteine kao što je eritropoetin i proizvode samo asijaloeritropoetin. Transfecirane stanice sisavaca koje proizvode eritropoetin također proizvode citosolnu sijalidazu koja, ukoliko procuri u medij, vrlo učinkovito degradira sijaloeritropoetin (npr. Gramer i sur, 1995 Biotechnology 13:692-698). Upotrebom postupaka dobro poznatima stručnjacima područja (npr. iz podataka koje daje rad Ferrari i sur., 1994, Glycobiology 4:367-373), stanične linije mogu se transfecirati, mutirati ili se na drukčiji način postigne konstitucijska proizvodnja sijalidaze. Na taj način, asijaloeritropoetin se može proizvesti tijekom njegove prerade.

U praksi jednog aspekta ovog izuma, farmaceutski pripravak kako je gore opisan, koji sadrži eritropoetin, može se dati sisavcu na bilo koji način koji omogućuje dovoljnu razinu eritropoetina u vaskulaturi da omogućiti prijenos preko barijere endotelnih stanica i dobre učinke na stanice koje reagiraju na eritropoetin. Kad se koristi za perfuziju tkiva ili organa, poželjni su slični rezultati. U slučaju kad se eritropoetin koristi za perfuziju *ex vivo*, eritropoetin može biti u bilo kojem obliku eritropoetina kakvi su ranije opisani, ali bez ograničenja na njih, a može uključivati i nativne eritropoetine, također i humani eritropoetin. U slučaju kad stanice ili tkivo nisu prokrvljeni i/ili je davanje metodom inkubiranja stanica ili tkiva u otopini sastava ovog izuma, farmaceutski pripravak daje učinkovitu količinu eritropoetina koja povoljno djeluje na stanice koje reagiraju na eritropoetin. Barijera endotelnih stanica kroz koju eritropoetin možda mora proći uključuje čvrste spojeve, perforirane spojeve, fenestrirane spojeve, i bilo koji tip drugih barijera endotelnih stanica prisutnih u sisavaca. Poželjna barijera je čvrsti spoj endotelnih stanica, ali izum nije tako ograničavajući.

Ranije spomenuti eritropoetini korisni su općenito za terapijski ili profilaktički tretman ljudskih bolesti središnjeg ili perifernog živčanog sustava koje imaju primarno neurološke ili psihijatrijske simptome, očnih bolesti, kardiovaskularnih bolesti, srčano-plućnih bolesti, dišnih bolesti, bolesti bubrega, mokraćnih i reproduktivnih puteva, gastrointestinalnih bolesti, te endokrinih i metaboličkih poremećaja. Naročito takva stanja i bolesti uključuju hipoksična stanja, koja štetno utječu na ekscitabilna tkiva, kao što su ekscitabilna tkiva u središnjem živčanom sustavu, perifernom živčanom sustavu, srčanom tkivu ili tkivu mrežnice, kao što su, na primjer, mozak, srce ili mrežnica/oko. Dakle, izum se može koristiti za liječenje ili sprečavanje oštećenja podražljivog tkiva kao posljedice hipoksičnih stanja u raznim uvjetima i okolnostima. Neograničavajući primjeri takvih stanja i okolnosti navedeni su u tablici u nastavku.

Kao primjer može se navesti zaštita živčanog tkiva od patoloških stanja koja je moguće liječiti u skladu s ovim izumom, pri čemu takva patološka stanja uključuju posljedice smanjene oksigenacije živčanog tkiva. Bilo koje stanje koje smanjuje dostupnost kisika živčanom tkivu i dovodi do stresa, oštećenja i naposljetku smrti živčanih stanica može se liječiti postupcima ovog izuma. Takva stanja općenito se navode kao hipoksija i/ili ishemija, a proizlaze iz, odnosno dovode do moždanog udara, začepljenja krvne žile, prenatalnog ili postnatalnog manjka kisika, gušenja, davljenja,

utapanja, trovanja ugljičnim monoksidom, udisanja dima, traume, uključujući operaciju i radioterapiju, asfiksije, epilepsije, hipoglikemije, kronične opstruktivske plućne bolesti, emfizema, respiracijskog distres-sindroma odraslih, hipotenzivnog šoka, septičkog šoka, inzulinskog šoka, krize srpastih stanica, srčanog aresta, disritmije, dušične narkoze i neuroloških deficita uzrokovanih postupcima ugradnje srčano-plućne prenosnice.

U jednom ostvarenju, na primjer, specifični pripravci EPO mogu se dati u svrhu sprečavanja ozljede ili oštećenja tkiva kao posljedice rizika od oštećenja tijekom kirurških postupaka, kao što su, na primjer, resekcija tumora ili popravak aneurizme. Druga patološka stanja uzrokovana hipoglikemijom koja se mogu liječiti ovdje opisanim postupcima uključuju predoziranje inzulinom, koje se također navodi kao jatrogena hiperinzulinemija, inzulinom, nedostatak hormona rasta, hipokortizolizam, predoziranje lijekovima i neke tumore.

Druga patološka stanja koja su posljedica oštećenja podražljivog živčanog tkiva uključuju poremećaje s napadajima, kao što su epilepsija, konvulzije ili kronične bolesti s napadajima. Ostala stanja i bolesti koje se mogu liječiti uključuju bolesti kao što su moždani udar, multipla skleroza, hipotenzija, srčani arrest, Alzheimerova bolest, Parkinsonova bolest, cerebralna paraliza, trauma mozga ili ledne moždine, demencija kao posljedica AIDS-a, gubitak kognitivne funkcije povezan sa starenjem, gubitak memorije, amiotrofna lateralna skleroza, napadaji, alkoholizam, retinalna ishemija, oštećenje očnog živca kao posljedica glaukoma i gubitak neurona.

Specifični pripravci i postupci ovog izuma mogu se koristiti u liječenju bolesti i oštećenja retinalnog tkiva. Takve bolesti uključuju, ali bez ograničenja, retinalnu ishemiju, makularnu degeneraciju, odvajanje (ablaciju) mrežnice, retinitis pigmentosa, arteriosklerotsku retinopatiju, hipertenzivnu retinopatiju, blokadu retinalne arterije, blokadu retinalne vene, hipotenziju i dijabetičku retinopatiju.

U drugom ostvarenju, glavni postupci ovog izuma mogu se koristiti u zaštiti ili liječenju oštećenja nastalih radijacijskim oštećenjem ekscitabilnog tkiva. Daljnja korist postupaka ovog izuma je liječenje trovanja neurotoksinima, kao što su trovanje školjkama, neurolatirizam i Guamova bolest, amiotrofna lateralna skleroza i Parkinsonova bolest.

Kako je ranije spomenuto, ovaj izum također je usmjeren prema postupcima za povećanje funkcije ekscitabilnog tkiva u sisavaca, i to perifernim davanjem eritropoetina kako je ranije opisano. Ovom metodom mogu se liječiti razne bolesti i stanja, štoviše, ova metoda korisna je u povećanju kognitivne funkcije u odsutnosti bilo koje bolesti. Ove upotrebe izuma opisane su detaljnije u nastavku i uključuju pospješivanje učenja i vježbanja kod ljudi i drugih sisavaca.

Stanja i bolesti koje se mogu liječiti postupcima iz ovog aspekta izuma, usmjerenih prema središnjem živčanom sustavu, uključuju, ali bez ograničenja, bolesti raspoloženja, anksioznost, depresiju, autizam, hiperaktivnost i poremećaj pomanjkanja pažnje (ADHD) i kognitivnu disfunkciju. Ova stanja ublažavaju se povećanjem neuralne funkcije. Ostale bolesti koje se mogu liječiti u skladu s uputama ovog izuma uključuju prekide spavanja, na primjer, apneju i bolesti povezane s putovanjima, subarahnoidalna i aneurizmalna krvarenja, hipotenzivni šok, ozljede od potresanja, septički šok, anafilaktički šok i posljedice raznih encefalitisa i meningitisa, na primjer, cerebritise vezane uz bolesti vezivnog tkiva kao što je lupus. Druge upotrebe uključuju prevenciju ili zaštitu od trovanja neurotoksinima, kao što je trovanje školjkama, neurolatirizam i Guamova bolest, amiotrofna lateralna skleroza, Parkinsonova bolest; postoperativno liječenje emboličnog ili ishemičnog oštećenja; ozračenje cijelog mozga, krizu srpastih stanica i eklampsiju.

Slijedeća grupa stanja koja je moguće liječiti postupcima ovog izuma uključuju disfunkciju mitohondrija, bilo nasljedne ili stečene prirode, koja je uzrok mnogih neuroloških bolesti karakteriziranih oštećenjem ili smrću neurona. Na primjer, Leighova bolest (subakutna nekrotizirajuća encefalopatija) karakterizirana je progresivnim gubitkom vida i encefalopatijom zbog gubitka neurona, te miopatijom. U tim slučajevima, defektivni metabolizam mitohondrija ne doprinosi dovoljno visokoenergetskih supstrata da omogući metabolizam ekscitabilnih stanica. Modulator aktivnosti eritropoetskog receptora optimizira poremećenu funkciju u nizu mitohondrijskih bolesti. Kako je ranije spomenuto, hipoksična stanja štetno utječu na ekscitabilna tkiva. Ekscitabilna tkiva uključuju, ali bez ograničenja, tkivo središnjeg živčanog sustava, periferni živčani sustav i srčano tkivo. Uz gore opisana stanja, postupci ovog izuma korisni su u liječenju trovanja udisanjem, kao što je ugljični monoksid i udisanje dima, teška astma, respiracijski distres-sindrom odraslih, te gušenje i utapanje. Daljnja stanja koja dovode do hipoksičnih uvjeta ili na neki drugi način potiču oštećenje ekscitabilnog tkiva uključuju hipoglikemiju koja se može javiti pri neprikladnom doziranju inzulina, ili kod tumora koji proizvode inzulin (inzulinoma).

Razne neuropsihološke bolesti za koje se vjeruje da potječu od oštećenja ekscitabilnog tkiva mogu se liječiti trenutnim postupcima. Kronične bolesti, u koje je uključeno neuronalno oštećenje i čije liječenje omogućuje ovaj izum, uključuju poremećaje povezane sa središnjim i/ili perifernim živčanim sustavom, uključujući gubitak kognitivne funkcije povezan sa starenjem i senilnu demenciju, kronične bolesti s napadajima, Alzheimerovu bolest, Parkinsonovu bolest, demenciju, gubitak pamćenja, amiotrofnu lateralnu sklerozu, multiplu sklerozu, tuberoznu sklerozu, Wilsonovu bolest, cerebralnu i progresivnu supranuklearnu paralizu, Guamovu bolest, Lewy-ovu demenciju, prionske bolesti kao što su spongiformne encefalopatije, npr. Creutzfeldt-Jakobova bolest, Huntingtonovu bolest, miotoničnu distrofiju, Freidrichovu ataksiju i

- 5 druge ataksije, kao i Gilles de la Tourette-ov sindrom, bolesti s napadajima kao što su epilepsija i kronične bolesti s napadajima, moždani udar, traume mozga i leđne moždine, demenciju kao posljedicu AIDS-a, alkoholizam, autizam, retinalnu ishemiju, glaukom, poremećaje autonomne funkcije kao što su hipertenzija i poremećaji spavanja, te neuropsihijatrijske bolesti koje uključuju, ali bez ograničenja, shizofreniju, shizoafektivni poremećaj, poremećaj pažnje, distimnični poremećaj, depresiju, maniju, opsesivno-kompulzivni poremećaj, poremećaj uzimanja psihoaktivnih tvari, anksioznost, panični poremećaj, kao i unipolarni i bipolarni afektivni poremećaj. Dodatni neuropsihijatrijski i neurodegenerativni poremećaji uključuju, na primjer, one navedene u Dijagnostičkom i statističkom priručniku mentalnih poremećaja Američkog psihijatrijskog društva (DSM), čija je najnovija verzija ovdje u potpunosti uključena referencom.
- 10 U drugom ostvarenju, moguće je koristiti kimerne molekule toksina koje sadrže eritropoetin, radi terapijskog dovođenja toksina, a u svrhu liječenja proliferativne bolesti, kao što je rak, ili virusne bolesti, kao što je subakutni sklerotični panencefalitis.
- 15 Slijedeća tablica navodi dodatne neograničavajuće primjere indikacija raznih stanja i bolesti koje je moguće liječiti prethodno spomenutim eritropoetinima.

<i>stanica, tkivo ili organ</i>	<i>disfunkcija ili patologija</i>	<i>stanje ili bolest</i>	<i>tip</i>
srce	ishemija	koronarna bolest arterija	akutna, kronična stabilna, nestabilna
		infarkt miokarda	Dresslerov sindrom
		angina	
		kongenitalna bolest srca	valvularna kardiomiopatija
		Prinzmetalova angina	
	aritmija	kardijalna ruptura	aneurizmatska septalna perforacija
		angiitis	
		tahi-, bradiaritmija supraventrikularna, ventrikularna poremećaji provođenja	stabilna, nestabilna hipersenzitivni čvor karotidnog sinusa
	kongestivni zastoj srca	lijevi, desni, biventrikularni	kardiomiopatije, kao što su obiteljske idiopatske, infektivne, metaboličke, poremećeno pohanjivanje, mane, bolesti vezivnog tkiva, infiltrati i granulomi, neurovaskularne
		miokarditis	autoimuni, infektivni, idiopatski
krvne žile	tupa i prodiruća trauma toksini	cor pulmonale	
		kokain	
	hipertenzija dekompresijska bolest fibromuskularna hiperplazija aneurizma	primarna, sekundarna	
		operirana, puknuta, povećana	
pluća	opstruktivna	astma kronični bronhitis emfizem i začepjenje dišnih puteva	
		plućna embolija, plućna tromboza, masna embolija	
	ishemična bolest pluća okolišna bolest pluća ishemična bolest pluća		
		plućna embolija	

<i>stanica, tkivo ili organ</i>	<i>disfunkcija ili patologija</i>	<i>stanje ili bolest</i>	<i>tip</i>
		plućna tromboza	
	intersticijska bolest pluća	idiopatska plućna fibroza	
	kongenitalna	cistična fibroza	
	cor pulmonale		
	trauma		
	pneumonija i pneumonitis	infektivna, parazitska, toksična, traumatska, upala, aspiracija	
	sarkoidoza		
pankreas	endokrina	diabetes mellitus, tip I i II	propadanje beta-stanica, disfunkcija dijabetička neuropatija
		oštećenje drugih endokrinih stanica pankreasa	
	egzokrina	egzokrina bolest pankreasa	pankreatitis
kost	osteopenija	primarna sekundarna	hipogonadizam imobilizacija postmenopauzalna vezana uz dob hiperparatioroidizam hipertiroidizam nedostatak kalcija, magnezija, fosfora i/ili vitamina D
	osteomijelitis		
	avaskularna nekroza		
	trauma		
	Pagetova bolest		
koža	alopecija	areata totalis	primarna sekundarna muški uzorak ćelavosti
	vitiligo	lokalizirana opća	primarni sekundarni
	dijabetička ulceracija		
	periferna vaskularna bolest		
	opekline		
autoimune bolesti	lupus erythematoses Sjörgen reumatoidni artritis glomerulonefritis angiitis		
	Langerhansova histiocitoza		
oko	optički neuritis		
	tupe i prodorne ozljede, infekcije, sarkoidoza, bolest srpastih stanica, odvajanje retine, temporalni arteritis		
embrionalne i fetalne bolesti	gušenje		
	ishemija		
središnji živčani sustav	sindrom kroničnog umora, akutni i kronični		

stanica, tkivo ili organ	disfunkcija ili patologija	stanje ili bolest	tip
	hipoosmolarni i hiperosmolarni sindromi, demencija uz AIDS, elektrokucija		
	encefalitis	rabies, herpes	
	meningitis		
	subduralni hematom		
	ovisnost o nikotinu		
	ovisnost o drogama i odvikavanje	kokain, heroin, crack, marihuana, LSD, PCP, ovisnost o više droga, ecstasy, opioidi, sedativni hipnotici, amfetamini, kofein	
	opsesivno-kompulzivne bolesti		
	spinalna stenoza, transverzalni mijelitis, Guillian-Barre, trauma, kompresija korijena živca, tumorska kompresija, toplotni udar		
uho, grlo, nos	tinnitus Meunier-ov sindrom gubitak sluha		
	traumatska ozljeda, barotrauma		
bubreg	bubrežni infarkt	akutni, kronični	vaskularni/ishemični, intersticijska bolest, dijabetička bolest bubrega, nefrotički sindromi, infekcije
	Henoch-Schönleinova purpura		
poprečno-prugasti mišići	autoimune bolesti	myasthenia gravis dermatomiozitis polimiozitis	
	miopatije	nasljedne metaboličke, endokrine i toksične	
	srčani udar		
	ozljeda od udarca		
	rabdomioza		
	mitohondrijske bolesti		
	infekcija	nekrotizirajući fasciitis	
seksualna disfunkcija	centralna i periferna	impotencija kao posljedica liječenja	
jetra	hepatitis	virusni, bakterijski, parazitski	
	ishemična bolest		
	ciroza, masna jetra		
	infiltrativne/metaboličke bolesti		
gastrointestinalni sustav	ishemična bolest crijeva		

<i>stanica, tkivo ili organ</i>	<i>disfunkcija ili patologija</i>	<i>stanje ili bolest</i>	<i>tip</i>
	upalna bolest crijeva		
	nekrotizirajući enterokolitis		
transplantacija organa	liječenje davaoca i primaoca		
reproduktivni trakt	neploidnost	vaskularna autoimuna abnormalnosti maternice poremećaji implantacije	
endokrini sustav	hiper- ili hipofunkcija žlijezda		

Kako je gore spomenuto, ove bolesti, poremećaji ili stanja samo ilustriraju raspon koristi koje omogućuju eritropoetini ovog izuma. Također, ovaj izum općenito omogućuje terapijski ili profilaktički tretman posljedica mehaničke traume ili ljudskih bolesti. Poželjni su terapijski ili profilaktički tretman bolesti, poremećaja ili stanja središnjeg i/ili perifernog živčanog sustava. Omogućen je terapijski ili profilaktički tretman bolesti, poremećaja ili stanja koja imaju psihijatrijsku komponentu. Omogućen je i terapijski ili profilaktički tretman bolesti, poremećaja ili stanja koja uključuju, ali bez ograničenja, očnu, kardiovaskularnu, kardiopulmonarnu, respiratornu, bubrežnu, urinarnu, reproduktivnu, gastrointestinalnu, endokrinu ili metaboličku komponentu.

U jednom ostvarenju, takav farmaceutski pripravak eritropoetina može se davati sistemski da bi se zaštitile ili povećale ciljane stanice, tkivo ili organ. Takvo davanje može biti parenteralno, putem inhalacije ili transmukozalno, npr. oralno, nazalno, rektalno, intravaginalno, sublingvalno, submukozalno ili transdermalno. Poželjno je parenteralno davanje, npr. putem intravenske ili intraperitonealne injekcije, a također je moguće i intraarterijsko, intramuskularno, intradermalno i supkutano davanje.

Za druge načine davanja, kao što je upotreba perfuzata, injekcije u organ, ili drugog oblika lokalnog davanja, omogućen je farmaceutski pripravak koji rezultira u sličnim razinama eritropoetina kako je gore opisano. Poželjna je razina od oko 15 pM – 30 nM.

Farmaceutski pripravci izuma mogu uključivati terapijski učinkovitu količinu spoja i farmaceutski prihvatljiv nosač. U specifičnom ostvarenju, izraz «farmaceutski prihvatljiv» podrazumijeva da je odobren od Odbora za regulaciju državne uprave, ili da je naveden u U.S. farmakopeji ili nekoj drugoj prepoznatljivoj stranoj farmakopeji za upotrebu u životinja, specifičnije u ljudi. Izraz «nosač» odnosi se na diluent, adjuvant, ekscipijent ili nosač s kojim se lijek daje. Takvi farmaceutski nosači mogu biti sterilne tekućine, kao što su otopine soli u vodi i uljima, uključujući petrolej, životinjska, biljna ili sintetska ulja, kao što su ulje kikirikija, soje, mineralno ulje, sezamovo ulje i slično. Otopina soli poželjan je nosač kad se farmaceutski pripravak daje intravenski. Otopine soli i vodene otopine dekstroze i glicerola mogu se također koristiti kao tekući nosači, naročito za injektibilne otopine. Prikladni farmaceutski ekscipijenti uključuju škrob, glukozu, laktozu, saharozu, želatinu, slad, rižu, brašno, kredu, silikagel, natrijev stearat, glicerol-monostearat, talk, natrijev klorid, suho obrano mlijeko, glicerol, propilen, glikol, vodu, etanol i slično. Pripravak, ako je potrebno, može također sadržavati male količine sredstava za vlaženje ili emulgaciju, ili za puferiranje pH. Takvi pripravci mogu biti u obliku otopina, suspenzija, emulzija, tableta, pilula, kapsula, prašaka, formulacija za odgođeno otpuštanje i slično. Pripravak može biti formuliran kao čepić, s uobičajenim vezivima i nosačima kao što su trigliceridi. Pripravci ovog izuma mogu biti formulirani u neutralnom obliku ili u obliku soli. Farmaceutski prihvatljive soli uključuju one koje nastaju sa slobodnim amino-grupama, kao što su one koje potječu od klorovodične, fosforne, octene, oksalne, tartarne kiseline, itd., kao i one koje nastaju sa slobodnim karboksilnim grupama, kao što su one koje potječu od natrijevog, kalijevog, amonijevog, kalcijevog i željeznog hidroksida, izopropilamina, trietilamina, 2-ctilamino-ctanola, histidina, prokaina, itd. Primjeri prikladnih farmaceutskih nosača opisani su u «Remington's Pharmaceutical Sciences» E.W. Martina. Takvi pripravci sadržat će terapijski učinkovitu količinu spoja, poželjno u pročišćenom obliku, zajedno s odgovarajućom količinom nosača tako da se omogući prikladan oblik davanja pacijentu. Formulacija bi trebala slijediti način davanja.

Farmaceutski pripravci prilagođeni za oralno davanje mogu biti pripremljeni kao kapsule ili tablete; kao prašci ili granule; kao otopine, sirupi ili suspenzije (u vodenoj ili ne-vodenoj tekućini); kao jestive pjene ili kao emulzije. Tablete ili kapsule od tvrde želatine mogu sadržati laktozu, škrob ili njihove derivate, magnezijev stearat, natrij-saharin, celulozu, magnezijev karbonat, stearinsku kiselinu ili njezine soli. Kapsule od meke želatine mogu sadržati biljna ulja, voskove, masti, polučvrste ili tekuće poliole, itd. Otopine i sirupi mogu sadržati vodu, poliole i šećere.

Aktivni sastojak namijenjen oralnom davanju može biti obložen ili pomiješan s materijalom koji odgađa razgradnju i/ili apsorpciju aktivnog sastojka u gastrointestinalnom traktu (npr. mogu se koristiti gliceril-monostearat ili gliceril-distearat). Tako je moguće postići odgođeno otpuštanje aktivnog sastojka tijekom više sati, i, ukoliko je potrebno, aktivni sastojak može se zaštititi od razgradnje u želucu. Farmaceutski pripravci za oralno davanje mogu se formulirati da olakšaju oslobađanje aktivnog sastojka na određenom mjestu u gastrointestinalnom traktu zbog specifičnih pH ili enzimskih uvjeta.

Farmaceutski pripravci prilagođeni transdermalnom davanju mogu biti pripremljeni kao diskretni flasteri čija je namjena da ostanu u neposrednom kontaktu s epidermisom primaoca tijekom duljeg vremenskog perioda. Farmaceutski pripravci prilagođeni topikalnom davanju mogu biti pripremljeni kao masti, kreme, suspenzije, losioni, prašci, otopine, paste, gelovi, sprejevi, aerosoli ili ulja. Za topikalno davanje na kožu, usta, oko ili drugo vanjsko tkivo poželjna je upotreba topikalne masti ili kreme. Kad je formuliran u obliku masti, aktivni sastojak može se koristiti s parafinskom osnovom ili osnovom za mast koja se miješa s vodom. Alternativno, aktivni sastojak može se formulirati u kremu s osnovicom ulja u vodi ili vode u ulju. Farmaceutski pripravci prilagođeni topikalnom davanju u oko uključuju kapi za oči. U tim pripravcima, aktivni sastojak može se otopini ili suspendirati u prikladnom nosaču, npr. u vodenom otapalu. Farmaceutski pripravci prilagođeni topikalnom davanju u usta uključuju bombone, pastile i sredstva za ispiranje usta.

Farmaceutski pripravci prilagođeni za nazalno i pulmonarno davanje mogu sadržati čvrste nosače kao praške (poželjne veličine čestica u rasponu od 20 do 500 mikrona). Prašci se mogu davati ušmrkavanjem, tj. brзом inhalacijom kroz nos iz spremnika praška koji se drži u blizini nosa. Alternativno, pripravci prilagođeni nazalnom davanju mogu sadržati tekuće nosače, npr. nosne sprejeve ili kapi za nos. Alternativno, inhalacija izravno u pluća može se postići dubokim udisanjem ili instalacijom kroz usta u orofarinks. Ovi pripravci mogu sadržati vodene ili uljne otopine aktivnog sastojka. Pripravci za davanje inhalacijom mogu se pripremiti u posebno prilagođenim oblicima uključujući, ali bez ograničenja, aerosole pod tlakom, raspršivače ili insuflatore, koji se mogu konstruirati tako da omoguće prethodno određeno doziranje aktivnog sastojka. U poželjnom ostvarenju, farmaceutski pripravci ovog izuma daju se izravno u nosnu šupljinu ili u pluća preko nosne šupljine ili orofarinksa.

Farmaceutski pripravci prilagođeni za rektalno davanje mogu se pripremiti kao čepići ili klistiri. Farmaceutski pripravci prilagođeni za vaginalno davanje mogu se pripremiti kao ulošci, tamponi, kreme, gelovi, paste, pjene ili sprejevi.

Farmaceutski pripravci prilagođeni za parenteralno davanje uključuju vodene i ne-vodene sterilne injektibilne otopine ili suspenzije koje mogu sadržati antioksidanse, pufere, bakteriostatike i otapala koja čine pripravak izotoničnim s krvlju primaoca. Drugi sastojci koji mogu biti prisutni u takvim pripravcima uključuju vodu, alkohole, poliole, glicerol i biljna ulja, na primjer. Pripravci prilagođeni parenteralnom davanju mogu biti pripremljeni u spremnicima za jednu ili više doza, na primjer, u zapečaćenim ampulama i posudicama, i mogu biti pohranjeni u liofiliziranom stanju koje zahtijeva samo dodatak sterilnog tekućeg nosača, npr. sterilne otopine soli za injekcije, neposredno prije upotrebe. Improvizirane otopine i suspenzije za injekcije mogu se pripremiti iz sterilnih prašaka, granula i tableta. U jednom ostvarenju, može se pripremiti autoinjektor koji sadrži otopinu eritropoetina za injiciranje, za hitnu upotrebu u ambulantama, hitnoj službi i situacijama na bojnopolju, čak i za samostalno davanje u kućnom okruženju, naročito kad postoji mogućnost traumatske amputacije, kao npr. kod neprikladne upotrebe kosilice za travu. Vjerojatnost da će stanice i tkivo u odrezanom stopalu ili prstu preživjeti nakon ponovnog šivanja povećana je davanjem eritropoetina na više mjesta u odrezanom dijelu što je prije moguće, čak i prije stizanja medicinskog osoblja ili stizanja ozlijeđenog pojedinca s odrežanim prstom u hitnu službu.

U poželjnom ostvarenju, pripravak je formuliran u skladu s rutinskim postupcima kao farmaceutski pripravak prilagođen za intravensko davanje ljudskim bićima. Tipično, pripravci za intravensko davanje su otopine u sterilnom izotoničnom vodenom puferu. Po potrebi, pripravak može također sadržati sredstvo za otapanje i lokalni anestetik, kao što je lidokain, za ublažavanje boli na mjestu injekcije. Općenito, sastojci se dobivaju odvojeno, ili se miješaju zajedno u jedinicu doziranja, na primjer, kao suhi liofilizirani prašak ili bezvodni koncentrat u hermetički zatvorenom spremniku kao što je ampula ili sašeta, uz naznaku količine aktivnog sastojka. Ako je pripravak potrebno dati infuzijom, može se dispensirati u infuzijskoj boci koja sadrži sterilu farmaceutsku vodu ili pufer. Ako je pripravak potrebno dati injekcijom, osigurava se ampula sterilnog pufera tako da se sastojci mogu pomiješati prije davanja.

Čepići općenito sadrže aktivni sastojak u rasponu od 0,5 % do 10 % mase; za oralne formulacije poželjno je da sadrže 10 % do 95 % aktivnog sastojka.

Sastav perfuzata može se pripremiti za upotrebu u inkubaciji presađenih organa, za perfuziju *in situ* ili za davanje u krvne žile orana donora prije uzimanja organa. Takvi farmaceutski pripravci mogu sadržati razine eritropoetina ili oblik eritropoetina koji nije prikladan za akutno ili kronično, lokalno ili sistemsko davanje pojedincu, ali poslužiti će ovdje namijenjenoj svrsi u lešu, kupelji za organ, perfuzatu organa ili perfuzatu *in situ* prije uklanjanja ili smanjenja razine eritropoetina prije povratka tretiranog organa ili tkiva u redovnu cirkulaciju. Eritropoetin u ovom aspektu izuma može

biti bilo koji eritropoetin, kao što su prirodni oblici, npr. humani eritropoetin, ili bilo koji od ranije opisanih eritropoetina, kao što su asijaloeritropoetin i fenil-glioksal-eritropoetini, na primjer.

Ovaj izum također daje farmaceutski paket ili komplet koji sadrži jedan ili više spremnika napunjenih jednim ili više sastojaka farmaceutskog pripravka izuma. Po želji, uz takve spremnike može biti bilješka u obliku propisanom od službene agencije koja regulira proizvodnju, upotrebu ili prodaju farmaceutika ili bioloških proizvoda, pri čemu bilješka potvrđuje odobrenje agencije za proizvodnju, upotrebu ili prodaju za davanje ljudima.

U drugom ostvarenju, na primjer, eritropoetin se može dati u sustavu za kontrolirano otpuštanje. Na primjer, polipeptid se može dati kroz intravensku infuziju, ugrađenu osmotsku pumpu, transdermalni flaster, liposome, ili na neki drugi način. U jednom ostvarenju, može se koristiti pumpa (vidi: Langer, *supra*; Sefton, 1987, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14:201; Buchwald i sur., 1980; Surgery 88:507; Saudek i sur., 1989, N. Engl. J. Med. 321:574). U drugom ostvarenju, spoj se može dati u vezikuli, naročito liposomu (vidi Langer, *Science* 249:1527-1533 (1990); Treat i sur., u *Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer*, Lopez-Berestein i Fiddler (ur.), Liss, New York, str. 353-369 (1989); WO 91/04014; U.S. patentna prijava br. 4 704 355; Lopez-Berestein, *ibid.*, str. 317-327; vidi općenito *ibid.*). U drugom ostvarenju, mogu se koristiti polimerni materijali (vidi *Medical Applications of Controlled Release*, Langer i Wise (ur.), CRC Press: Boca Raton, Florida, 1974; *Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance*, Smolen i Ball (ur.), Wiley: New York 81984); Ranger i Peppas, J. *Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem.* 23:61, 1953; vidi još Levy i sur., 1985, *Science* 228:190; During i sur., 1989, *Ann. Neurol.* 25:351; Howard i sur., 1989, J. *Neurosurg.* 71:105).

U još jednom ostvarenju, sustav za kontrolirano otpuštanje može se postaviti u blizinu terapijskog cilja, tj. ciljnih stanica, tkiva ili organa, pa je tako potreban samo dio sistemske doze (vidi npr. Goodson, str. 115-138 u *Medical Applications of Controlled Release*, vol. 2, *supra*, 1984). Drugi sustavi za kontrolirano otpuštanje diskutirani su u preglednom radu Langer (1990, *Science* 249:1527-1533).

U drugom ostvarenju, prikladno formulirani eritropoetin se može dati nazalnim, oralnim, rektalnim, vaginalnim ili sublingvalnim davanjem.

U specifičnom ostvarenju može biti potrebno dati pripravke eritropoetina iz ovog izuma lokalno u područje koje zahtijeva liječenje; to se može postići, na primjer, i bez ograničenja, lokalnom infuzijom tijekom operacije, topikalnom primjenom, npr. zajedno s oblogom za rane nakon operacije, injekcijom, putem katetera, čepića ili implantata, pri čemu je implantat od poroznog, neporoznog ili želatinoznog materijala, uključujući membrane, kao što su silastične membrane ili vlakna.

Odabir poželjne učinkovite doze učinit će stručnjak na temelju nekoliko faktora koji su dobro poznati u praksi. Ti faktori uključuju određeni oblik eritropoetina i njegove farmakokinetičke parametre kao što su bioraspoloživost, metabolizam, poluživot, itd., a koji su ustanovljeni tijekom razvojnih postupaka tipično korištenih u postizanju regulacijskog odobrenja za farmaceutski spoj. Daljnji faktori u razmatranju doze uključuju stanje ili bolest koju se liječi ili korist koju se postiže u normalnom pojedincu, tjelesna masa pacijenta, način davanja, je li davanje akutno ili kronično, usporedne lijekove, kao i druge faktore za koje se zna da utječu na efikasnost danih farmaceutskih sredstava. Tako o preciznom doziranju odlučuju procjena praktičara i okolnosti u kojima se nalazi pojedini pacijent, npr. ovisno o stanju i imunom statusu pojedinog pacijenta, a u skladu sa standardnim kliničkim tehnikama.

U drugom aspektu ovog izuma, omogućena je upotreba perfuzata ili otopine za perfuziju, u svrhu perfuzije i pohrane organa za presađivanje, pri čemu otopina za perfuziju sadrži količinu eritropoetina učinkovitu za zaštitu stanica koje reagiraju na eritropoetin i pridruženih stanica, tkiva ili organa. Presađivanje uključuje, ali bez ograničenja, ksenotransplantaciju, gdje se organ (uključujući stanice, tkiva ili drugi dio tijela) uzima iz davaoca i presađuje u različitog primaoca; i autotransplantaciju, gdje se organ uzima iz jednog dijela tijela i zamjenjuje na drugom, uključujući radne kirurške postupke, u kojima se organ može ukloniti i, dok je u stanju *ex vivo*, resecirati, obnoviti ili na drugi način manipulirati (npr. ukloniti tumor), i zatim vratiti na početno mjesto. U jednom ostvarenju, otopina za perfuziju je University of Wisconsin (UW) otopina (U.S. patentna prijava br. 4 798 824) koja sadrži od oko 1 do oko 25 U/mL eritropoetina, 5 % hidroksietyl-škroba (čija je molekulska masa od oko 200 000 do oko 300 000 i ne sadrži etilen-glikol, etilen-klorohidrin, natrijev klorid i acetoni); 25 mM KH_2PO_4 , 3 mM glutationa, 5 mM adenozina; 10 mM glukoze; 10 mM HEPES pufera; 5 mM magnezijevog glukonata; 1,5 mM CaCl_2 ; 105 mM natrijevog glukonata; 200 000 jedinica penicilina; 40 jedinica inzulina; 16 mg deksametazona; 12 mg fenolnog crvenila; i ima pH od 7,4-7,5 i osmolalnost od oko 320 mOsm/L. Otopina se koristi za održavanje bubrega i pankreasa iz leševa prije presađivanja. Upotrebom otopine, očuvanje se može produljiti preko 30-satnog ograničenja preporučenog za čuvanje bubrega iz leševa. Ovaj naročiti perfuzat samo je ilustracija niza takvih otopina koje se mogu prilagoditi za upotrebu uvođenjem učinkovite količine eritropoetina. U slijedećem ostvarenju, otopina za perfuziju sadrži od oko 5 do oko 35 U/mL eritropoetina, ili od oko 10 do oko 30 U/mL eritropoetina. Kako je ranije spomenuto, u ovom aspektu izuma moguće je koristiti bilo koji oblik eritropoetina.

Iako je poželjni recipijent eritropoetina za ovdje navedene namjene čovjek, ovi postupci jednako tako se mogu primijeniti i na druge sisavce, naročito na domaće životinje, stoku, kućne ljubimce i životinje u zoološkom vrtu. Međutim, izum nije tako ograničavajuć i koristi su moguće za bilo koju životinju.

5 U daljnjim aspektima izuma *ex vivo*, može se koristiti bilo koji eritropoetin, ali bez ograničenja na gore opisane eritropoetine, kao i nativni eritropoetini i njihovi analozi, mimetici i fragmenti eritropoetina, hibridna molekula eritropoetina, molekula koja veže eritropoetinski receptor, agonist eritropoetina, bubrežni eritropoetin, moždani eritropoetin, njihov oligomer, multimer, mutein, srodnik, prirodni oblik, sintetski oblik, rekombinantni oblik, glikozilacijska varijanta, deglikozilirana varijanta ili njihova kombinacija.

10 U drugom aspektu ovog izuma, dani su postupci i pripravi za povećanje vijabilnosti stanica, tkiva ili organa koji nisu izolirani od vaskulature barijerom endotelnih stanica, i to izlaganjem stanica, tkiva ili organa izravno farmaceutskom pripravku koji sadrži eritropoetin, ili davanjem farmaceutskog pripravka koji sadrži eritropoetin u krvotok ili sustav tkiva ili organa. Povećana aktivnost stanica koje reagiraju na eritropoetin u tretiranom tkivu ili organu odgovorna je za
15 pozitivne učinke koji se pojavljuju.

Kako je ranije opisano, izum se djelomično temeljni na otkriću da molekule eritropoetina mogu prijeći s luminalne površine na površinu bazalne membrane endotelnih stanica kapilara u organima sa čvrstim spojevima endotelnih stanica, uključujući, na primjer, mozak, mrežnicu i testise. Tako su stanice koje reagiraju na eritropoetin s druge strane
20 barijere prijemljivi ciljevi za korisne učinke eritropoetina, a i drugi tipovi stanica ili tkiva ili organa, koji sadrže ili u cjelini ovise o stanicama koje reagiraju na eritropoetin, ciljevi su postupaka ovog izuma. Ne želeći se vezati za određenu teoriju, nakon transcitoze eritropoetina, eritropoetin može reagirati s vlastitim receptorom na stanici koja ga sadrži, na primjer, neuralnoj, retinalnoj, mišićnoj, srčanoj, plućnoj, jetrenoj ili bubrežnoj stanici, stanici tankog crijeva, kore ili srži nadbubrežne žlijezde, endotela kapilare, testisa, jajnika ili endometrija, a vezanje receptora potiče kaskadu prijenosa
25 signala koja dovodi do aktivacije ekspresije gena unutar stanice ili tkiva koje reagira na eritropoetin, rezultirajući u zaštiti stanice, tkiva, ili organa od oštećenja toksinima, kemoterapeutskih agensa, radijacijske terapije, hipoksije, itd. Postupci za zaštitu tkiva koje sadrži stanice koje reagiraju na eritropoetin, od ozljede ili hipoksičnog stresa, i za povećanje funkcije takvog tkiva, opisani su detaljnije u nastavku.

30 U praksi jednog ostvarenja ovog izuma, pacijent sisavac podvrgnut je sistemske kemoterapiji radi liječenja raka, uključujući i radijacijsku terapiju, koja obično ima štetne učinke, kao što su oštećenja živaca, pluća, srca, jajnika ili testisa. Davanje farmaceutskog pripravka koji sadrži eritropoetin, kako je gore opisano, provodi se prije ili tijekom kemoterapije i/ili radijacijske terapije, da bi se razna tkiva i organi zaštitili od oštećenja kemoterapeutskim agensima, npr. zaštita testisa. Liječenje se može nastaviti dok razina kemoterapeutske agensa u cirkulaciji ne padne ispod razine
35 potencijalno opasne za tijelo sisavca.

U praksi drugog ostvarenja ovog izuma, namjeravano je uzeti razne organe od žrtve automobilske nesreće da bi se presadili različitom broju primaoca, pri čemu je za neke od njih potreban transport na veću udaljenost i u duljem vremenskom periodu. Prije uzimanja organa, žrtvi se daje infuzija farmaceutskog pripravka koji sadrži eritropoetin,
40 kako je ovdje opisano. Organi preuzeti za transport perfundiraju se perfuzatom koji sadrži eritropoetin, kako je ovdje opisano, i pohrane u kupelji koja sadrži eritropoetin. Neki organi perfundiraju se kontinuirano pomoću naprave za pulsirajuću perfuziju, uz korištenje perfuzata koji sadrži eritropoetin u skladu s ovim izumom. Tijekom transporta i ugradnje organa i njihove reperfuzije *in situ* dolazi do minimalnog propadanja funkcije organa.

45 U drugom ostvarenju ovog izuma, kirurški postupak za popravak srčanog zaliska zahtijeva privremenu kardioplegiju i zatvaranje arterije. Prije operacije, pacijentu se daje infuzija sa 500 U eritropoetina po kg tjelesne mase. Takav tretman sprečava hipoksično ishemično oštećenje stanica, naročito nakon reperfuzije.

U drugom ostvarenju ovog izuma, u bilo kojem kirurškom postupku, kao što je ugradnja srčano-plućne prenosnice,
50 mogu se koristiti prirodni eritropoetin ili bilo koji eritropoetin iz ovog izuma. U jednom ostvarenju, davanje farmaceutskog pripravka, koji sadrži eritropoetin kako je ranije opisano, provodi se prije, za vrijeme i/ili nakon postupka premošćenja, da bi se zaštitile funkcije mozga, srca i drugih organa.

U prethodnim primjerima u kojima je eritropoetin ovog izuma, uključujući i prirodni eritropoetin, korišten za primjene
55 *ex vivo*, ili za tretiranje stanica koje reagiraju na eritropoetin, kao što su živčano tkivo, tkivo mrežnice, srca, pluća, jetre, bubrega, tankog crijeva, kore i srži nadbubrežne žlijezde, kapilarnog endotela, testisa, jajnika ili endometrija, izum daje farmaceutski pripravak u jedinicama doziranja prilagođenima za zaštitu ili povećanje stanica, tkiva ili organa koje reagiraju na eritropoetin i nalaze se distalno od vaskulature, a koji sadrži, po jedinici doziranja, učinkovitu netoksičnu količinu u rasponu od oko 50 000 do 500 000 jedinica, 60 000 do 500 000 jedinica, 70 000 do 500 000 jedinica, 80 000
60 do 500 000 jedinica, 90 000 do 500 000 jedinica, 100 000 do 500 000 jedinica, 150 000 do 500 000 jedinica, 200 000 do 500 000 jedinica, 250 000 do 500 000 jedinica, 300 000 do 500 000 jedinica, 350 000 do 500 000 jedinica, 400 000 do 500 000 jedinica ili 450 000 do 500 000 jedinica eritropoetina, modulatora aktivnosti eritropoetinskog receptora ili

modulatora eritropoetinom aktiviranog receptora i farmaceutski prihvatljivog nosača. U poželjnom ostvarenju, učinkovita netoksična količina eritropoetina je u rasponu od oko 50 000 do 500 000 jedinica. U poželjnom ostvarenju, eritropoetin u spomenutom pripravku je ne-eritropoetski.

5 U slijedećem aspektu izuma, pokazalo se da davanje eritropoetina obnavlja kognitivnu funkciju u životinja koje su pretrpjele traumu mozga. Nakon odgode od 5 dana ili 30 dana, davanje eritropoetina još uvijek je moglo ponovo uspostaviti funkciju u usporedbi s kontrolnim životinjama, što ukazuje na sposobnost eritropoetina da obnovi i ponovo uspostavi aktivnost mozga. Tako je izum također usmjeren upotrebi eritropoetina u pripremi farmaceutskih pripravaka za liječenje traume mozga i drugih kognitivnih disfunkcija, uključujući liječenje dosta nakon povrede (npr. tri dana, pet
10 dana, tjedan, mjesec ili dulje). Izum je također usmjeren prema postupku liječenja kognitivne disfunkcije nakon ozljede davanjem učinkovite količine eritropoetina. Bilo koji eritropoetin, kako je ovdje opisano, može se koristiti u ovom aspektu izuma.

Štoviše, ovaj obnavljajući aspekt izuma usmjeren je prema upotrebi bilo kojeg od ovdje navedenih eritropoetina za
15 pripremu farmaceutskih pripravaka za obnavljanje stanične, tkivne ili organske disfunkcije, bez obzira je li tretman započeo nakon ili znatno nakon početnog udara odgovornog za disfunkciju. Nadalje, liječenje upotrebom eritropoetina iz ovog izuma može obuhvatiti tijek bolesti ili stanja za vrijeme akutne faze kao i u kroničnoj fazi.

U slučaju kad eritropoetin iz izuma ima eritropoetsku aktivnost, u poželjnom ostvarenju, eritropoetin se može davati
20 sistemski u dozama između 300 i 10 000 jedinica/kg tjelesne težine, bolje oko 500 – 5 000 jedinica/kg tjelesne težine, a najbolje oko 1000 jedinica/kg tjelesne težine. Ove učinkovite doze trebale bi biti dovoljne da se postignu serumske razine eritropoetina veće od oko 10 000, 15 000 ili 20 000 mU/mL seruma nakon davanja eritropoetina. Takve serumske razine mogu se postići oko 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ili 10 sati nakon davanja. Takve doze mogu se po potrebi ponavljati. Na primjer, davanje se može ponavljati dnevno, tako dugo dok je to klinički potrebno, ili nakon prikladnog intervala, npr.
25 svakih 1 do 12 tjedana, bolje svakih 1 do 3 tjedna. U jednom ostvarenju, učinkovita količina eritropoetina i farmaceutski prihvatljiv nosač mogu se pakirati u jednu posudicu za doziranje ili drugi spremnik. U drugom ostvarenju, eritropoetin koristan za primjenu je ne-eritropoetski, tj. može izazvati ovdje opisane aktivnosti, ali bez porasta koncentracije hemoglobina ili hematokrita. Takav ne-eritropoetski oblik eritropoetina poželjan je u slučajevima kad se postupci ovog izuma trebaju primijeniti kronično. U drugom ostvarenju, eritropoetin se daje u dozi većoj od one nužne za maksimalnu
30 stimulaciju eritropoeze. Kako je gore naznačeno, eritropoetin ovog izuma ne mora nužno imati eritropoetsku aktivnost, pa su tako gornje doze izražene u hematopoetskim jedinicama samo primjeri za eritropoetine koji djeluju eritropoetski; navedeni su i molarni ekvivalenti za doze koji se mogu primijeniti na bilo koji eritropoetin.

Ovaj izum je nadalje usmjeren prema postupku koji olakšava transport molekule preko barijere endotelnih stanica u
35 sisavaca, davanjem pripravka koji sadrži određenu molekulu u kombinaciji s eritropoetinom kako je gore opisano. Kako je ranije opisano, čvrsti spojevi između endotelnih stanica u nekim organima stvaraju barijeru ulasku nekih molekula. Za liječenje različitih stanja unutar takvog organa, poželjan je način za olakšan prolaz farmaceutskih sredstava. Eritropoetin ovog izuma koristan je kao nosač za prijenos drugih molekula preko krvno-moždane i drugih sličnih barijera. Pripremi se pripravak koji sadrži željenu molekulu i eritropoetin, te periferno davanje pripravka dovodi do transcitoze pripravka
40 kroz barijeru. Veza između molekule koja treba prijeći barijeru i eritropoetina može biti labilna kovalentna veza, a u tom slučaju se molekula otpušta iz veze s eritropoetinom nakon prelaska barijere. Ako se željena farmakološka aktivnost molekule zadržava ili ne mijenja vezanjem s eritropoetinom, može se dati takav kompleks.

Stručnjak u praksi bit će svjestan različitih načina za povezivanje molekula s eritropoetinom ovog izuma i drugim ranije
45 opisanim agensima, kovalentnim, nekovalentnim i drugim načinima; nadalje, procjena učinkovitosti pripravka može se lako odrediti u eksperimentalnom sustavu. Veza molekula s eritropoetinom može se postići na različite načine, uključujući labilno, kovalentno vezanje, unakrsno vezivanje, itd. Mogu se upotrijebiti interakcije biotina i avidina. Kako je ranije spomenuto, može se pripremiti hibridna molekula rekombinantnim ili sintetskim načinom, na primjer, koja uključuje domenu molekule sa željenom farmakološkom aktivnošću i domenu odgovornu za modulaciju aktivnosti
50 eritropoetinskog receptora.

Molekulu je moguće konjugirati na eritropoetin kroz polifunkcionalnu molekulu, tj. polifunkcionalnim unakrsnim povezateljem. Kako je ovdje korišteno, «polifunkcionalna molekula» obuhvaća molekule koje imaju jednu funkcionalnu
55 grupu koja može reagirati više od jedamput uzastopce, kao što je formaldehid, kao i molekule s više od jedne reaktivne grupe. Kako je ovdje korišteno, izraz «reaktivna grupa» odnosi se na funkcionalnu grupu vezača koja reagira s funkcionalnom grupom na molekuli (npr. peptidu, proteinu, ugljikohidratu, nukleinskoj kiselini, naročito hormonu, antibiotiku ili sredstvu protiv raka koje treba prijeći preko barijere endotelnih stanica) tako da nastaje kovalentna veza između vezača i molekule. Izraz «funkcionalna grupa» zadržava svoje uobičajeno značenje u organskoj kemiji. Polifunkcionalne molekule koje se mogu koristiti su biokompatibilni vezači, tj. oni su nekarcinogeni, netoksični i
60 neimunogeni in vivo. Polifunkcionalni unakrsni vezači, dobro poznati u struci i ovdje opisani, mogu se lako testirati u životinjskim modelima da bi se odredila njihova biokompatibilnost. Poželjno je da je polifunkcionalna molekula bifunkcionalna. Kako je ovdje korišteno, izraz «bifunkcionalna molekula» odnosi se na molekulu s dvije reaktivne

grupe. Bifunkcionalna molekula može biti heterobifunkcionalna ili homobifunkcionalna. Heterobifunkcionalni unakrsni vezač omogućuje vektorsku konjugaciju. Naročito je poželjno da je polifunkcionalna molekula dovoljno topljiva u vodi da bi se reakcije unakrsnog povezivanja mogle odvijati u vodenim otopinama puferiranima na pH 6 do 8, i da bi nastali konjugat ostao topljiv u vodi radi učinkovitije biodistribucije. Tipično, polifunkcionalna molekula kovalentno veže s amino- ili sulfhidrilnom funkcionalnom grupom. Međutim, polifunkcionalne molekule reaktivne s drugim funkcionalnim grupama, kao što su karboksilne kiseline ili hidroksilne grupe, također su dio ovog izuma.

Homobifunkcionalne molekule imaju barem dvije reaktivne funkcionalne grupe, koje su jednake. Reaktivne funkcionalne grupe na homobifunkcionalnoj molekuli uključuju, na primjer, aldehidne grupe i aktivne esterske grupe. Homobifunkcionalne grupe koje imaju aldehidne grupe uključuju, na primjer, glutaraldehid i subaraldehid. Upotreba glutaraldehida kao sredstva za unakrsno povezivanje opisana je u Poznansky i sur., Science 223, 1304-1306 (1984). Homobifunkcionalne molekule koje imaju bar dvije aktivne esterske jedinice uključuju estere dikarboksilnih kiselina i N-hidroksisukcinimida. Neki primjeri N-sukcinimidilnih estera uključuju disukcinimidil-suberat i ditio-bis-(sukcinimidil-propionat), te njihovu topljivu bis-sulfonsku kiselinu i bis-sulfonatne soli kao što su natrijeve i kalijeve soli. Ove homobifunkcionalne reagense moguće je nabaviti od Pierce, Rockford, Illinois.

Heterobifunkcionalne molekule imaju bar dvije reaktivne grupe. Reaktivne grupe reagiraju s različitim funkcionalnim grupama, npr. prisutnima na eritropoetinu i molekuli. Ove dvije različite funkcionalne grupe koje reagiraju s reaktivnom grupom na heterobifunkcionalnom vezaču obično su amino-grupa, npr. epsilon-amino-grupa lizina; sulfhidrilna grupa, npr. tiolna grupa cisteina; karboksilna kiselina, npr. karboksilat na asparaginskoj kiselini; ili hidroksilna grupa, npr. hidroksilna grupa serina.

Naravno, različite molekule eritropoetina ovog izuma ne moraju imati prikladne reaktivne grupe dostupne za upotrebu određenog sredstva za unakrsno povezivanje; međutim, stručnjak područja poznavat će izbor sredstava za unakrsno povezivanje na temelju dostupnih grupa za unakrsno povezivanje u eritropoetinu ovog izuma.

Kad reaktivna grupa heterobifunkcionalne molekule tvori kovalentnu vezu s amino-grupom, kovalentna veza će obično biti amido- ili imido-veza. Reaktivna grupa koja tvori kovalentnu vezu s amino-grupom može biti, na primjer, aktivirana karboksilna grupa, halokarbonilna grupa ili esterska grupa. Poželjna halokarbonilna grupa je klorokarbonilna grupa. Poželjne esterske grupe su reaktivne esterske grupe kao npr. N-hidroksisukcinimidna esterska grupa.

Druge funkcionalne grupe tipično su tiolna grupa, grupa koja se može prevesti u tiolsku grupu, ili grupa koja tvori kovalentnu vezu s tiolskom grupom. Kovalentna veza bit će obično tioeterska veza ili disulfid. Reaktivna grupa koja tvori kovalentnu vezu s tiolnom grupom može, na primjer, biti dvostruka veza koja reagira s tiolnim grupama ili aktiviranim disulfidom. Reaktivna grupa koja sadrži dvostruku vezu koja može reagirati s tiolnom grupom je maleimido-grupa, iako su moguće i druge, kao što je akrilonitril. Reaktivna disulfidna grupa može biti, na primjer, 2-piridiltio-grupa ili 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzojeva kiselina) grupa. Neki primjeri heterobifunkcionalnih reagensa koji sadrže reaktivne disulfidne veze uključuju N-sukcinimidil-3-(2-piridil-ditio)propionat (Carlsson i sur., 1978, Biochem. J. 173:723-737), natrijev S-4-sukcinimidiloksikarbonil-alfa-metilbenziltiosulfat i 4-sukcinimidiloksikarbonil-alfa-metil-(2-piridilditio)toluen. Poželjan je N-sukcinimidil-3-(2-piridilditio)propionat. Neki primjeri heterobifunkcionalnih reagensa koji sadrže reaktivne grupe s dvostrukom vezom koja reagira s tiolnom grupom uključuju suksinimidil-4-(N-maleimidometil)cikloheksan-1-karboksilat i suksinimidil-m-maleimidobenzoat.

Ostale heterobifunkcionalne molekule uključuju suksinimidil-3-(maleimido)-propionat, sulfosuksinimidil-4-(p-maleimido-fenil)-butirat, sulfosuksinimidil-4-(N-maleimidometil-cikloheksan)-1-karboksilat, maleimidobenzoil-N-hidroksi-suksinimid-ester. Poželjna je natrij-sulfonatna sol suksinimidil-m-maleimidobenzoata. Mnogi od gore spomenutih heterobifunkcionalnih reagensa i njihove sulfonatne soli dostupne su od Pierce Chemical Co., Rockford, Illinois, USA.

Stručnjak područja odredit će postoji li potreba da upravo opisani konjugati budu reverzibilni ili labilni. Konjugat se može testirati *in vitro* za eritropoetin i za željenu farmakološku aktivnost. Ukoliko konjugat zadržava oba svojstva, njegova se prikladnost može testirati *in vivo*. Ukoliko konjugirana molekula zahtijeva odvajanje od eritropoetina da bi bila aktivna, bolja je labilna ili reverzibilna veza s eritropoetinom. Labilna svojstva mogu se također testirati standardnim postupcima prije testiranja *in vivo*.

Dodatne informacije o proizvodnji i upotrebi ovih i drugih polifunkcionalnih reagensa mogu se dobiti iz sljedećih publikacija ili drugih, dostupnih u tom području:

- Carlsson, J. i sur., 1978, Biochem. J. 173:723-737.
- Cumber, J.A. i sur., 1985, Methods in Enzymology 112:207-224.
- Jue, R. i sur., 1978, Biochem 17:5399-5405.
- Sun, T.T. i sur., 1974, Biochem. 13:2334-2340.

- Blattler, W.A. i sur., 1985, *Biochem.* 24:1517-1520.
 Liu, F.T. i sur., 1979, *Biochem.* 18:690-697.
 Youle, R.J. i Neville, D.M.Jr., 1980, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 77:5483-5486.
 Lerner, R.A. i sur., 1981, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78:3403-3407.
 5 Jung, S.M. i Moroi, M., 1983, *Biochem. Biophys. Acta* 761:162.
 Caulfield, M.P. i sur., 1984, *Biochem.* 81:7772-7776.
 Staros, J.V., 1982, *Biochem.* 21:3950-3955.
 Yoshitake, S. i sur., 1979, *Eur.J.Biochem.* 101:395-399.
 Yoshitake, S. i sur., 1982, *J. Biochem.* 92:1413-1424.
 10 Pilch, P.F. i Czech, M.P., 1979, *J.Biol. Chem.* 254:3375-3381.
 Novick, D. i sur., 1987, *J. Biol. Chem.* 262:8483-8487
 Lomant, A.J i Fairbanks, G., 1976, *J.Mol.Biol.* 104:243-261.
 Hamada, H. i Tsuruo, T., 1987, *Anal. Biochem.* 160:483-488.
 Hashida, S. i sur., 1984, *J.Applied Biochem.* 6:56-63.

15 Dodatni postupci unakrsnog povezivanja navedeni su u preglednom radu Means i Feeney, 1990, *Bioconjugate Chem.* 1:2-12.

20 Barijere koje se mogu prijeći ranije opisanim postupcima i pripravcima ovog izuma uključuju, ali bez ograničenja, krvno-moždanu barijeru, krvno-očnu barijeru, barijeru između krvi i testisa, krvi i jajnika, te krvi i maternice.

25 Molekule kandidati za prijenos preko barijere endotelnih stanica uključuju, na primjer, hormone kao što je hormon rasta, neurotrofne faktore, antibiotike ili antifungike kao što su oni koji u normalnoj situaciji ne dopiru do mozga i drugih, barijerom odvojenih organa, peptidne radiofarmaceutike, «antisense» lijekove, antitijela protiv biološki aktivnih agensa, farmaceutike i sredstva protiv raka. Neograničavajući primjeri takvih molekula uključuju hormon rasta, faktor rasta neurona (NGF), moždani neurotrofni faktor (BDNF), cilijarni neurotrofni faktor (CNTF), bazični faktor rasta fibroblasta (bFGF), transformirajući faktor rasta $\beta 1$ (TGF $\beta 1$), transformirajući faktor rasta $\beta 2$ (TGF $\beta 2$), transformirajući faktor rasta $\beta 3$ (TGF $\beta 3$), interleukin 1, interleukin 2, interleukin 3 i interleukin 6, AZT, antitijela protiv faktora nekroze tumora i imunosupresivna sredstva kao što je ciklosporin.

30 Ovaj je izum također usmjeren prema pripravcima koji sadrže molekulu koja se treba prenijeti transcitozom kroz barijeru čvrstog spoja endotelnih stanica i eritropoetin, kako je ranije opisano. Izum je, nadalje, usmjeren prema upotrebi konjugata između molekule i eritropoetina, kako je ranije opisano, za pripremu farmaceutskog pripravka za prijenos molekule preko barijere, kako je ranije opisano.

35 Ovaj izum moći će se bolje razumjeti referiranjem na slijedeće, neograničavajuće Primjere, koji su navedeni kao primjer izuma. Slijedeći primjeri predstavljeni su s ciljem da potpuniše ilustriraju poželjno ostvarenje izuma. Međutim, nikako se ne bi smjeli shvatiti kao ograničavajući i glavni cilj izuma.

40 **Primjer 1** ERITROPOETIN PRELAZI ČVRSTU BARIJERU KRV I CEREBROSPINALNE TEKUĆINE

45 Odraslim mužjacima Sprague-Dawley štakora u anesteziji je intraperitonealno ubrizgan rekombinantni humani eritropoetin. Cerebrospinalna tekućina skupljana je iz odjeljka cisterna magna u intervalima od 30 minuta tijekom 4 sata, a koncentracija eritropoetina određena je upotrebom osjetljivog i specifičnog enzimski vezanog imunotesta. Kako je prikazano na **slici 1**, bazalna koncentracija eritropoetina u CSF je 8 mU/ml. Nakon odgode od nekoliko sati, razina eritropoetina u CSF počinje rasti i nakon 2,5 sata i kasnije značajno je različita od bazalne koncentracije na razini $p < 0,01$. Vršna razina od oko 100 mU/ml unutar je raspona za kojeg je poznato da pokazuje zaštitne učinke *in vitro* (0,1 do 100 mU/ml). Vrijeme potrebno da se dosegne vršna vrijednost je oko 3,5 h, što je značajno kasnije od vršnih serumskih razina (manje od 1 h). Rezultati ovog pokusa pokazuju da se značajne razine eritropoetina mogu postići kroz čvrsti stanični spoj parenteralnim davanjem eritropoetina u bolusu, u prikladnoj koncentraciji.

55 **Primjer 2** ZADRŽAVANJE FUNKCIJE SRCA PRIPREMLJENOG ZA PRESADIVANJE

60 Mužjacima Wistar štakora mase 300 do 330 g dan je eritropoetin (5000 U/kg tjelesne težine) ili nosač 24 h prije uklanjanja srca za studije *ex vivo*, prema protokolu Delcayre i sur., 1992, *Amer. J. Physiol.* **263**:H1537-45. Životinje su žrtvovane pentobarbitalom (0,3 mL) i intravenski heparinizirane (0,2 mL). Srca su najprije ekvilibrirana tijekom 15 min. Lijevi ventrikularni balon zatim je napuhan do volumena koji daje krajnji dijasbolički tlak od 8 mm Hg. Konstruirana je krivulja lijevog ventrikularnog tlaka prema volumenu, uz porast napuhavanja volumena balona po 0,02 ml. Nulti volumen definiran je kao točka u kojoj je lijevi ventrikularni krajnji dijasbolički tlak nula. Po završetku krivulje tlak-

volumen, lijevi ventrikularni balon ispuhan je do povratka krajnjeg dijastoličkog tlaka natrag do 8 mm Hg, te je proveden kontrolni period kroz 15 min, nakon provjere koronarnog protoka. Zatim je srce zaustavljeno s 50 mL Celsior+ molekule u mirovanju na 4 °C pod tlakom od 60 cm H₂O. Srce je zatim uklonjeno i pohranjeno tijekom 5 sati na 4 °C u plastičnom spremniku u istoj otopini, okruženo smravljenim ledom.

Po završetku pohrane, srce je preneseno u Langedorff-ov aparat. Kateterski balončić je ponovno uveden u lijevi ventrikul i ponovno je napuhan do istog volumena kao tijekom preishemičnog perioda. Srce je reperfundirano tijekom najmanje 2 sata na 37 °C. Reperfuzijski tlak podešen je na 50 cm H₂O tijekom 15 min ponovnog protoka i zatim natrag na 100 cm H₂O tijekom slijedeća 2 sata. Srčani ritam (320 udaraca po minuti) je ponovno uspostavljen. Izovolumetrijska mjerenja kontraktilnih indeksa i dijastoličkog tlaka provedena su u triplicatu 25, 45, 60 i 120 minuta nakon reperfuzije. U tom trenutku konstruirane su krivulje tlaka i volumena, te je skupljan koronarni efluent tijekom 45 minuta reperfuzije da bi se izmjerilo curenje kreatin-kinaze. Dvije grupe tretiranja uspoređene su t-testom, te su, pomoću linearne regresije, konstruirane krivulje popuštanja krajnjeg dijastoličkog tlaka. Kako je prikazano na slici 2, nakon tretiranja eritropoetinom dolazi do značajnog povećanja lijevog ventrikularnog tlaka, kao i do poboljšane krivulje tlak-volumen, smanjenja lijevog dijastoličkog ventrikularnog tlaka i smanjenja curenja kreatin-kinaze.

Primjer 3

ERITROPOETIN ŠTITI MIOKARD OD ISHEMIČNOG OŠTEĆENJA

Odrasli mužjaci štakora, kojima je prethodno dan rekombinantni humani eritropoetin (5000 U/kg tjelesne težine), anestetizirani su i pripremljeni za zatvaranje koronarne arterije. Dodatna doza eritropoetina dana je na početku postupka, te je lijeva glavna koronarna arterija zatvorena kroz 30 minuta i zatim oslobođena. Ista doza eritropoetina davana je dnevno tijekom jednog tjedna nakon tretmana. Životinjama je zatim proučena srčana funkcija. Kako prikazuje slika 3, životinje koje su primile lažnu injekciju (fiziološku otopinu) pokazuju veliki porast krajnjeg lijevog dijastoličkog tlaka, što je indicacija proširenog, krutog srca, sekundarno nakon infarkta miokarda. Suprotno tome, životinje koje su primile eritropoetin nisu trpjele od opadanja srčane funkcije, u usporedbi s lažno operiranim kontrolama (razlika značajna na razini $p < 0,01$).

Primjer 4

MOLEKULE ERITROPOETINA

Nativni eritropoetin može se modificirati da svoje aktivnosti usmjerava prema određenom tkivu ili tkivima. Moguće je provesti nekoliko neograničavajućih strategija da bi se postigla ova željena tkivna specifičnost, što uključuje modifikacije koje uklanjaju ili modificiraju glikozilacijske jedinice, od kojih eritropoetin ima tri N-vezane i jednu O-vezanu. Takve varijante glikoziliranog eritropoetina mogu se proizvesti na različite načine. Na primjer, sijalne kiseline koje završavaju krajeve šećernih lanaca mogu se ukloniti specifičnim sijalidazama ovisno o kemijskoj vezi koja povezuje sijalnu kiselinu i šećerni lanac. Alternativno, glikozilirana struktura može se ukloniti na različite načine upotrebom drugih enzima koji cijepaju specifične vezane. Da bi se vrednovali ovi principi, rekombinantni humani eritropoetin desijalidiran je upotrebom sijalidaze A (Prozyme Inc.) u skladu s uputama proizvođača. Uspješna kemijska modifikacija potvrđena je elektroforezom reakcijskog produkta na SDS poliakrilamidnom gelu i bojenjem nastalih pruga koje pokazuju da kemijski modificirani eritropoetin posjeduje očekivanu molekularnu masu od ~31 kD, u usporedbi s nemodificiranim eritropoetinom koji je ~34 kD, te mjerenjem preostalih ostataka sijalne kiseline koji iznose <0,1 mol/mol eritropoetina.

U drugoj modifikaciji, gdje su promijenjeni aminokiselinski ostaci eritropoetina, modificirani su argininski ostaci pomoću fenilglioksala, u skladu s postupkom Takahashi (1977, *J. Biochem.* **81**:395-402), provedenim za različite vremenske perioda od 0,5 do 3 sata na sobnoj temperaturi. Reakcija je prekinuta dijalizom reakcijske smjese prema vodi. Upotreba takvih modificiranih oblika eritropoetina ovdje je u potpunosti obuhvaćena.

Asijaloeritropoetin i fenilglioksaleritropoetin jednako su učinkoviti kao i nativni eritropoetin za neuralne stanice *in vitro*, kako je pokazano na slikama 4-6. Testiranje *in vitro* provedeno je upotrebom embrionalnih stanica karcinoma sličnih neuronima (P19) koje ulaze u apoptozu nakon uklanjanja seruma. Dvadeset četiri sata prije uklanjanja seruma, kulturi je dodano 1-1000 ng/ml eritropoetina ili modificiranog eritropoetina. Slijedećeg dana medij je uklonjen, stanice su isprane svježim medijem koji ne sadrži serum, a medij koji sadrži testiranu tvar (bez seruma) dodan je ponovno kulturama za slijedećih 48 sati. Za određivanje broja vijabilnih stanica proveden je test redukcije tetrazolija (CellTiter 96; Promega, Inc.). Kako je prikazano na slikama 4-5, asijaloeritropoetin je jednako učinkovit kao i sam eritropoetin u sprečavanju stanične smrti. Eritropoetin modificiran fenilglioksalom testiran je upotrebom testa stanica sličnih neuronima P19 kako je gore opisano. Kako je prikazano na slici 6, ovaj kemijski modificirani eritropoetin u potpunosti zadržava svoja neuroprotektivna svojstva.

Zadržavanje neuroprotektivne aktivnosti *in vivo* potvrđeno je na modelu fokalne ishemije štakora u kojem je provedena reverzibilna lezija u području središnje cerebralne arterije, kako je ranije opisano (Brines i sur., 2000, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97:10526-31). Odraslim mužjacima Sprague-Dawley štakora dani su asijaloeritropoetin ili eritropoetin (5000 U/kg tj. težine intraperitonealno) ili nosač neposredno prije zatvaranja arterije. Dvadeset i četiri sata kasnije, životinje su žrtvovane i proučeni su njihovi mozgovi. Napravljeni su serijski rezovi i obojeni su tetrazolijevim solima da bi se identificirale žive regije mozga. Kako je prikazano na **slici 7**, asijaloeritropoetin je jednako učinkovit u neuroprotekciji 1 sat nakon ishemije kao i nativni eritropoetin. **Slika 8** prikazuje rezultate drugog modela fokalne ishemije u kojem je provedena komparativna studija doza-odgovor s eritropoetinom i asijaloeritropoetinom. Pri najnižoj dozi od 250 U/kg, asijaloeritropoetin je omogućio zaštitu, dok nemodificirani eritropoetin to nije mogao.

Primjer 5

MODIFIKACIJA PRIMARNE STRUKTURE ERITROPOETINA I UČINKOVITOST NA ZAŠTITU NEURONA

Opisano je više mutiranih molekula eritropoetina koje ne vežu eritrocitni eritropoetinski receptor i time ne potiču eritropoezu *in vivo* ili *in vitro*. Neke od tih molekula će ipak oponašati djelovanje samog eritropoetina u drugih tkivima ili organima. Na primjer, 17-mer koji sadrži aminokiselinski slijed 31-47 nativnog eritropoetina inaktivan je za eritropoezu, ali potpuno aktivan za neuralne stanice *in vitro* (Campana & O'Brien, 1998: *Int. J. Mol. Med.* 1:235-41).

Derivati eritropoetina poželjni za ovdje opisane upotrebe mogu se proizvesti gvanidacijom, amidinacijom, trinitrofenilacijom, acetilacijom, suksinilacijom, nitracijom ili modifikacijom argininskih ostataka ili karboksilnih grupa, između ostalih, ranije spomenutih postupaka, da bi nastao eritropoetin koji zadržava aktivnost za specifične organe ili tkiva, ali ne i za druga, kao što su eritrociti. Kad se eritropoetin podvrgava takvim reakcijama, utvrđeno je da nastala molekula općenito gubi eritropoetsku aktivnost *in vivo* i *in vitro* (npr. Satake i sur., 1990, *Biochim. Biophys. Acta* 1038:125-9). Neki primjeri priprema modificiranih eritropoetina opisani su u nastavku.

Biotinilacija slobodnih amino-grupa eritropoetina. 0,2 mg D-biotinoil-ε-aminokaproatna kiselina-N-hidroksisukcinimidnog estera (Boehringer Mannheim #1418165) otopljeno je u 100 μl DMSO. Ova otopina kombinirana je s 400 μl PBS koja sadrži približno 0,2 mg eritropoetina u tubi pokrivenoj folijom. Nakon inkubacije od 4 sata na sobnoj temperaturi, nereagirani biotin odvojen je gel-filtracijom na Centricon 10 koloni. Kako je prikazano na **slici 10**, ovaj biotinilirani eritropoetin štiti P19 stanice nakon uklanjanja seruma.

U «Biotinylated recombinant human erythropoietins: Bioactivity and Utility as a receptor ligand», autora Wojchowski i sur., *Blood*, 1989, 74(3):952-8, autori koriste tri različita postupka za biotiniliranje eritropoetina. Biotin se dodaje na (1) jedinice sijalne kiseline, (2) karboksilatne grupe i (3) amino-grupe. Autori koriste test proliferacije stanica slezene miša da bi pokazali da (1) dodavanje biotina jedinicama sijalne kiseline ne inaktivira biološku aktivnost eritropoetina, (2) dodavanje biotina karboksilatnim grupama dovodi do značajne biološke inaktivacije eritropoetina i (3) dodavanje biotina amino-grupama dovodi do potpune biološke inaktivacije eritropoetina. Ovi postupci i modifikacije ovdje su u potpunosti uključeni. **Slika 9** prikazuje aktivnost biotiniliranog eritropoetina i asijaloeritropoetina u testu izgladnjivanja serumom P19 stanica.

Jodinacija eritropoetina. Postupak 1 – Iodo Beads. Jedan «Iodo Bead» (Pierce, Rockford, IL) inkubiran je u 100 μl PBS (20 mM natrijevog fosfata, 0,15 M NaCl, pH 7,5) koji sadrži 1 mCi slobodnog Na¹²⁵I tijekom 5 minuta. 100 μg eritropoetina u 100 μl PBS dodano je u smjesu. Nakon deset minuta inkubacije na sobnoj temperaturi, reakcija je zaustavljena uklanjanjem 200 μl otopine iz reakcijske posude (ostavljajući iodo bead). Višak joda uklonjen je gel-filtracijom na Centricon 10 koloni. Kako je prikazano na **slici 11**, tako proizveden jodo-eritropoetin učinkovit je u zaštiti P19 stanica nakon uklanjanja seruma.

Postupak 2 – Kloramin T. 100 μg eritropoetina u 100 μl PBS dodano je u 500 μCi Na¹²⁵I i pomiješano u eppendorf-epruveti. Potom je dodano 25 μl kloramina T (2 mg/ml) i smjesa je inkubirana tijekom 1 minute na sobnoj temperaturi. Zatim je dodano 50 μl pufera za zaustavljanje kloramina T (2,4 mg/ml natrijevog metabisulfita, 10 mg/ml tirozina, 10 % glicerola, 0,1 % ksilena u PBS). Jodotirozin i jodimirani eritropoetin zatim su uklonjeni gel-filtracijom na Centricon 10 koloni.

Modifikacije lizina: Karbamilacija: eritropoetin (100 μg) je modificiran kalijevim cijanatom kako je opisano u Plapp i sur. («Activity of bovine pancreatic deoxyribonuclease A with modified amino groups» 1971, *J. Biol. Chem.* 246, 839-845).

Trinitrofenilacija: eritropoetin (100 μg) je modificiran 2,4,6-trinitrobenzensulfonatom kako je opisano u Plapp i sur. («Activity of bovine pancreatic deoxyribonuclease A with modified amino groups» 1971, *J. Biol. Chem.* 246, 839-845).

Acetilacija: eritropoetin (100 µg) je inkubiran u 0,3 M fosfatnom puferu (pH 7,2) koji sadrži jednaku količinu acetatnog anhidrida pri 0 °C tijekom 1 sata. Reakcija je zaustavljena dijalizom prema destiliranoj vodi.

Sukcnilacija: eritropoetin (100 µg) u 0,5 M NaHCO₃ (pH 8,0) je inkubiran uz 15 molarni suvišak sukcinatnog anhidrida na 15 °C tijekom 1 sata. Reakcija je zaustavljena dijalizom prema destiliranoj vodi.

Modifikacije arginina: eritropoetin je modificiran 2,3-butanedionom kako je opisano kod Riordana («Functional arginyl residues in carboxypeptidase A. Modification with butanedione» Riordan JF, Biochemistry 1973, 12(20):3915-3923).

Eritropoetin je modificiran cikloheksanonom kao u Patthy i sur. («Identification of functional arginine residues in ribonuclease A and lysozyme» Patthy, L, Smith EL, J. Biol. Chem. 1975, 250(2):565-9).

Eritropoetin je modificiran fenilglioksalom kako je opisano u Werber i sur. («Proceedings: Carboxypeptidase B: modification of functional arginyl residues» Werber, MM, Sokolovsky M. Isr. J. Med. Sci. 1975, 11(11):1169-70).

Modifikacije tirozina: eritropoetin (100 µg) je inkubiran s tetranitrometanom kako je ranije opisano u Nestler i sur. «Stimulation of rat ovarian cell steroidogenesis by high density lipoproteins modified with tetranitromethane» Nestler JE, Chacko GK, Strauss JF 3rd J. Biol. Chem. 1985 Jun 25; 260(12):7316-21).

Modifikacije glutamata (i aspartata): s ciljem da se modificiraju karboksilne grupe, eritropoetin (100 µg) je inkubiran s 0,02 M EDC u 1M glicinamidu pri pH 4,5 pri sobnoj temperaturi tijekom 60 minuta kako je opisano u Carraway i sur. «Carboxyl group modification in chymotrypsin and chymotrypsinogen». Carraway KL, Spoerl P, Koshland DE Jr. J. Mol. Biol. 1969 May 28; 42(1):133-7.

Modifikacije triptofanskih ostataka: eritropoetin (100 µg) je inkubiran s 20 µM n-bromosukcinimida u 20 mM kalij-fosfatnom puferu (pH 6,5) pri sobnoj temperaturi kako je opisano u Ali i sur., J. Biol. Chem. 1995 Mar 3; 270(9):4570-4. Broj oksidiranih triptofanskih ostataka određen je postupkom opisanom u radu Korotchkine (Korotchkina, LG i sur. Protein Expr. Purif. 1995 Feb; 6(1):79-90).

Uklanjanje amino-grupa: s ciljem da se uklone amino-grupe, eritropoetin (100 µg) je inkubiran u PBS (pH 7,4) koji sadrži 20 mM ninhidrina (Pierce Chemical, Rockford, IL), pri 37 °C tijekom dva sata kao u Kokkini i sur. (Kokkini, G i sur. «Modification of hemoglobin by ninhydrin» Blood, Vol. 556, No 4 1980:701-705). Redukcija nastalog aldehida postiže se reagiranjem produkta s natrijevim borohidridom ili litij-aluminij-hidridom. Specifično, eritropoetin (100 µg) je inkubiran s 0,1 M natrijevim borohidridom u PBS tijekom 30 minuta na sobnoj temperaturi. Redukcija je završena hlađenjem uzoraka na ledu tijekom 10 minuta i dijaliziranjem prema PBS, tripot preko noći. (Kokkini, G., Blood, Vol. 556 No. 4 1980:701-705). Redukcija upotrebom litij-aluminij-hidrida postiže se inkubiranjem eritropoetina (100 µg) s 0,1 M litij-aluminij-hidrida u PBS tijekom 30 minuta na sobnoj temperaturi. Redukcija je završena hlađenjem uzoraka na ledu tijekom 10 minuta i dijaliziranjem prema PBS, tripot preko noći.

Redukcija disulfida i stabilizacija: eritropoetin (100 µg) je inkubiran s 500 mM DTT tijekom 15 minuta na 60 °C. Zatim je u smjesu dodan 20 mM jodoacetamid i inkubirano je tijekom 25 minuta pri sobnoj temperaturi u mraku.

Ograničena proteoliza: eritropoetin se može podvrgnuti ograničenoj kemijskoj proteolizi koja cilja na specifične ostatke. Eritropoetin reagira s 2-(2-nitrofenilsulfenil)-3-metil-3'-bromoindoleninom koji cijepa specifično nakon triptofanskih ostataka, u 50 puta suvišku u 50 % octenoj kiselini tijekom 48 sati u mraku, na sobnoj temperaturi u tubama zatvorenim pod tlakom dušika. Reakcija je završena gušenjem s triptofanom i odsoljavanjem.

Primjer 6

ZAŠTITA OD RETINALNE ISHEMIJE PERIFERNIM DAVANJEM ERITROPOETINA

Retinalne stanice vrlo su osjetljive na ishemiju, tako da ih većina umire nakon 30 minuta ishemičnog stresa. Nadalje, subakutna ili kronična ishemija dovodi do propadanja vida, što prati mnoge ljudske bolesti, kao što su diabetes mellitus, glaukom i makularna degeneracija. Trenutno nema učinkovite terapije za zaštitu stanica od ishemije. Između krvi i mrežnice postoji čvrsta barijera endotelnih stanica koja sprečava prolaz većine velikih molekula. Da bi se provjerilo može li periferno dodani eritropoetin zaštititi stanice osjetljive na ishemiju, korišten je štakorski model akutnog reverzibilnog glaukoma, kako je opisano u Rosenbaum i sur. (1997; Vis. Res. 37:3443-51). Specifično, fiziološka otopina injicirana je u prednju očnu sobicu odraslog mužjaka štakora do tlaka većeg od sistemskog arterijskog tlaka i zadržana je kroz 60 minuta. Životinjama je dana fiziološka otopina ili 5000 U eritropoetina/kg tjelesne težine intraperitonealno 24 sata prije indukcije ishemije, te je produljeno kao dnevna doza slijedeća 3 dana. Na štakorima prilagođenima na mrak provedena je elektroretinografija 1 tjedan nakon tretmana. **Slike 11-12** prikazuju da je davanje eritropoetina povezano s dobrim očuvanjem elektroretinograma (ERG) (slika D), suprotno životinjama tretiranim samo

s fiziološkom otopinom (slika C), kod kojih je funkcija slabo očuvana. **Slika 11** uspoređuje amplitude a- i b-valova elektrolitograma za grupe tretirane eritropoetinom i fiziološkom otopinom, i pokazuje značajnu zaštitu koju omogućuje eritropoetin.

5 **Primjer 7**

OBNAVLJAJUĆI UČINCI ERITROPOETINA NA SMANJENU KOGNITIVNU FUNKCIJU KAO POSLJEDICU OZLJEDE MOZGA

Da bi se pokazala sposobnost eritropoetina da obnovi smanjenu kognitivnu funkciju miševa nakon traume mozga, ženke Balb/c miševa podvrgnute su tupoj traumi mozga kako je opisano u Brines i sur., PNAS 2000, 97; 10295-10672, te je pet dana kasnije započeto s dnevnim davanjem eritropoetina intraperitonealno 5000 U/kg tj.t. Dvanaest dana nakon ozljede, životinjama su testirane kognitivne funkcije u Morrisovom vodenom labirintu, s četiri testa dnevno. I tretirane i netretirane životinje slabo su izvodile test (uz vrijeme plivanja oko 80 sekundi od mogućih 90), ali **slika 13** pokazuje da su životinje tretirane eritropoetinom bile bolje (u ovom testu, negativna vrijednost je bolja). Čak ako je početak tretmana eritropoetinom odgođen do 30 dana nakon traume (**slika 14**), obnavljanje kognitivne funkcije također je vidljivo.

Primjer 8

KAINATNI MODEL

20 U modelu kainatne neurotoksičnosti, davan je asijaloeritropoetin u skladu s protokolom Brines i sur., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2000, 97; 10295-10672 u dozi od 5000 U/kg tj. t. intraperitonealno 24 sata prije davanja 25 mg/kg kainata, te je pokazano da je jednako efikasno kao i eritropoetin, prema vremenu do smrti (**slika 15**).

Izum u svojem cilju nije ograničen opisanim specifičnim ostvarenjima, čija je namjera ilustracija pojedinih aspekata izuma, a funkcionalno ekvivalentni postupci i sastojci su također u sklopu izuma. Različite modifikacije izuma, uz one koje su ovdje opisane, postat će, iz prethodnih opisa i popratnih crteža, očigledne stručnjacima područja. Takve modifikacije ulaze u cilj pridodanih zahtjeva.

Sve ovdje citirane reference uključene su ovdje, u potpunosti, u sve namjene.

PATENTNI ZAHTEJEVI

1. Upotreba eritropoetina, **naznačenog time** da je izabran iz grupe koju čine:
 - eritropoetin kojem nedostaju bar jedinice sijalne kiseline;
 - eritropoetni kojem nedostaju bar N-vezani ili O-vezani ugljikohidrati;
 - eritropoetin koji ima barem smanjeni sadržaj ugljikohidrata, i to pomoću tretiranja nativnog eritropoetina bar jednom glikozidazom;
 - eritropoetin čiji ugljikohidratni dio molekule ima uzorak glikozilacije nekarakterističan za sisavce, i to pomoću ekspresije rekombinantnog eritropoetina u stanicama ne-sisavaca;
 - eritropoetin koji ima bar jedan ili više oksidiranih ugljikohidrata koji mogu također biti kemijski reducirani;
 - eritropoetin koji ima bar jedan ili više modificiranih argininskih ostataka;
 - eritropoetin koji ima bar jedan ili više modificiranih lizinskih ostataka ili modifikaciju N-terminalne amino-grupe eritropoetinske molekule;
 - eritropoetin koji ima bar jedan modificiran tirozinski ostatak;
 - eritropoetin koji ima bar jedan modificiran ostatak asparaginske ili glutaminske kiseline;
 - eritropoetin koji ima bar jedan modificiran triptofanski ostatak;
 - eritropoetin kojem je uklonjena bar jedna amino-grupa;
 - eritropoetin koji ima otvorenu bar jednu cistinsku vezu u eritropoetinskoj molekuli;
 - eritropoetin koji ima bar jednu supstituciju bar jedne aminokiseline; i
 - krnji eritropoetin;

u pripremi farmaceutskih pripravaka za zaštitu, održavanje, povećanje i obnavljanje stanica sisavaca koje reagiraju na eritropoetin i njima pridruženih stanica, tkiva i organa.

2. Upotreba zahtjeva 1, **naznačena time** da je navedeni eritropoetin asijaloeritropoetin.
3. Upotreba zahtjeva 2, **naznačena time** da je navedeni asijaloeritropoetin humani asijaloeritropoetin.
4. Upotreba zahtjeva 1, **naznačena time** da navedeni eritropoetin nema N-vezanih ugljikohidrata.
5. Upotreba zahtjeva 1, **naznačena time** da navedeni eritropoetin nema O-vezanih ugljikohidrata.
6. Upotreba zahtjeva 1, **naznačena time** da je navedeni eritropoetin tretiran bar jednom glikozidazom.
7. Upotreba zahtjeva 1, **naznačena time** da je navedeni eritropoetin eksprimiran u stanici kukca ili biljnoj stanici.
8. Upotreba zahtjeva 1, **naznačena time** da je navedeni eritropoetin oksidiran perjodatom.

9. Upotreba zahtjeva 8, **naznačena time** da je navedeni eritropoetin oksidiran perjodatom kemijski reduciran natrijevim cijanoborohidridom.
10. Upotreba zahtjeva 1, **naznačena time** da navedeni eritropoetin sadrži R-glioksalnu jedinicu na jednom ili više argininskih ostataka, pri čemu je R arilna ili alkilna jedinica.
- 5 11. Upotreba zahtjeva 10, **naznačena time** da je navedeni eritropoetin fenilglioksal-eritropoetin.
12. Upotreba zahtjeva 1, **naznačena time** da je argininski ostatak navedenog eritropoetina modificiran reakcijom s vicinalnim diketonom izabranim iz grupe koju čine 2,3-butandion i cikloheksandion.
13. Upotreba zahtjeva 1, **naznačena time** da je argininski ostatak navedenog eritropoetina reagirao s 3-deoksiglukozonom.
- 10 14. Upotreba zahtjeva 1, **naznačena time** da navedena molekula eritropoetina ima bar jedan biotinilirani lizin ili N-terminalnu amino-grupu.
15. Upotreba zahtjeva 14, **naznačena time** da je navedena molekula eritropoetina biotinilirani eritropoetin.
16. Upotreba zahtjeva 1, **naznačena time** da je navedeni eritropoetin glucitol-lizin-eritropoetin ili fruktozil-lizin-eritropoetin.
- 15 17. Upotreba zahtjeva 1, **naznačena time** da je lizinski ostatak navedenog eritropoetina karbamiliran.
18. Upotreba zahtjeva 1, **naznačena time** da je lizinski ostatak navedenog eritropoetina aciliran.
19. Upotreba zahtjeva 18, **naznačena time** da je lizinski ostatak navedenog eritropoetina acetiliran.
20. Upotreba zahtjeva 18, **naznačena time** da je lizinski ostatak navedenog eritropoetina sukciniliran.
21. Upotreba zahtjeva 1, **naznačena time** da je lizinski ostatak navedenog eritropoetina modificiran 2,3,6-trinitrobenzensulfonatnom natrijevom ili nekom drugom soli.
- 20 22. Upotreba zahtjeva 1, **naznačena time** da je tirozinski ostatak navedenog eritropoetina nitriran ili jodiniran.
23. Upotreba zahtjeva 1, **naznačena time** da su aspartatni ili glutamatni ostatak navedenog eritropoetina reagirali s karbodiimidom, nakon čega je uslijedila reakcija s aminom.
24. Upotreba zahtjeva 23, **naznačena time** da je navedeni amin glicinamid.
- 25 25. Upotreba zahtjeva 1, **naznačena time** da su stanice ili tkivo koje reagiraju na eritropoetin živčane, retinalne, mišićne, srčane, plućne, jetrene, bubrežne stanice, stanice tankog crijeva, kore ili srži nadbubrežne žlijezde, kapilarnog endotela, testisa, ovarija ili endometrija.
26. Farmaceutski pripravak, **naznačen time** da sadrži količinu eritropoetina, učinkovitu u zaštiti, održavanju, povećanju ili obnavljanju, izabranog iz grupe koju čine
 30 eritropoetin kojem nedostaju bar jedinice sijalne kiseline;
 eritropoetni kojem nedostaju bar N-vezani ili O-vezani ugljikohidrati;
 eritropoetin koji ima barem smanjeni sadržaj ugljikohidrata, i to pomoću tretiranja nativnog eritropoetina bar jednom glikozidazom;
 eritropoetin čiji ugljikohidratni dio molekule ima uzorak glikozilacije nekarakterističan za sisavce, i to pomoću
 35 ekspresije rekombinantnog eritropoetina u stanicama ne-sisavaca;
 eritropoetin koji ima bar jedan ili više oksidiranih ugljikohidrata koji mogu također biti kemijski reducirani;
 eritropoetin koji ima bar jedan ili više modificiranih argininskih ostataka;
 eritropoetin koji ima bar jedan ili više modificiranih lizinskih ostataka ili modifikaciju N-terminalne amino-grupe eritropoetinske molekule;
 40 eritropoetin koji ima bar jedan modificiran tirozinski ostatak;
 eritropoetin koji ima bar jedan modificiran ostatak asparaginske ili glutaminske kiseline;
 eritropoetin koji ima bar jedan modificiran triptofanski ostatak;
 eritropoetin kojem je uklonjena bar jedna amino-grupa;
 eritropoetin koji ima otvorenu bar jednu cistinsku vezu u eritropoetinskoj molekuli;
 45 eritropoetin koji ima bar jednu supstituciju bar jedne aminokiseline; i
 krnji eritropoetin.
27. Farmaceutski pripravak prema zahtjevu 26, **naznačen time** da je navedeni eritropoetin asijaloeritropoetin ili fenilglioksal-eritropoetin.
28. Upotreba eritropoetina u pripremi farmaceutskog pripravka za zaštitu, održavanje, povećanje ili obnavljanje
 50 funkcije ili vijabilnosti stanica koje reagiraju na eritropoetin ili njima pridruženih stanica, tkiva ili organa, **naznačena time** da navedene stanice, tkiva ili organi nisu podražljive stanice, tkiva ili organi, odnosno da ne sadrže pretežno podražljive stanice ili tkiva.
29. Upotreba zahtjeva 28, **naznačena time** da je navedeni eritropoetin nativni eritropoetin ili analog eritropoetina, njegov mimetik, fragment eritropoetina, hibridna molekula eritropoetina, molekula koja se veže za eritropoetinski
 55 receptor, agonist eritropoetina, bubrežni eritropoetin, moždani eritropoetin, njihov oligomer, multimer, mutein, srodnik, prirodni oblik, sintetski oblik, rekombinantni oblik, glikozilacijska varijanta, deglikozilirana varijanta ili kombinacija.
30. Upotreba zahtjeva 28, **naznačena time** da je navedeni eritropoetin fenilglioksal-eritropoetin.
31. Postupak za zaštitu, održavanje ili povećanje vijabilnosti stanice, tkiva ili organa izoliranog iz tijela sisavca, **naznačen time** da obuhvaća izlaganje navedene stanice, tkiva ili organa farmaceutskom pripravku koji sadrži
 60 eritropoetin.

32. Postupak prema zahtjevu 31, **naznačen time** da je navedeni eritropoetin nativni eritropoetin ili analog eritropoetina, njegov mimetik, fragment eritropoetina, hibridna molekula eritropoetina, molekula koja se veže za eritropoetinski receptor, agonist eritropoetina, bubrežni eritropoetin, moždani eritropoetin, njihov oligomer, multimer, mutein, srodnik, prirodni oblik, sintetski oblik, rekombinantni oblik, glikozilacijska varijanta, deglikozilirana varijanta ili kombinacija.
33. Postupak prema zahtjevu 31, **naznačen time** da je navedeni eritropoetin eritropoetin kojem nedostaju bar jedinice sijalne kiseline; eritropoetni kojem nedostaju bar N-vezani ili O-vezani ugljikohidrati; eritropoetin koji ima barem smanjeni sadržaj ugljikohidrata, i to pomoću tretiranja nativnog eritropoetina bar jednom glikozidazom; eritropoetin čiji ugljikohidratni dio molekule ima uzorak glikozilacije nekarakterističan za sisavce, i to pomoću ekspresije rekombinantnog eritropoetina u stanicama ne-sisavaca; eritropoetin koji ima bar jedan ili više oksidiranih ugljikohidrata koji mogu također biti kemijski reducirani; eritropoetin koji ima bar jedan ili više modificiranih argininskih ostataka; eritropoetin koji ima bar jedan ili više modificiranih lizinskih ostataka ili modifikaciju N-terminalne amino-grupe eritropoetinske molekule; eritropoetin koji ima bar jedan modificiran tirozinski ostatak; eritropoetin koji ima bar jedan modificiran ostatak asparaginske ili glutaminske kiseline; eritropoetin koji ima bar jedan modificiran triptofanski ostatak; eritropoetin kojem je uklonjena bar jedna amino-grupa; eritropoetin koji ima otvorenu bar jednu cistinsku vezu u eritropoetinskoj molekuli; eritropoetin koji ima bar jednu supstituciju bar jedne aminokiseline; i krnji eritropoetin.
34. Postupak prema zahtjevu 31, **naznačen time** da je navedeni eritropoetin humani eritropoetin.
35. Postupak prema zahtjevu 31, **naznačen time** da je navedeni eritropoetin fenilgliksal-eritropoetin.
36. Upotreba eritropoetina izabranog iz grupe koju čine nativni eritropoetin ili analog eritropoetina, njegov mimetik, fragment eritropoetina, hibridna molekula eritropoetina, molekula koja se veže za eritropoetinski receptor, agonist eritropoetina, bubrežni eritropoetin, moždani eritropoetin, njihov oligomer, multimer, mutein, srodnik, prirodni oblik, sintetski oblik, rekombinantni oblik, glikozilacijska varijanta, deglikozilirana varijanta ili kombinacija, **naznačena time** da se koristi u pripremi farmaceutskog pripravka za obnavljanje kognitivne disfunkcije u sisavca.
37. Upotreba zahtjeva 36, **naznačena time** da je kognitivna disfunkcija posljedica ozljede uzrokovane napadajem, multiplom sklerozom, moždanim udarom, hipotenzijom, srčanim arrestom, ishemijom, infarktom miokarda, upalom, gubitkom kognitivne funkcije vezanim uz dob, radijacijskim oštećenjem, cerebralnom paralizom, neurodegenerativnom bolesti, Alzheimerovom bolesti, Parkinsonovom bolesti, Leighovom bolesti, demencijom izazvanom AIDS-om, gubitkom memorije, amiotrofnom lateralnom sklerozom, alkoholizmom, bolesti raspoloženja, anksioznim poremećajem, poremećajem pažnje, autizmom, Creutzfeld-Jakobovom bolesti, traumom ili ishemijom mozga ili ledne moždine, srčano-plućnom prenosnicom, kroničnom srčanom bolesti, makularnom degeneracijom, dijabetičkom neuropatijom, dijabetičkom retinopatijom, glaukomom, retinalnom ishemijom ili traumom retine.
38. Upotreba zahtjeva 36, **naznačena time** da je navedeni eritropoetin fenilgliksal-eritropoetin.
39. Upotreba zahtjeva 36, **naznačena time** da je navedeni eritropoetin eritropoetin kojem nedostaju bar jedinice sijalne kiseline; eritropoetni kojem nedostaju bar N-vezani ili O-vezani ugljikohidrati; eritropoetin koji ima barem smanjeni sadržaj ugljikohidrata, i to pomoću tretiranja nativnog eritropoetina bar jednom glikozidazom; eritropoetin čiji ugljikohidratni dio molekule ima uzorak glikozilacije nekarakterističan za sisavce, i to pomoću ekspresije rekombinantnog eritropoetina u stanicama ne-sisavaca; eritropoetin koji ima bar jedan ili više oksidiranih ugljikohidrata koji mogu također biti kemijski reducirani; eritropoetin koji ima bar jedan ili više modificiranih argininskih ostataka; eritropoetin koji ima bar jedan ili više modificiranih lizinskih ostataka ili modifikaciju N-terminalne amino-grupe eritropoetinske molekule; eritropoetin koji ima bar jedan modificiran tirozinski ostatak; eritropoetin koji ima bar jedan modificiran ostatak asparaginske ili glutaminske kiseline; eritropoetin koji ima bar jedan modificiran triptofanski ostatak; eritropoetin kojem je uklonjena bar jedna amino-grupa; eritropoetin koji ima otvorenu bar jednu cistinsku vezu u eritropoetinskoj molekuli; eritropoetin koji ima bar jednu supstituciju bar jedne aminokiseline; i krnji eritropoetin.
40. Postupak za olakšanje transcitoze molekule kroz barijeru endotelnih stanica u sisavcu, **naznačen time** da obuhvaća davanje pripravka koji sadrži navedenu molekulu u kombinaciji s eritropoetinom izabranim iz grupe koju čine eritropoetin kojem nedostaju bar jedinice sijalne kiseline; eritropoetni kojem nedostaju bar N-vezani ili O-vezani ugljikohidrati;

eritropoetin koji ima barem smanjeni sadržaj ugljikohidrata, i to pomoću tretiranja nativnog eritropoetina bar jednom glikozidazom;

eritropoetin čiji ugljikohidratni dio molekule ima uzorak glikozilacije nekarakterističan za sisavce, i to pomoću ekspresije rekombinantnog eritropoetina u stanicama ne-sisavaca;

eritropoetin koji ima bar jedan ili više oksidiranih ugljikohidrata koji mogu također biti kemijski reducirani;

eritropoetin koji ima bar jedan ili više modificiranih argininskih ostataka;

eritropoetin koji ima bar jedan ili više modificiranih lizinskih ostataka ili modifikaciju N-terminalne amino-grupe eritropoetinske molekule;

eritropoetin koji ima bar jedan modificiran tirozinski ostatak;

eritropoetin koji ima bar jedan modificiran ostatak asparaginske ili glutaminske kiseline;

eritropoetin koji ima bar jedan modificiran triptofanski ostatak;

eritropoetin kojem je uklonjena bar jedna amino-grupa;

eritropoetin koji ima otvorenu bar jednu cistinsku vezu u eritropoetinskoj molekuli;

eritropoetin koji ima bar jednu supstituciju bar jedne aminokiseline; i

krnji eritropoetin.

41. Postupak prema zahtjevu 40, **naznačen time** da je navedena kombinacija labilna kovalentna veza, stabilna kovalentna veza ili ne-kovalentna kombinacija s veznim mjestom za navedenu molekulu.

42. Postupak prema zahtjevu 40, **naznačen time** da je navedena barijera endotelne stanice izabrana iz grupe koju čine krvno-moždana barijera, krvno-očna barijera, barijera krvi i testisa, barijera krvi i jajnika te krvno-placentalna barijera.

43. Postupak prema zahtjevu 40, **naznačen time** da je navedena molekula agonist receptora ili antagonist hormona, neurotrofni faktor, antimikrobno sredstvo, radiofarmaceutik, *antisense* oligonukleotid, antitijelo, imunosupresiv ili lijek protiv raka.

44. Pripravak za prijenos molekule putem transcitoze kroz barijeru endotelne stanice, **naznačen time** da sadrži navedenu molekulu u kombinaciji s eritropoetinom izabranim iz grupe koju čine

eritropoetin kojem nedostaju bar jedinice sijalne kiseline;

eritropoetini kojem nedostaju bar N-vezani ili O-vezani ugljikohidrati;

eritropoetin koji ima barem smanjeni sadržaj ugljikohidrata, i to pomoću tretiranja nativnog eritropoetina bar jednom glikozidazom;

eritropoetin čiji ugljikohidratni dio molekule ima uzorak glikozilacije nekarakterističan za sisavce, i to pomoću ekspresije rekombinantnog eritropoetina u stanicama ne-sisavaca;

eritropoetin koji ima bar jedan ili više oksidiranih ugljikohidrata koji mogu također biti kemijski reducirani;

eritropoetin koji ima bar jedan ili više modificiranih argininskih ostataka;

eritropoetin koji ima bar jedan ili više modificiranih lizinskih ostataka ili modifikaciju N-terminalne amino-grupe eritropoetinske molekule;

eritropoetin koji ima bar jedan modificiran tirozinski ostatak;

eritropoetin koji ima bar jedan modificiran ostatak asparaginske ili glutaminske kiseline;

eritropoetin koji ima bar jedan modificiran triptofanski ostatak;

eritropoetin kojem je uklonjena bar jedna amino-grupa;

eritropoetin koji ima otvorenu bar jednu cistinsku vezu u eritropoetinskoj molekuli;

eritropoetin koji ima bar jednu supstituciju bar jedne aminokiseline; i

krnji eritropoetin.

45. Pripravak prema zahtjevu 44, **naznačen time** da je navedena kombinacija labilna kovalentna veza, stabilna kovalentna veza ili ne-kovalentna kombinacija s veznim mjestom za navedenu molekulu.

46. Pripravak prema zahtjevu 44, **naznačen time** da je navedena molekula agonist receptora ili antagonist hormona, neurotrofni faktor, antimikrobno sredstvo, radiofarmaceutik, *antisense* oligonukleotid, antitijelo, imunosupresiv ili lijek protiv raka.

47. Upotreba eritropoetina izabranog iz grupe koju čine

eritropoetin kojem nedostaju bar jedinice sijalne kiseline;

eritropoetini kojem nedostaju bar N-vezani ili O-vezani ugljikohidrati;

eritropoetin koji ima barem smanjeni sadržaj ugljikohidrata, i to pomoću tretiranja nativnog eritropoetina bar jednom glikozidazom;

eritropoetin čiji ugljikohidratni dio molekule ima uzorak glikozilacije nekarakterističan za sisavce, i to pomoću ekspresije rekombinantnog eritropoetina u stanicama ne-sisavaca;

eritropoetin koji ima bar jedan ili više oksidiranih ugljikohidrata koji mogu također biti kemijski reducirani;

eritropoetin koji ima bar jedan ili više modificiranih argininskih ostataka;

eritropoetin koji ima bar jedan ili više modificiranih lizinskih ostataka ili modifikaciju N-terminalne amino-grupe eritropoetinske molekule;

eritropoetin koji ima bar jedan modificiran tirozinski ostatak;

eritropoetin koji ima bar jedan modificiran ostatak asparaginske ili glutaminske kiseline;

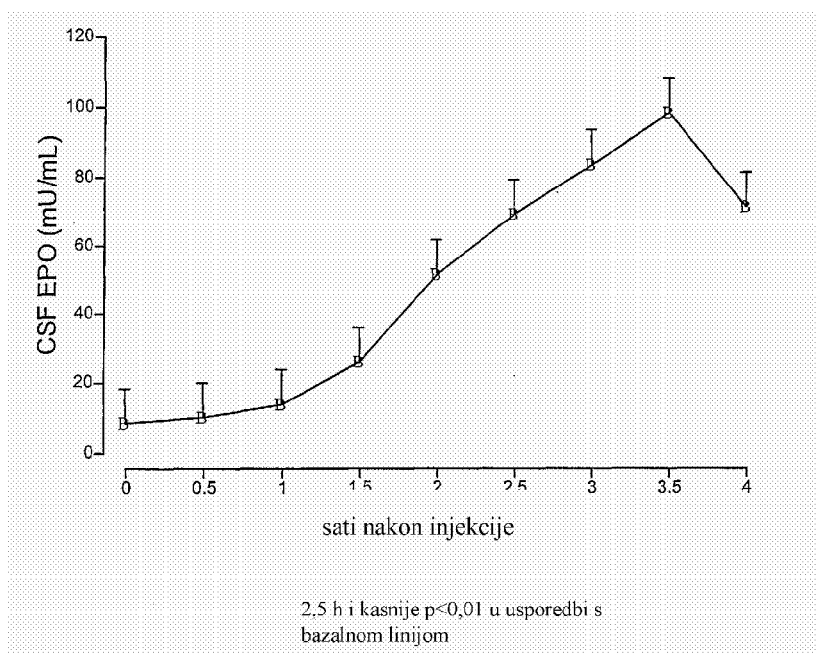
eritropoetin koji ima bar jedan modificiran triptofanski ostatak;

eritropoetin kojem je uklonjena bar jedna amino-grupa;

eritropoetin koji ima otvorenu bar jednu cistinsku vezu u eritropoetinskoj molekuli;
eritropoetin koji ima bar jednu supstituciju bar jedne aminokiseline; i
krnji eritropoetin;

- 5 u kombinaciji s molekulom, **naznačena time** da se koristi u pripremi farmaceutskog pripravka za prijenos navedene molekule putem transcitoze kroz barijeru endotelnih stanica.
48. Upotreba zahtjeva 47, **naznačena time** da je navedena kombinacija labilna kovalentna veza, stabilna kovalentna veza ili ne-kovalentna kombinacija s veznim mjestom za navedenu molekulu.
49. Upotreba zahtjeva 47, **naznačena time** da je navedena molekula agonist receptora ili antagonist hormona, neurotrofni faktor, antimikrobno sredstvo, radiofarmaceutik, *antisense* oligonukleotid, antitijelo, imunosupresiv ili lijek protiv raka.
50. Pripravak, **naznačen time** da sadrži eritropoetin oksidiran perjodatom.
51. Pripravak, **naznačen time** da sadrži glucitol-lizin-eritropoetin.
52. Pripravak, **naznačen time** da sadrži fruktozil-lizin-eritropoetin.
53. Pripravak, **naznačen time** da sadrži 3-deoksiglukozon-eritropoetin.
54. Pripravak, **naznačen time** da sadrži karbamilirani asijaloeritropoetin.
55. Pripravak, **naznačen time** da sadrži biotinilirani asijaloeritropoetin.
56. Pripravak, **naznačen time** da sadrži sukcinilirani asijaloeritropoetin.
57. Pripravak, **naznačen time** da sadrži acetilirani asijaloeritropoetin.

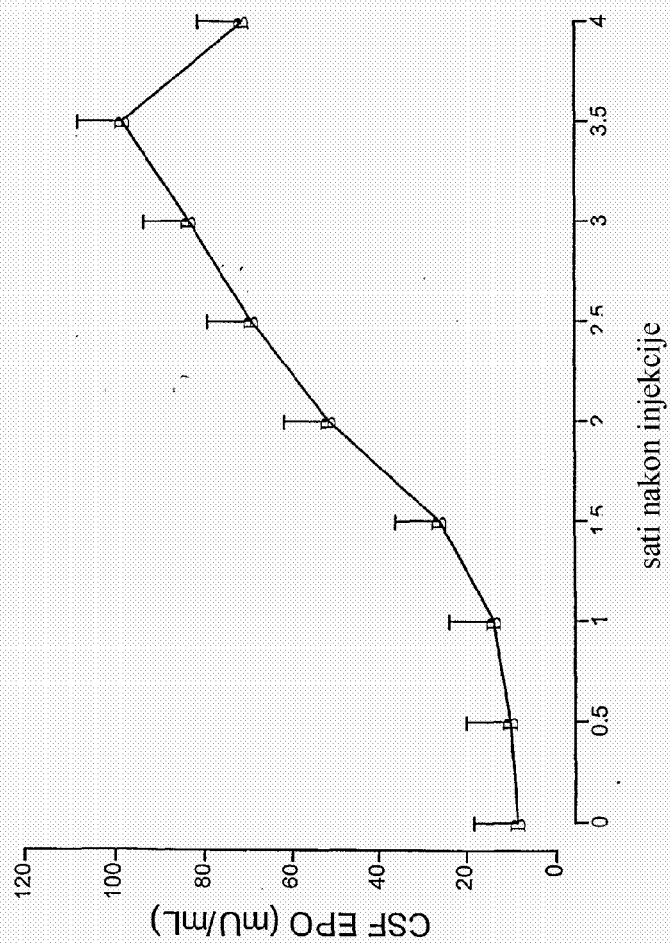
SAŽETAK



Dani su postupci i pripravci za zaštitu ili povećanje stanica koje reagiraju na eritropoetin, te utječu na funkciju ili vijabilnost tkiva, organa ili dijela tijela *in vivo*, *in situ* ili *ex vivo* u sisavaca, uključujući ljudska bića, sistemskim ili lokalnim davanjem modulatora aktivnosti eritropoetinskog receptora, kao što su eritropoetin ili modificirani eritropoetin.

Slika 1

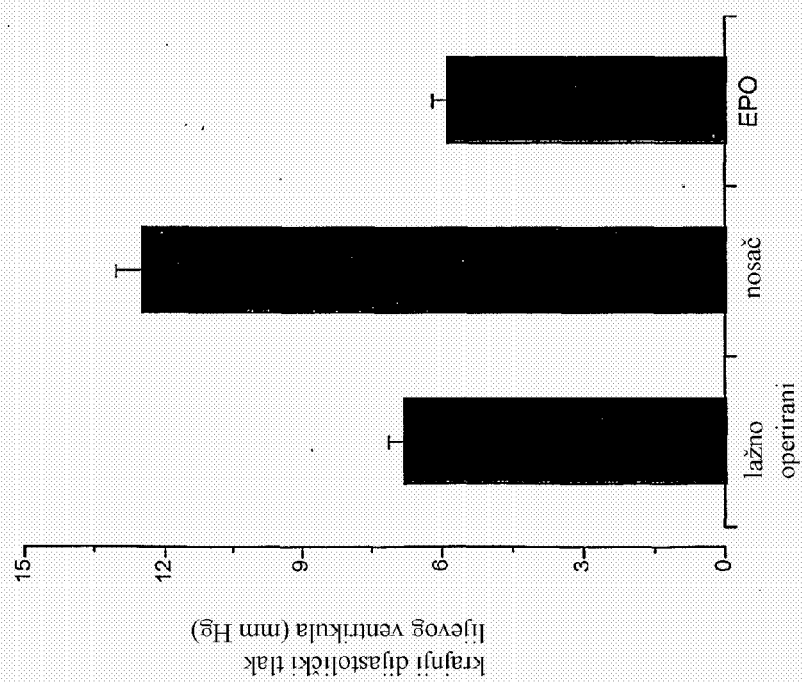
Koncentracija EPO u CSF štakora nakon parenteralnog davanja rH-EPO (5000 U/kg tj.t. I.P.)



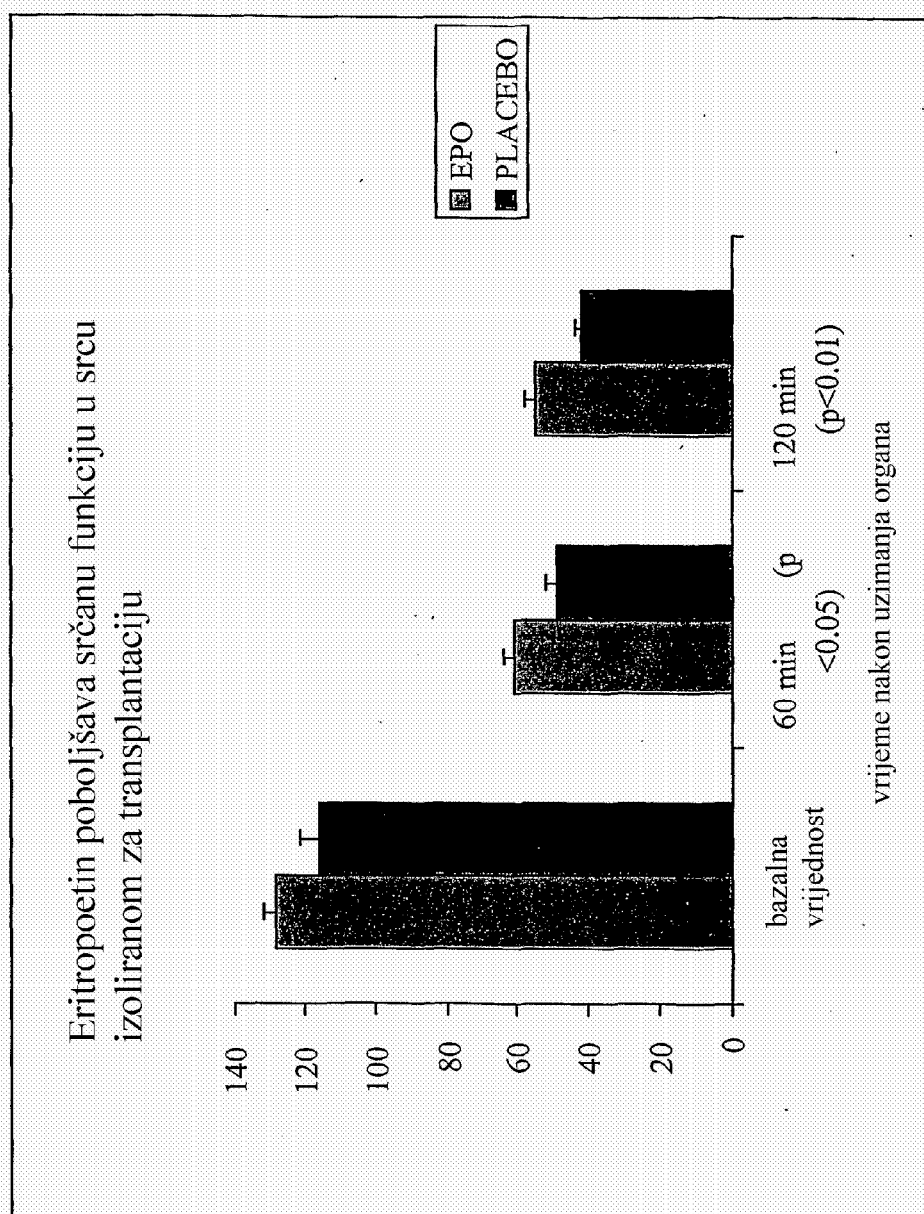
2,5 h i kasnije $p < 0,01$ u usporedbi s bazalnom linijom

Slika 2

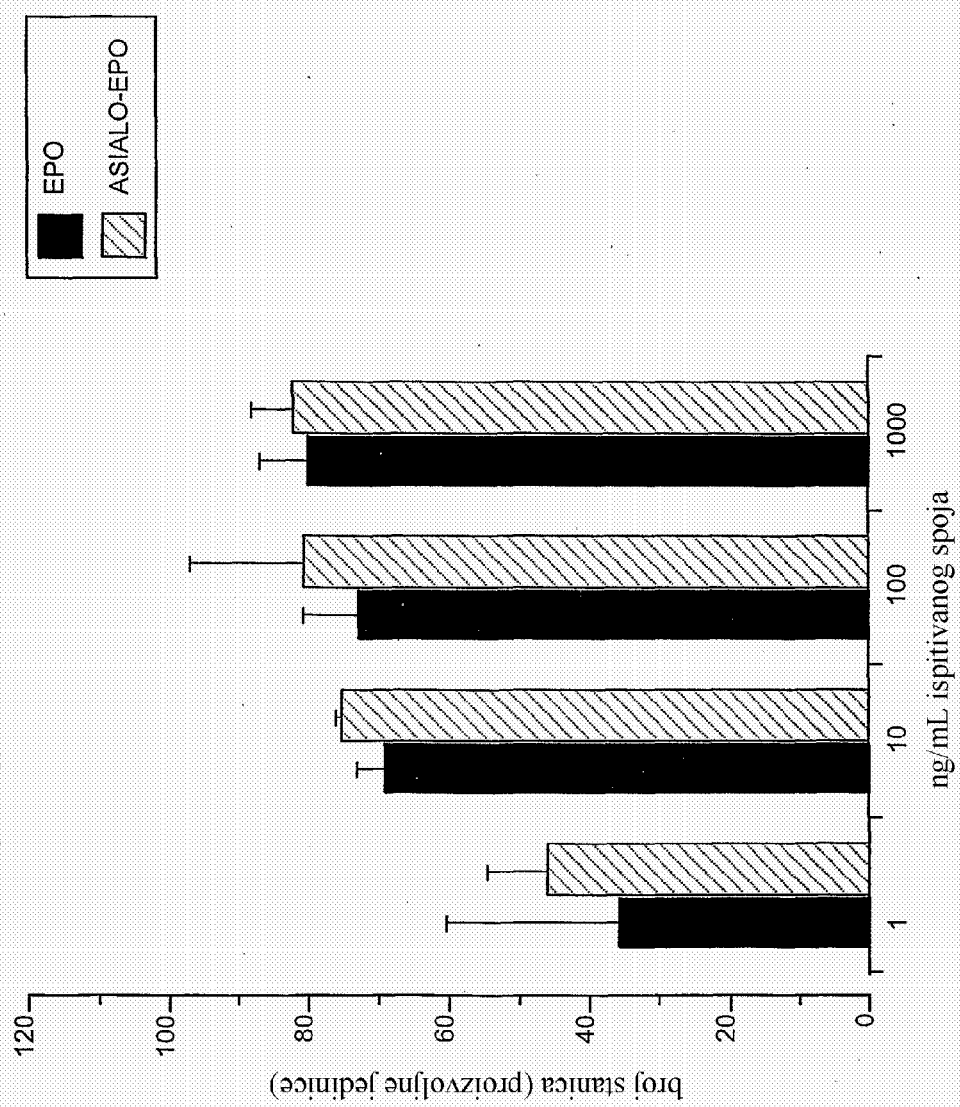
srce štakora 7 dana nakon 30-minutne ishemije



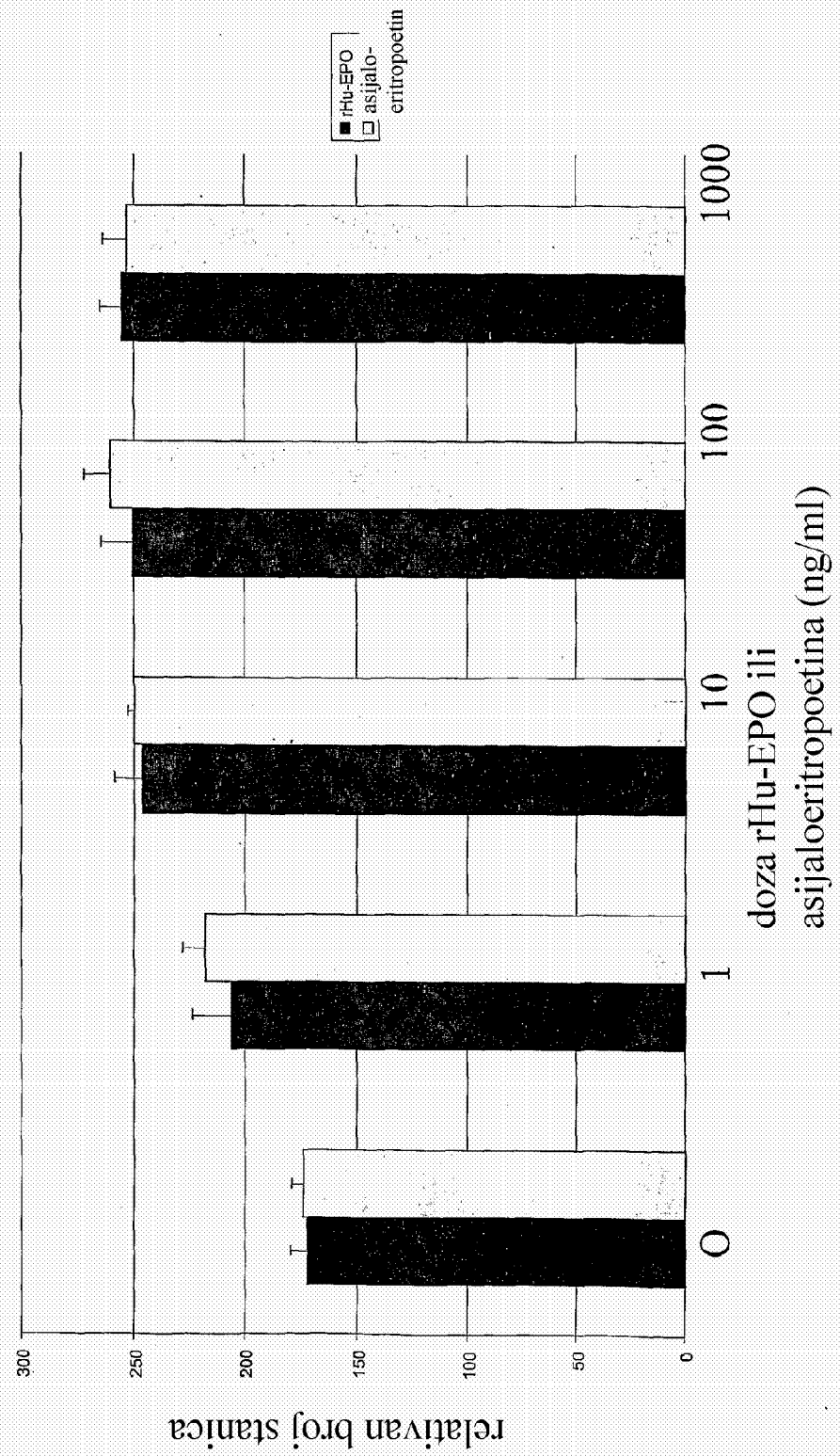
Slika 3



Slika 4

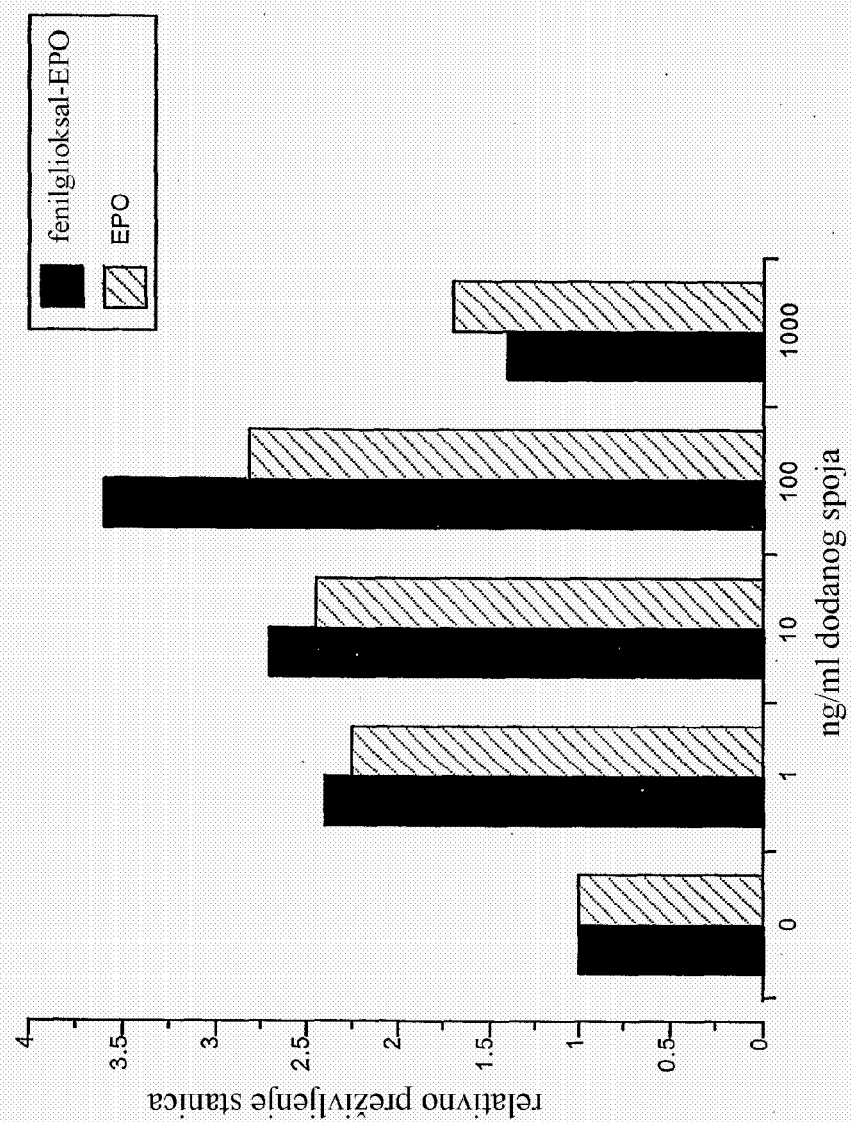


Slika 5



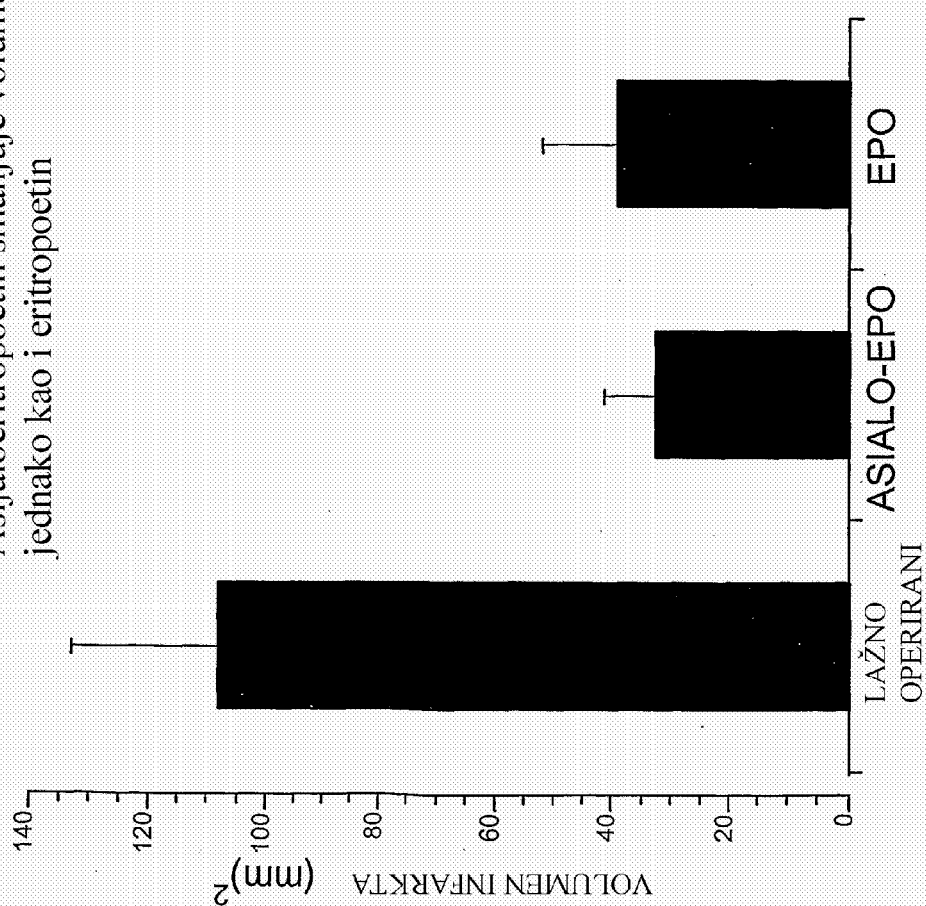
Slika 6

Preživljenje P19 stanica nakon uklanjanja seruma



Slika 7

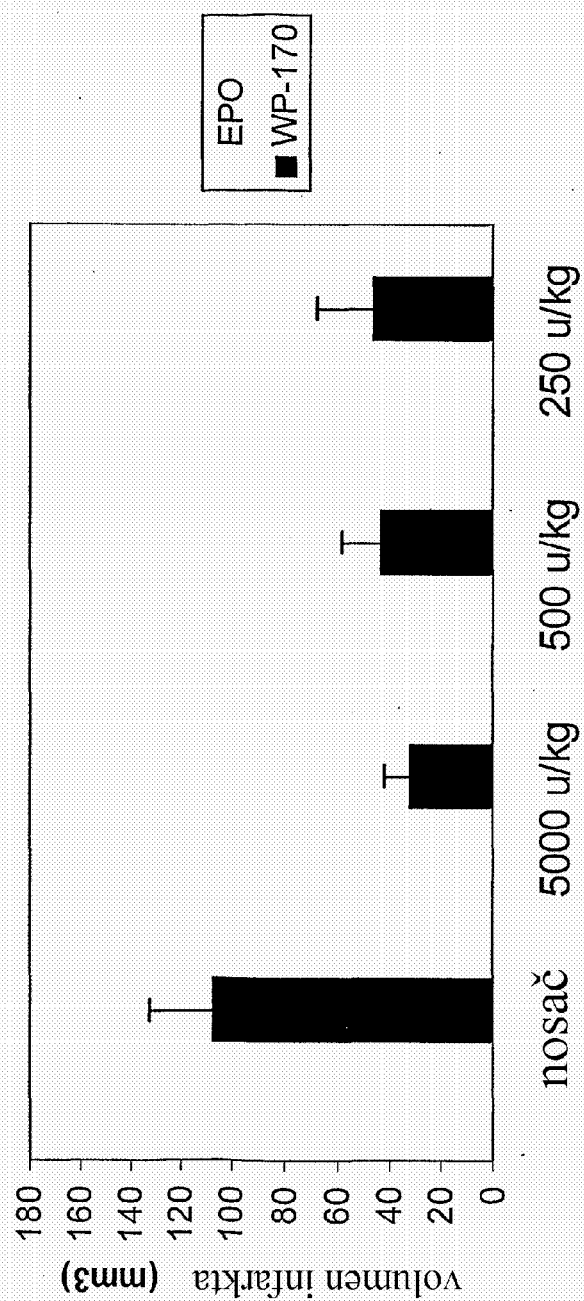
Asijaloeritropoetin smanjuje volumen infarkta
jednako kao i eritropoetin



Slika 8

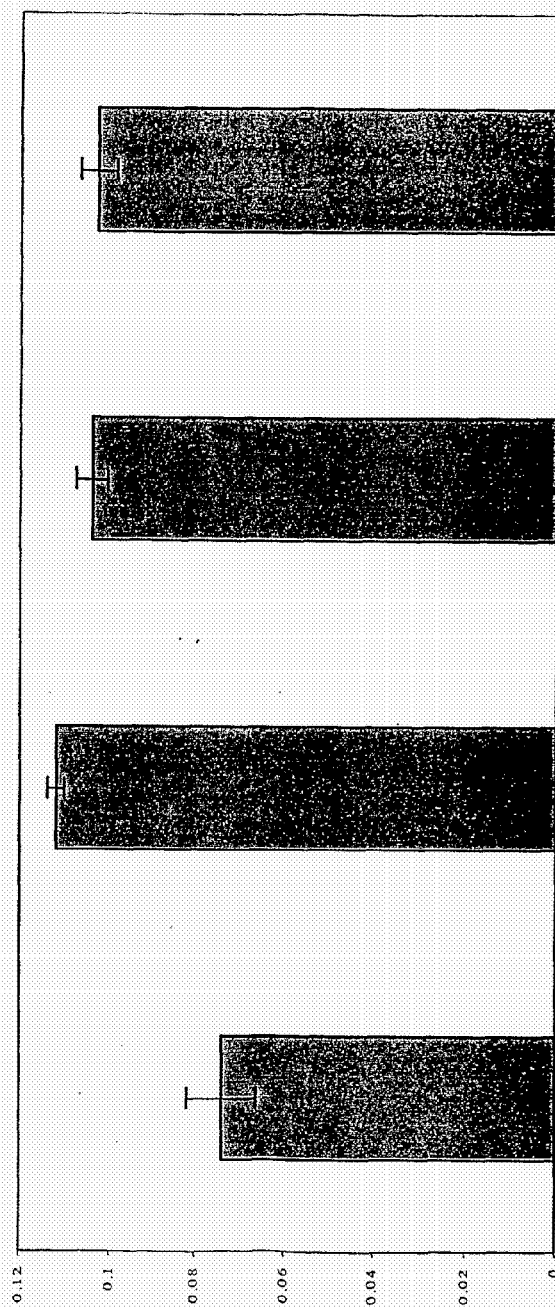
asijaloeritropoetin

(doza - odgovor)

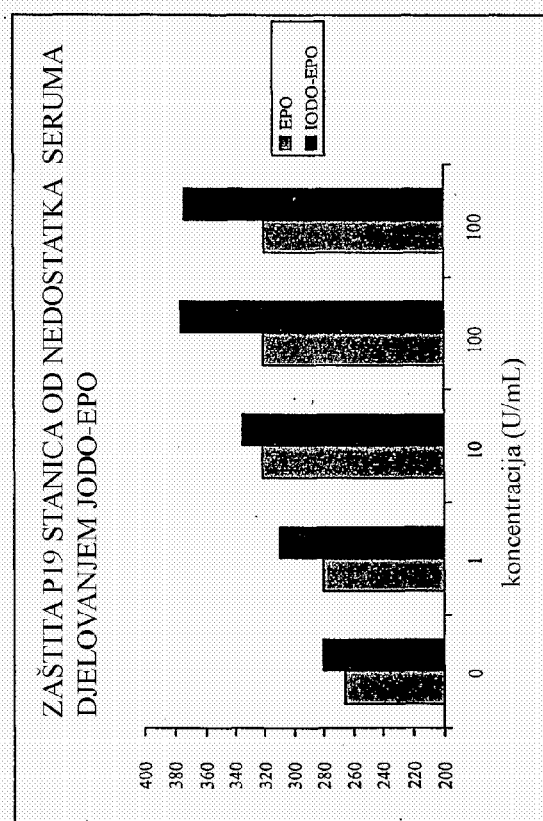


za svaku grupu, n je veći
ili jednak 4

Slika 9
Biotinilirani EPO i asijalo-EPO zadržavaju
aktivnost u testu P19 stanica

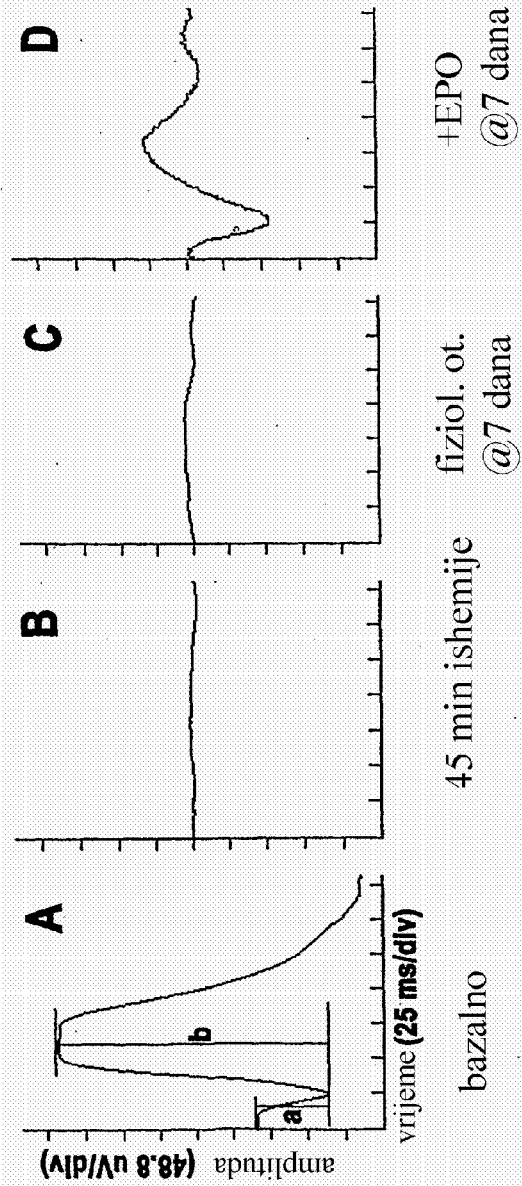


Slika 10



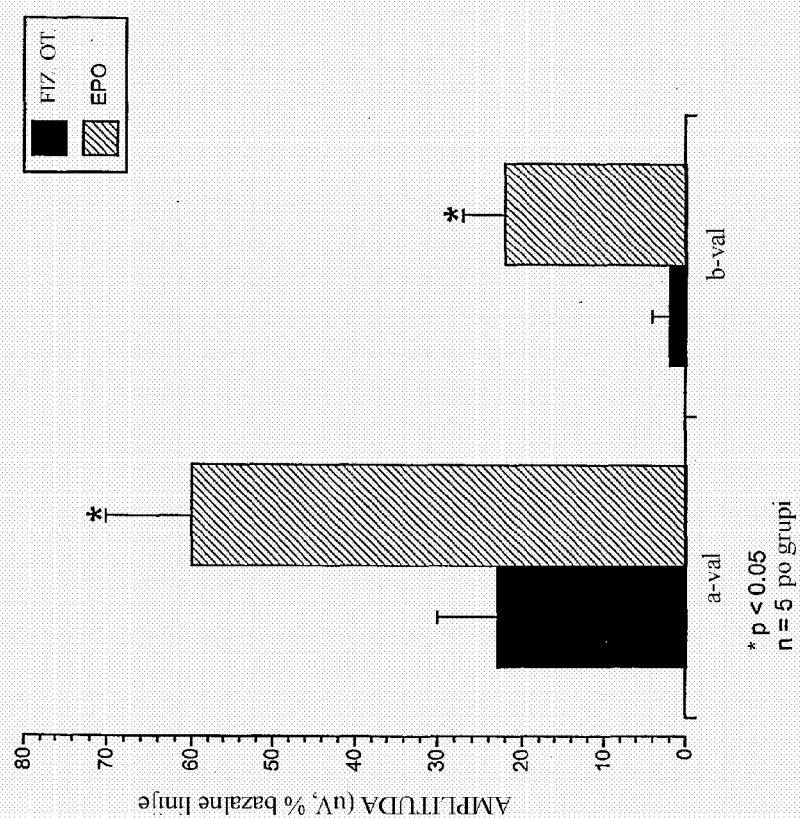
Slika 11

Elektroretinogrami štakora podvrgnutih 60-minutnoj ishemiji



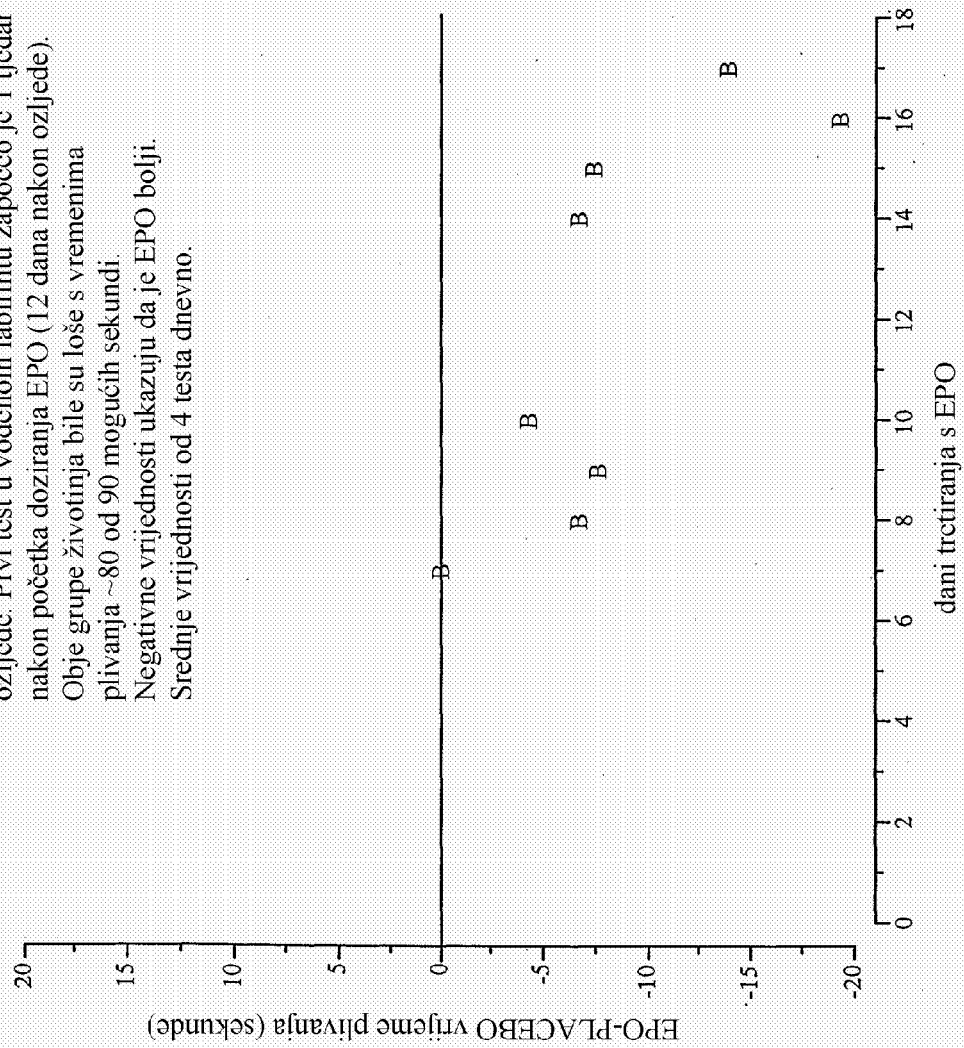
Slika 12

Amplituda retinograma nakon 60 min ishemije



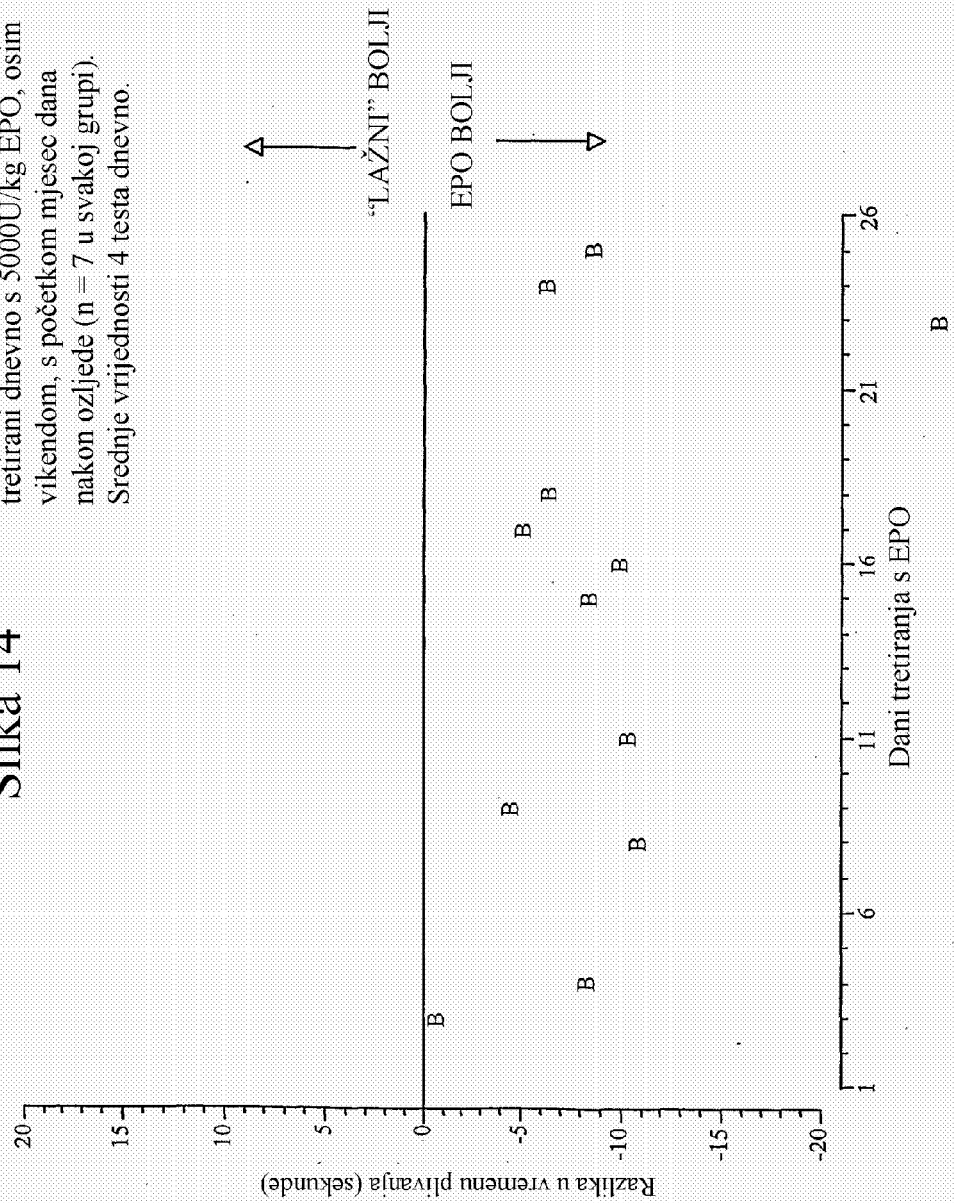
Slika 13

Morrisov vodeni labirint, ženke Balb/c miševa n=16.
 Tupa trauma mozga uz EPO rx s početkom 5 dana nakon ozljede. Prvi test u vodenom labirintu započeo je 1 tjedan nakon početka doziranja EPO (12 dana nakon ozljede).
 Obje grupe životinja bile su loše s vremenima plivanja ~80 od 90 mogućih sekundi.
 Negativne vrijednosti ukazuju da je EPO bolji.
 Srednje vrijednosti od 4 testa dnevno.



Slika 14

Razlike u vremenu plivanja do platforme u Morrisovom vodenom labirintu. Balb/c miševi; trauma mozga prije 1 mjesec, tretirani dnevno s 5000U/kg EPO, osim vikendom, s početkom mjesec dana nakon ozljede (n = 7 u svakoj grupi). Srednje vrijednosti 4 testa dnevno.



Slika 15

Kainatni model

