



(12) PATENT

(19) NO

(11) 332038

(13) B1

NORGE

(51) Int Cl.

<i>A61K 38/18 (2006.01)</i>	<i>A61P 25/14 (2006.01)</i>
<i>C07K 14/505 (2006.01)</i>	<i>A61P 25/16 (2006.01)</i>
<i>A61P 3/10 (2006.01)</i>	<i>A61P 25/18 (2006.01)</i>
<i>A61P 7/00 (2006.01)</i>	<i>A61P 25/22 (2006.01)</i>
<i>A61P 9/04 (2006.01)</i>	<i>A61P 25/28 (2006.01)</i>
<i>A61P 9/10 (2006.01)</i>	<i>A61P 25/32 (2006.01)</i>
<i>A61P 21/04 (2006.01)</i>	<i>A61P 27/02 (2006.01)</i>
<i>A61P 25/00 (2006.01)</i>	<i>A61P 27/06 (2006.01)</i>
<i>A61P 25/02 (2006.01)</i>	<i>A61P 29/00 (2006.01)</i>
<i>A61P 25/08 (2006.01)</i>	

Patentstyret

(21)	Søknadsnr	20032912	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	2001.12.28 PCT/US2001/49479
(22)	Inng.dag	2003.06.24	(85)	Videreføringsdag	2003.06.24
(24)	Løpedag	2001.12.28	(30)	Prioritet	2000.12.29, US, 259245 2000.12.29, US, 753132
(41)	Alm.tilgj	2003.06.28			
(45)	Meddelt	2012.06.11			
(73)	Innehaver	The Kenneth S Warren Institute Inc, 712 Kitchawan Road, US-NY10562 OSSINING, USA Anthony Cerami, 170 Mercer Street, New York, NY 10012, US-, USA Michael Brines, 1 Wepawaug Road, US-CT06525 WOODBRIDGE, USA Carla Cerami, 121 Farrington Avenue, US-NY10591 SLEEPY HOLLOW, USA			
(72)	Oppfinner				
(74)	Fullmektig				
(54)	Benevnelse	Beskyttelse, gjenoppbygging og styrking av erythropoietinresponsive celler, vev og organer.			
(56)	Anførte publikasjoner	US 5955422 A, US 5767078 A, US 5457089 A			
(57)	Sammendrag				

Frengangsmåter og sammensetninger er tilveiebrakt for beskyttelse eller styrking av erythropoietinresponsiv celle, vev, organ eller kroppsdelefunksjon eller viabilitet *in vivo*, *in situ* eller *ex vivo* hos pattedyr, som inkluderer mennesker, ved systemisk eller lokal administrasjon av en erythropoietinreseptoraktivitetsmodulator, slik som et erythropoietin eller et modifisert erythropoietin.

BESKYTTELSE, GJENOPPBYGGING OG STYRKING AV ERYTROPOIETINRESPONSIVE CELLER, VEV OG ORGANER.

BAKGRUNN FOR OPPFINNELSEN

I mange år har den eneste, klare fysiologiske rolle til erythropoietin vært dens kontroll av produksjon av røde blodceller. I den senere tid antyder flere retninger for bevis at erythropoietin som et medlem av cytokinsuperfamilien, utfører andre viktige fysiologiske funksjoner som er formidlet gjennom interaksjoner med erythropoietinreseptoren (erythropoietin-R). Disse virkninger inkluderer mitogenese, modulering av kalsiuminfluks til glatte muskelceller og nerveceller og effekter av intermediert metabolisme. Det er antatt at erythropoietin tilveiebringer kompensasjonsresponser som tjener til å forbedre hypoksisk cellulær mikroomgivelse så vel som å modulere programmert celledød forårsaket av metabolsk stress. Selv om studier har bevist at erythropoietin injisert i kraniet beskytter nevroner mot hypoksisk neuronal skade, intrakraniell administrasjon er en upraktisk og uakseptabel vei for administrasjon for terapeutisk anvendelse, spesielt for normale individer. Videre har tidligere studier av anemiske pasienter som er gitt erythropoietin, konkludert med at periferisk administrering av erythropoietin ikke er transportert inn i hjernen (Marti *et al.*, 1997 *Kidney Int.* 51:416-8, Juul *et al.*, 1999, *Pediatr. Res.* 46:543-547; Buemi *et al.*, 2000, *Nephrol. Dial. Transplant.* 15:422-433).

Ulike modifiserte former av erythropoietin har blitt beskrevet med aktiviteter rettet mot å forbedre den erythropoietiske aktivitet av molekylet, slik som dem med endrete aminosyrer ved den karboksyterminale ende, beskrevet i U.S. patent 5 457 089 og i U.S. patent 4 835 260; erythropoietinisoformer med ulike antall sialinsyrerester pr. molekyl, slik som beskrevet i U.S. patent 5 856 292; polypeptider beskrevet i U.S. patent 4 703 008; agonister beskrevet i U.S. patent 5 767 078; peptider som binder til erythropoietinreseptoren, som beskrevet i U.S. patentene 5 773 569 5 830 851; og små molekyletterliknere, som beskrevet i U.S. patent 5 835 382.

Foreliggende oppfinnelse er rettet mot anvendelse av et erythropoietin for fremstilling av et medikament for å beskytte, opprettholde, styrke eller gjenoppbygge erythropoietinresponsive celler og assosierte celler, vev og organer in situ så vel som ex vivo, og for å levere et erythropoietin gjennom en endotelcellebarriere for anvendelse av beskyttelse og styrking av erythropoietinresponsive celler og assosierte celler, vev og organer distale til vaskulaturen, eller for å bære assosierte molekyler.

KORT BESKRIVELSE AV OPPFINNELSEN

I et aspekt er den foreliggende oppfinnelse rettet mot anvendelsen av erytropoietiner for preparering av farmasøytiske sammensetninger for å gjenoppbygge funksjonen eller viabiliteten av erytropoietinresponsive pattedyrceller og deres assosierte celler, vev og organer.

Foreliggende oppfinnelse omfatter anvendelse av et modifisert erytropoietin, for fremstilling av et medikament for å beskytte, opprettholde, forsterke eller gjenopprette funksjonen eller viabiliteten til en erytropoietinresponderende mammalsk celle, vev som omfatter erytropoietinresponderende celler, eller organer som omfatter erytropoietinresponderende celler, hvor nevnte medikament omfatter en modifisert erytropoietin som har minst en av modifiseringene som er listet i (i) til (iii) under og en farmasøytisk akseptabel bærer, der nevnte modifiserte erytropoietin har (a) vevsbeskyttende aktivitet som bestemt *in vitro* ved P19 analysen eller *in vivo* ved midtre hjernearterie lesjonsanalysen og (b) et redusert nivå av erytropoietin aktivitet sammenlignet med nativt erytropoietin:

valgt fra gruppen bestående av

- i) 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 sialinsyre ("sialic acid") rester;
- ii) én eller flere modifiserte lysinrester eller
- iii) én modifikasjon av den N-terminale aminogruppe.

Foreliggende oppfinnelse omfatter også anvendelse av et erytropoietin for fremstilling av et medikament for å beskytte, opprettholde, forsterke eller gjenoppbygge funksjonen eller viabiliteten til en erytropoietinresponderende pattedyrscelle, vev som omfatter erytropoietinresponderende celler eller organ som omfatter erytropoietinresponderende celler, hvor nevnte medikament omfatter et erytropoietin som har vevsbeskyttende aktivitet som bestemt *in vitro* ved P19 testen eller *in vivo* ved den midtre cerebrale arterie lesjonstesten, hvor nevnte celle, vev eller organ ikke er en eksitabel celle, vev eller organ.

De erytropoietinresponsive pattedyrcellene og deres assosierte celler, vev og organer kan være distalt for vaskulaturen, i kraft av en tett endotelcellebarriere. Cellene, vevene, organene eller andre kroppsdelene kan også være isolert fra en pattedyrkropp, slik som dem ment for transplantasjon, ved å benytte eksempler, kan den erytropoietinresponsive cellen eller vevet være neuronale, retinale, muskulære, hjerte, lunge, lever, nyre, tynntarm, binyrebark, binyremarg, kappilærendotel, testikkel, ovarie, pankreas eller endometriumceller eller -vev. Disse eksemplene av erytropoietinresponsive celler er bare illustrative. Den erytropoietinresponsive cellen eller dens assosierte celler, vev eller organer, kan være ikke excitable celler, vev eller organer eller omfatter ikke hovedsakelig excitable celler eller vev.

Pattedyrcellen, vevet eller organet hvor et tidligere nevnt erytropoietinderivat er benyttet, er de som har forbrukt eller vil forbruke en tidsperiode under minst én tilstand uheldig for viabiliteten til cellen, vevet eller organet. Slike tilstander inkluderer traumatisk *in situ* hypoksi eller metabolsk dysfunksjon, kirurgisk induert *in situ* hypoksi eller metabolsk dysfunksjon, eller *in situ* toksineksponering, det sistnevnte kan være assosiert med kjemoterapi eller strålingsterapi. I en utførelsesform er de motvirkende tilstander et resultat av kardipulmonal by-pass (hjerte-lunge maskin), som benyttes for enkelte kirurgiske prosedyrer.

Erytropoietinene er nyttige for den terapeutiske eller profylaktiske behandlingen av humane sykdommer i sentralnervesystemet eller det perifere nervesystemet, som primært har nevrologiske eller psykiatriske symptomer, så vel som øyesykdommer, kardiovaskulære sykdommer, kardiopulmonare sykdommer, respiratoriske sykdommer, nyre, urinveis og reproduktive sykdommer, gastrointestinale sykdommer og endokrine og metabolske abnormiteter.

Farmasøytiske sammensetninger omfattende bestemte erytropoietinderivater for administrasjon til et pattedyr, fortrinnsvis et menneske kan fremstilles. Slike farmasøytiske sammensetninger kan være formulert for oral, intranasal eller parenteral administrasjon., eller i form av en perfusjonsløsning for opprettholdelse av viabiliteten av celler, vev eller organer *ex vivo*.

Erytropoietinderivater som er nyttige for de tidligere nevnte formål, kan være et hvert naturlig erytropoietin eller en erytropoietinanalogue, en erytropoietinetterlikner og erytropoietinfragment, en hybrid erytropoietinmolekyl, et erytropoietin-reseptorbindende molekyl, en erytropoietinagonist, et renalt erytropoietin, et hjerne-erytropoietin, en oligomer derav, en multimer derav, et mutein derav, en beslektet derav, en naturlig forekommende form derav, en syntetisk form derav, en rekombinant form derav, en glykosyleringsvariant derav, en deglykosylert variant derav eller en kombinasjon derav. Enhver form for erytropoietin i stand til å være til fordel for erytropoietinresponsive celler, er innbefattet i dette aspektet av oppfinnelsen.

Andre erytropoietinderivater som er nyttige for de tidligere nevnte formål og farmasøytiske sammensetninger, inkluderer både naturlige erytropoietiner, så vel som erytropoietiner som er endret ved minst én modifikasjon, sammenliknet med naturlig erytropoietin, og fortrinnsvis som sammenliknet med naturlig, humant erytropoietin. Den minst ene modifikasjonen kan være en modifikasjon av minst én aminosyre av erytropoietinmolekylet, eller en modifikasjon av minst ett karbohydrat på erytropoietinmolekylet. Selvfølgelig kan erytropoietinmolekyler som er nyttige for formåler her, ha en pluralitet av modifikasjoner sammenliknet med det

naturlige molekylet, slik multiple modifikasjoner av aminosyredelen av molekylet, multiple modifikasjoner av karbohydratdelen av molekylet eller minst én modifikasjon av aminosyredelen av molekylet og minst én modifikasjon av karbohydratdelen av molekylet. Det modifisert erythropoietinmolekylet beholder sin evne til å beskytte, opprettholde, styrke eller gjenoppbygge funksjonen eller viabiliteten av erythropoietinresponsive pattedyrceller, likevel kan andre egenskaper av erythropoietinmolekylet ikke relatert til den tidligere nevnte ønskelige egenskap, være fraværende, sammenliknet med det naturlige molekylet. I en foretrukket utførelsesform er erythropoietinderivatet ikke-erythropoietisk.

I en utførelsesform har erythropoietinet av oppfinnelsen minst ingen sialinsyrerester. I en foretrukket utførelsesform er det modifiserte erythropoietinet asialoerythropoietin, og mest foretrukket humant asialoerythropoietin. I en annen utførelsesform har det modifiserte erythropoietinet 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 eller 13 sialinsyrerester.

Det modifiserte erythropoietinet kan ha minst ingen N-forbundne eller ingen O-forbundne karbohydrater.

I en utførelsesform har det modifiserte erythropoietinet minst et redusert karbohydratinnhold i kraft av behandling av erythropoietin, med dets naturlige karbohydrater med minst én glykosidase.

Karbohydratdelen av det modifiserte erythropoietinmolekylet kan ha minst et ikke-mammalsk glykosyleringsmønster i kraft av ekspresjonen av et rekombinant erythropoietin i ikke-mammalske celler. I en foretrukket utførelsesform er de modifiserte erythropoietinene uttrykket i insektceller eller planteceller.

Det modifiserte erythropoietinet kan ha minst en eller flere oksiderte karbohydrater som også kan være kjemisk reduserte. I en foretrukket utførelsesform er det modifiserte erythropoietinet periodatoksidert erythropoietin; i en annen utførelsesform er periodatoksidert erythropoietin kjemisk redusert med et borhydridsalt slik som natriumklorhydrid eller natriumcyanborhydrid.

Det modifiserte erythropoietinet for anvendelsen nevnt tidligere, kan ha minst én eller flere modifiserte argininrester. Det modifiserte erythropoietinet kan ha en glyksalrest på den ene eller flere argininrester, slik som en arylglyksal- eller alkylglyksalhalvdel. Minst én argininrest modifisert ved reaksjon med et tilstøtende diketon, slik som, men ikke begrenset til, 2,3-butandion eller sykloheksandion er også mulig.

I en utførelsesform omfatter det modifiserte erythropoietinet minst én eller flere modifiserte lysinrester eller en modifikasjon av den N-terminale aminogruppe av erythropoietinmolekylet, slike modifikasjoner er de som er et resultat fra reaksjon av glysinresten eller den N-terminale aminogruppen med et aminogruppemodifiserende middel. Den modifiserte lysinresten kan videre være kjemisk produsert. I en foretrukket utførelsesform er et erythropoietin karbamylert via én eller flere lysingrunder.

Lysinet kan reagere med aldehyd eller reduserende sukker for å danne et imin som kan stabiliseres ved reduksjon med natriumcyanborhydrid for å danne et N-alkylert lysin, slik som glucitolyllysin eller som i tilfellet av reduserende sukker kan stabiliseres ved Amadori eller Heyns omgruppering for dannelsen av et alfa-deoksy alfa-amino sukker, slik som alfa-deoksy-alfa-fruktosyllysin.

I en annen foretrukket utførelsesform er lysingruppen karbamylert (karbamoylert), slik som i kraft av reaksjon med cyanation, alkyl-karbamylert, aryl-karbamylert eller aryl-tiokarbamylert med et alkyl-isocyanat, aryl-isocyanat eller aryl-isotiocyanat, eller den kan være acylert ved en reaktiv alkylkarboksylsyre eller arylkarboksylsyrederivat, slik som ved reaksjon med eddiksyreanhydrid, ravsyreanhydrid eller ftalsyreanhydrid. Minst én lysingruppe kan også være trinitrofenylmodifisert ved reaksjon med en trinitrobenzensulfonsyre, eller fortrinnsvis dens salter.

Lysinrestene kan være modifisert ved reaksjon med et glyksalderivat, slik som reaksjon med glyksal, metylglyksal eller 3-dioksyglukoson for å danne de korresponderende alfa-karboksyalkylderivatene.

Minst én tyrosinrest av erythropoietin kan være modifisert i en aromatisk ringposisjon ved en elektrofil reagens, slik som ved nitrering eller jodinerings.

Minst en asparginsyre eller glutaminsyrerest av et erythropoietin kan være modifisert, slik som ved reaksjon med et karbodiimid fulgt av reaksjon med et amin slik som, men ikke begrenset til glysinamid.

En tryptofanrest av et erythropoietin kan være modifisert slik som ved reaksjon med n-bromsuksinimid eller n-klor-suksinimid.

Et modifisert erythropoietinmolekyl kan tilveiebringes som har minst én erythropoietinamingruppe fjernet, slik som ved reaksjon med ninhydrin fulgt av reaksjon av den resulterende karbonylgruppe ved reaksjon med borhydrid.

Et modifisert erythropoietin kan tilveibringes som minst har en åpning av minst én av cysteinformbindelsene i erythropoietinmolekylet ved reaksjon med et reduserende middel slik som ditiotreitol fulgt av reaksjon av de påfølgende sulhydriellene med jodacetamin, jodeddiksyre eller en annen elektrofil, for å hindre reformasjon av disulfidformbindelsene.

Et modifisert erythropoietin kan tilveibringes som minst har én substitusjon av hvilke som helst av et antall aminosyrer, slik som en leusin med minst én av lysin, arginin, tryptofan, tyrosin eller cysteinrester av erythropoietin, ved anvendelse av molekylærbiologiske teknikker.

Et modifisert erythropoietin kan utsettes for en begrenset kjemisk proteolyse som er målrettet til spesifikke rester, for eksempel for å spalte etter tryptofanrester. Slike resulterende erythropoietinfragmenter er omfattet heri.

Som beskrevet ovenfor kan erythropoietin, nyttig for anvendelsene her, ha minst én av de tidligere nevnte modifikasjonene, men kan ha flere enn en av modifikasjonene ovenfor. Ved eksempel av et modifisert erythropoietin med en modifikasjon på karbohydratdelen av molekylet og en modifikasjon på aminosyredelen, er et modifisert erythropoietin asialoerythropoietin og har sine lysinrester biotinyllert eller karbamylert.

Anvendelse av et modifisert erythropoietin for fremstilling av et medikament i følge oppfinnelsen gjør det mulig å beskytte, opprettholde, styrke eller gjenoppbygge funksjonen eller viabiliteten av erythropoietinresponsive pattedyrceller og deres assosierte celler, vev og organer, ved tilførsel av en effektiv mengde av en hvilken som helst eller flere av de ovenfor nevnte erythropoietinene.

I en bestemt utførelsesform er den erythropoietinresponsive celle eller dens assosierte celler, vev eller organer ikke excitable celler, vev eller organer og omfatter ikke hovedsakelig excitable celler eller vev. I en annen bestemt utførelsesform kan pattedyrcellen, vevet eller organet som et tidligere nevnt erythropoietinderivat skal tilføres til, være den som har forbrukt eller vil forbruke en periode av tid under minst én tilstand motvirkende til viabiliteten av cellen, vevet eller organet. Slike forhold kan inkludere traumatisk in situ hypoksi eller metabolsk dysfunksjon, kirurgisk induert in situ hypoksi eller metabolsk dysfunksjon, eller in situ toksineksponering, det sistnevnte kan være assosiert med kjemoterapi eller strålingsterapi. I en utførelsesform beskytter oppfinnelsen mot de motvirkende tilstander fra kardipulmonal by-pass.

Ethvert av de foregående erythropoietinene, så vel som hvilke som helst andre erythropoietinmolekyler som inkluderer naturlig, humant erythropoietin kan benyttes i prepareringen av en farmasøytisk sammensetning for *ex vivo* behandling av celler, vev og organer for formålet å beskytte, opprettholde, styrke eller gjenoppbygge funksjonen eller viabiliteten av erythropoietinresponsive pattedyrceller og deres assosierte celler, vev og organer. Slik *ex vivo* behandling er nyttig, for eksempel for oppbevaring av celler, vev eller organer for transplantasjon, enten autotransplantasjon eller xenotransplantasjon. Cellene, vevet eller organet kan bades i en løsning som omfatter erythropoietin eller perfusat dryppet inn i organet gjennom vaskulaturen eller ved andre midler for opprettholdelse av cellulær funksjon under perioden hvor cellene, vevet eller organet ikke er integrert med vaskulaturen til donoren eller mottakeren. Administrasjon av perfusatet kan gjøres til en donor før organhøstingen, så vel som til det høstete organet og til mottakeren. Videre er den tidligere nevnte anvendelse av ethvert erythropoietin nyttig når en celle, et vev eller organ er isolert fra vaskulaturen til individet og dermed hovedsakelig eksisterer *ex vivo* for en tidsperiode, betegnelsen isolert refererer til å begrense eller presse sammen vaskulaturen fra eller til cellen, vevet, organet eller kroppsdel, slik som det kan utføres ved kirurgi, som nærmere bestemt inkluderer kardipulmonal by-pass kirurgi; by-pass av vaskulaturen til cellen, vevet, organet eller kroppsdel; å fjerne cellen, vevet, organet eller kroppsdel fra pattedyrkroppen, som kan utføres før xenotransplantasjon eller før eller under autotransplantasjon; eller traumatisk amputasjon av en celle, vev, organ eller kroppsdel. Dermed vedrører dette aspektet av oppfinnelsen både perfusjonen med et erythropoietin *in situ* og *ex vivo*. *Ex vivo* kan erythropoietinet tilveiebringes i celle, vev eller organ i oppbevaringsløsning. For begge aspekter kan eksponeringen være ved midler av kontinuerlig perfusjon, pulsatil perfusjon, infusjon, bading, injeksjon eller kateterisering.

Anvendelsen av et modifisert erythropoietin for fremstilling av et medikament i følge oppfinnelsen gjør det mulig å beskytte, opprettholde, styrke eller gjenoppbygge viabiliteten av en pattedyrcelle, vev, organ eller kroppsdel som inkluderer en erythropoietinresponsiv celle eller vev, hvor cellen, vevet, organet eller kroppsdel er isolert fra pattedyrkroppen. Derfor kan både perfusjonen med et erythropoietin *in situ* og *ex vivo*. *Ex vivo* kan erythropoietinet tilveiebringes i celle, vev eller organ i oppbevaringsløsning anvendes. For begge aspekter kan eksponeringen være ved midler av kontinuerlig perfusjon, pulsatil perfusjon, infusjon, bading, injeksjon eller kateterisering.

I den tidligere nevnte isolasjon eller *ex vivo* utførelsesformen, kan et nyttig erythropoietin være ethvert av de tidligere nevnte erythropoietinene, som inkluderer ethvert naturlig erythropoietin, eller en erythropoietinanalogue, en erythropoietinetterlikner og erythropoietinfragment, et hybriderythropoietinmolekyl, et erythropoietinreseptorbindende molekyl, en

erytropoietinagonist, et renalt erytropoietin, et hjerneerytropoietin, en oligomer derav, en multimer derav, et mutein derav, en beslektet derav, en naturlig forekommende form derav, en syntetisk form derav, en rekombinant form derav, en glykosyleringsvariant derav, en deglykosylert variant derav eller en kombinasjon derav. Enhver form av erytropoietin i stand til å være til fordel for erytropoietinresponsive celler er omfattet i dette aspektet av oppfinnelsen. Andre erytropoietiner kan være asialoerytropoietin, N-deglykosylert erytropoietin, O-deglykosylert erytropoietin, erytropoietin med redusert karbohydratinnhold, erytropoietin med endret glykosyleringsmønster, erytropoietin med karbohydrater oksydert så redusert, arylglyoksal-modifisert erytropoietin, alkylglyoksal-modifisert erytropoietin, 2,3-butandion-modifisert erytropoietin, sykloheksandion-modifisert erytropoietin, biotinyllert erytropoietin, N-alkylert-lysyl-erytropoietin, glusitollylsin erytropoietin, alfa-deoksy-alfa-fruktosyllysine-erytropoietin, karbamylert erytropoietin, acetyllert erytropoietin, suksinyllert erytropoietin, alfa-karboksyalkyl erytropoietin, nitrrert erytropoietin, jodert erytropoietin for å nevne noen representative eksempler basert på lærdommen her. Et humant erytropoietin er foretrukket; naturlig humant erytropoietin er mest foretrukket. I en annen utførelsesform er humant asialoerytropoietin foretrukket, også humant fenylglyoksal erytropoietin kan anvendes.

Den tidligere nevnte *ex vivo* erytropoietinresponsive celle eller vev, kan være eller omfatte neuronale, retinale, muskulære, hjerte, lunge, lever, nyre, tynntarm, binyrebark, binyremarg, kappilærendotel, testikkel, ovarie eller endometriumceller eller -vev. Disse eksemplene av erytropoietinresponsive celler er bare illustrative.

De foregående anvendelsene i følge oppfinnelsen er fortrinnsvis anvendelige for mennesker, men er også nyttige for ethvert pattedyr, slik som, men ikke begrenset til, kjæledyr, husdyr, buskap og dyr i dyrehage. Tilførselsmåter av de tidligere nevnte farmasøytiske sammensetninger inkluderer oral, intravenøs, intranasal, topikal, intraluminal, inhalering eller parenteral tilførsel, sistnevnte inkluderer intravenøs, intraarteriell, subkutan, intramuskulær, intraperitoneal, submukosal eller intradermal. For *ex vivo* anvendelse er et perfusat eller en badeløsning foretrukket. Dette inkluderer og perfuserer en isolert del av vaskulaturen *in situ*. I et ytterligere aspekt av oppfinnelsen er ethvert av de tidligere nevnte erytropoietinene nyttige i preparering av en farmasøytisk sammensetning for gjenoppbygging av en dysfunksjonell celle, vev eller organ når det tilføres etter begynnelsen av sykdommen eller tilstanden som er ansvarlig for dysfunksjonen. Ved eksempler gjenoppbygger administrasjon av en farmasøytisk sammensetning som omfatter erytropoietin, kognitiv funksjon hos dyr som tidligere hadde hjernetraume, til og med når det administreres lenge etter (for eksempel 3 dager, 5 dager, 1 uke, 1 måned eller lengre) traumen har avtatt. Erytropoietiner som er nyttige for slike anvendelser inkluderer ethvert av de bestemte tidligere nevnte erytropoietinene, eller

ethvert naturlig erythropoietin, eller en erythropoietinanalogue, en erythropoietinetterlikner og erythropoietinfragment, en hybrid erythropoietinmolekyl, et erythropoietin-reseptorbindende molekyl, en erythropoietinagonist, et renalt erythropoietin, et hjerne-erythropoietin, en oligomer derav, en multimer derav, et mutein derav, en beslektet form derav, en naturlig forekommende form derav, en syntetisk form derav, en rekombinant form derav, en glykosyleringsvariant derav, en deglykosylert variant derav eller en kombinasjon derav. Enhver form for erythropoietin i stand til å være til fordel for erythropoietinresponsive celler, er innbefattet i dette aspektet av oppfinnelsen. Andre erythropoietinderivater som er nyttige for de tidligere nevnte formål og farmasøytiske sammensetninger, inkluderer både naturlige erythropoietiner, så vel som erythropoietiner som er endret ved minst én modifikasjon, sammenliknet med naturlig erythropoietin, og fortrinnsvis når sammenliknet med naturlig, humant erythropoietin. Den minst ene modifikasjonen kan være en modifikasjon av minst én aminosyre av erythropoietinmolekylet, eller en modifikasjon av minst ett karbohydrat av erythropoietinmolekylet. Selvfølgelig kan erythropoietinmolekyler som er nyttige for formålet her, ha en pluralitet av modifikasjoner sammenliknet med det naturlige molekylet, slik som multiple modifikasjoner av aminosyredelen av molekylet, multiple modifikasjoner av karbohydratdelen av molekylet eller minst én modifikasjon av aminosyredelen av molekylet og minst én modifikasjon av karbohydratdelen av molekylet. Det modifisert erythropoietinmolekylet beholder sin evne til å beskytte, opprettholde, styrke eller gjenoppbygge funksjonen eller viabiliteten av erythropoietinresponsive pattedyrceller, likevel kan andre egenskaper av erythropoietinmolekylet ikke relatert til den tidligere nevnte ønskelige egenskap, være fraværende, sammenliknet med det naturlige molekylet. Et humant erythropoietin er foretrukket; naturlig humant erythropoietin er mest foretrukket. I en annen utførelsesform er humant, asialoerythropoietin foretrukket.

Anvendelse av det tidligere nevnte erythropoietinet for å gjenoppbygge en dysfunksjonell celle, vev eller organ er mulig når det administreres etter starten på sykdommen eller tilstanden som er ansvarlig for dysfunksjonen. Ved ikke-begrensede eksempler gjenoppbygger en farmasøytisk sammensetning, som omfatter erythropoietin, kognitiv funksjon hos dyr som tidligere hadde hjernetraume, til og med når det administreres lenge etter (for eksempel 3 dager, 5 dager, 1 uke, 1 måned eller lengre) traumen har avtatt. Erythropoietiner som er nyttige inkluderer ethvert av de bestemte tidligere nevnte erythropoietinene, eller ethvert naturlig erythropoietin, eller en erythropoietinanalogue, en erythropoietinetterlikner og erythropoietinfragment, en hybrid erythropoietinmolekyl, et erythropoietin-reseptorbindende molekyl, en erythropoietinagonist, et renalt erythropoietin, et hjerne-erythropoietin, en oligomer derav, en multimer derav, et mutein derav, en beslektet form derav, en naturlig forekommende form derav, en syntetisk form derav, en rekombinant form derav, en glykosyleringsvariant derav, en deglykosylert variant derav eller en kombinasjon derav. Enhver form for

erythropoietin i stand til å være til fordel for erythropoietinresponsive celler, er innbefattet i dette aspektet av oppfinnelsen. Andre erythropoietinderivater som er nyttige for de tidligere nevnte formål og farmasøytiske sammensetninger, inkluderer både naturlige erythropoietiner, så vel som erythropoietiner som er endret ved minst én modifikasjon, sammenliknet med naturlig erythropoietin, og fortrinnsvis når sammenliknet med naturlig, humant erythropoietin. Den minst ene modifikasjonen kan være en modifikasjon av minst én aminosyre av erythropoietinmolekylet, eller en modifikasjon av minst ett karbohydrat av erythropoietinmolekylet. Selvfølgelig kan erythropoietinmolekyler som er nyttige for formåler her, ha en pluralitet av modifikasjoner sammenliknet med det naturlige molekylet, slik som multiple modifikasjoner av aminosyredelen av molekylet, multiple modifikasjoner av karbohydratdelen av molekylet eller minst én modifikasjon av aminosyredelen av molekylet og minst én modifikasjon av karbohydratdelen av molekylet. Det modifisert erythropoietinmolekylet beholder sin evne til å beskytte, opprettholde, styrke eller gjenoppbygge funksjonen eller viabiliteten av erythropoietinresponsive pattedyrceller, likevel kan andre egenskaper av erythropoietinmolekylet ikke relatert til den tidligere nevnte ønskelige egenskap, være fraværende, sammenliknet med det naturlige molekylet. Et humant erythropoietin er foretrukket; naturlig humant erythropoietin er mest foretrukket. I en annen utførelsesform er humant, asialoerythropoietin foretrukket.

Det er mulig å fremme transcytosen av molekyler over endotelcellebarrieren i et pattedyr ved administrasjon av en sammensetning av et molekyl i assosiasjon med et erythropoietin slik som: Et erythropoietin som har minst ingen sialinsyrerester; et erythropoietin som har minst ingen N-forbundne eller ingen O-forbundne karbohydrater; et erythropoietin som har minst et redusert karbohydratinnhold i kraft av behandling av naturlig erythropoietin med minst en glykosidase; et erythropoietin med en karbohydratdel av erythropoietinmolekylet, som har minst et ikke-mammalsk glykosyleringsmønster i kraft av ekspresjonen av et rekombinant erythropoietin i ikke-mammalske celler; et erythropoietin har minst ett eller flere oksiderte karbohydrater som også kan være kjemisk reduserte; et erythropoietin som har minst en eller flere modifiserte argininrester; et erythropoietin som har minst en eller flere modifiserte lysinrester eller en modifikasjon av den N-terminale aminogruppen av erythropoietinmolekylet; et erythropoietin som minst har én modifisert tyrosinrest; et erythropoietin som minst har en modifisert asparginsyre eller glutaminsyrerest; et erythropoietin som minst har en modifisert tryptofanrest; et erythropoietin som minst har en aminogruppe fjernet; et erythropoietin som minst har en åpning av minst en av cysteinforbindelsene i erythropoietinmolekylet; et erythropoietin er tilveiebrakt som har minst en substitusjon av minst en aminosyre; eller et avkortet erythropoietin.

Assosiasjonen mellom molekylet som skal bli transportert og erytropoietinet kan for eksempel være en ustabil, kovalent binding, en stabil kovalent binding, eller en ikke-kovalent assosiasjon med et bindingssete for molekylet. Endotelcellebarrierer kan være blod-hjerne barriere, blod-øye barriere, blod-testikkel barriere, blod-ovarie barriere og blod-placenta barriere. Egnet molekyl for transport inkluderer hormoner, slik som veksthormon, antibiotika og anti-cancermedler.

Det kan tilveiebringes en sammensetning for å fremme transcytose av et molekyl over en endotelcellebarriere i et pattedyr, nevnte sammensetning omfatter nevnte molekyl i assosiasjon med et erytropoietin, slik som et erytropoietin som minst har ingen sialinsyrerester; et erytropoietin som har minst ingen N-forbundne eller ingen O-forbundne karbohydrater; et erytropoietin som har minst et redusert karbohydratinnhold i kraft av behandling av naturlig erytropoietin med minst en glykosidase; et erytropoietin med en karbohydratdel av det modifiserte erytropoietinet som har minst et ikke-mammalsk glykosyleringsmønster i kraft av ekspresjonen av et rekombinant erytropoietin i ikke-mammalske celler; et erytropoietin har minst én eller flere oksiderte karbohydrater som også kan være kjemisk reduserte; et erytropoietin som har minst en eller flere modifiserte argininrester; et erytropoietin som har minst en eller flere modifiserte lysinrester eller en modifikasjon av den N-terminale aminogruppen av erytropoietinmolekylet; et erytropoietin som minst har én modifisert tyrosinrest; et erytropoietin som minst har en modifisert asparginsyre eller glutaminsyrerest; et erytropoietin som minst har en modifisert tryptofanrest; et erytropoietin som minst har en aminogruppe fjernet; et erytropoietin som minst har en åpning av minst en av cysteinforbindingene i erytropoietinmolekylet; et erytropoietin er tilveiebrakt som har minst en substitusjon av minst en aminosyre; eller et avkortet erytropoietin.

Assosiasjonen kan for eksempel være en ustabil, kovalent binding, en stabil kovalent binding, eller en ikke-kovalent assosiasjon med et bindingssete for molekylet. Endotelcellebarrierer kan være blod-hjerne barrieren, blod-øye barrieren, blod-testikkel barrieren, blod-ovarie barrieren og blod-placenta barrieren. Egnet molekyl for transport inkluderer hormoner, slik som veksthormon, antibiotika og anti-cancermedler.

Ethvert av de tidligere nevnte erytropoietinene kan være nyttige i prepareringen av en farmasøytisk sammensetning for å fremme transcytose av et molekyl over en endotelcellebarriere i et pattedyr, nevnte sammensetning omfatter nevnte molekyl i assosiasjon med et erytropoietin, slik som et erytropoietin som minst har ingen sialinsyrerester; et erytropoietin som har minst ingen N-forbundne eller ingen O-forbundne karbohydrater; et erytropoietin som har minst et redusert karbohydratinnhold i kraft av

behandling av naturlig erythropoietin med minst en glykosidase; et erythropoietin med en karbohydratdel av det modifiserte erythropoietinmolekylet som har minst et ikke-mammalsk glykosyleringsmønster i kraft av ekspresjonen av et rekombinant erythropoietin i ikke-mammalske celler; et erythropoietin har minst én eller flere oksiderte karbohydrater som også kan være kjemisk reduserte; et erythropoietin som har minst en eller flere modifiserte argininrester; et erythropoietin som har minst en eller flere modifiserte lysinrester eller en modifikasjon av den N-terminale aminogruppen av erythropoietinmolekylet; et erythropoietin som minst har én modifisert tyrosinrest; et erythropoietin som minst har en modifisert asparaginsyre eller glutaminsyrerest; et erythropoietin som minst har en modifisert tryptofanrest; et erythropoietin som minst har en aminogruppe fjernet; et erythropoietin som minst har en åpning av minst en av cysteinformbindelsene i erythropoietinmolekylet; et erythropoietin er tilveiebrakt som har minst en substitusjon av minst en aminosyre; eller et avkortet erythropoietin.

Assosiasjonen kan for eksempel være en ustabil, kovalent binding, en stabil kovalent binding, eller en ikke-kovalent assosiasjon med et bindingssete for molekylet. Endotelcellebarrierer kan være blod-hjerne barrieren, blod-øye barrieren, blod-testikkel barrieren, blod-ovarie barrieren og blod-placenta barrieren. Egnet molekyl for transport inkluderer hormoner, slik som veksthormon, antibiotika og anti-cancermidler.

Disse og andre aspekter av den foreliggende oppfinnelse vil bli bedre forstått ved referanse til etterfølgende figurer og detaljert beskrivelse.

KORT BESKRIVELSE AV FIGURENE

Figur 1 avbilder translokasjonen av parenteralt administrert erythropoietin til cerebrospinalvæsken.

Figur 2 viser beskyttelsen av myokardium fra ischemisk ødeleggelse ved erythropoietin etter kortvarig vaskulær okklusjon.

Figur 3 viser opprettholdelsen av funksjonen av et hjerte preparert for transplantasjon ved erythropoietin.

Figur 4 sammenlikner *in vitro* effektiviteten av erythropoietin og på viabiliteten av serum-sultede P19-celler.

Figur 5 er et annet eksperiment som sammenlikner *in vitro* effektiviteten av erythropoietin og asialoerythropoietin på viabiliteten av serum-sultede P19-celler.

Figur 6 sammenlikner *in vitro* effektiviteten av erythropoietin og fenyglyoksal-modifisert erythropoietin på viabiliteten av serum-sultede P19-celler.

Figur 7 viser beskyttelse av erythropoietin og asialoerythropoietin i en rotte fokal cerebral ischemi-modell.

Figur 8 viser en doserespons som sammenlikner effektiviteten av humant erythropoietin og humant asialoerythropoietin i midtre cerebral arterieokklusjon i en modell av ischemisk slag.

Figur 9 viser effekten av biotinylert erythropoietin og asialoerythropoietin i P19-testen.

Figur 10 viser aktiviteten av jodert erythropoietin i P19-testen.

Figur 11 avbilder effekten av erythropoietinbehandling i en rotteglaukommodell.

Figur 12 viser omfanget av vedlikeholdet av retinalfunksjon ved erythropoietin i rotteglaukommodellen.

Figur 13 avbilder gjenoppbyggingen av kognitiv funksjon etter hjernetraume ved tilførsel av erythropoietin som startet 5 dager etter traume.

Figur 14 avbilder gjenoppbyggingen av kognitiv funksjon etter hjernetraume ved tilførsel av erythropoietin som startet 30 dager etter traume.

Figur 15 avbilder effektiviteten av humant asialoerythropoietin i en kainatmodell av cerebral toksisitet.

DETALJERT BESKRIVELSE AV OPPFINNELSEN

”Erythropoietinresponsiv celle” refererer til en pattedyr-celle der funksjonen eller viabilitet kan være opprettholdt, fremmet, styrket, regenerert eller på en hvilken som helst annen måte være til nytte ved eksponering for et erythropoietin. Eksempler på slike celler inkluderer neuronale, retinale, muskulære hjerte, lunge, lever, nyre, tynntarm, binyrebark, binyremarg, kapillærendotel, testikkel, ovarie og endometriumceller. Dessuten kan slike erythropoietinresponsive celler og fordelene tilveiebrakt ved et erythropoietin være utvidet til å tilveiebringe beskyttelse eller forsterking, indirekte til andre celler som ikke direkte er erythropoietinresponsive, eller av vev eller organer som inneholder slike ikke-erythropoietinresponsive celler. Disse andre cellene, vevene eller organene som har nytte

indirekte fra forsterkningen av erythropoietinresponsive celler, presenterer som del av cellene, vevet eller organet som "assosierte" celler, vev og organer. Fordeler av et erythropoietin som beskrevet her kan således være tilveiebrakt som et resultat av tilstedeværelsen av et lite antall eller forhold av erythropoietinresponsive celler i et vev eller organ, for eksempel excitabelt eller neuronalt vev tilstede i slikt vev eller Leyding-celler i testiklene, som produserer testosteron. I et aspekt er den erythropoietinresponsive cellen eller dens assosierte celler, vev eller organer ikke excitable celler, vev eller organer eller omfatter hovedsakelig ikke excitable celler eller vev.

Det er mulig å tilveiebringe den lokale eller systemiske beskyttelse eller styrkingen av celler, vev og organer i en pattedyrkropp, under et stort utvalg av normale og motvirkende tilstander, eller beskyttelse av dem som er bestemt for omplassering til en annen pattedyrkropp. I tillegg er gjenoppbygging eller regenerering av dysfunksjon også mulig. Som nevnt ovenfor har et erythropoietin evne til å krysse en tett endotelcellebarriere og utøve sine positive effekter på erythropoietinresponsive celler (så vel som andre celletyper) distalt for vaskulaturen, og har potensiale til å hindre så vel som å behandle et stort utvalg av tilstander og sykdommer som på annen måte forårsaker signifikant cellulær- og vevsskade hos et dyr inkludert menneske, og dessuten å tillate suksess for hittil ikke utprøvde kirurgiske prosedyrer hvor risiko tradisjonelt sett oppveier for fordelene. Varighet og grad av viktige motvirkende forhold indusert for maksimal fordel, slik som høy dose kjemoterapi, strålingsterapi, forlenget *ex vivo* transplantasjonsoverlevelse og forlengete perioder av kirurgisk indusert ischæmi, kan utføres. .. Cellulær-, vevs eller organdysfunksjon kan gjenoppbygges eller regenerert etter en akutt motvirkende hendelse (slik som traume) ved eksponering for et erythropoietin.

Oppfinnelsen er derfor generelt rettet mot anvendelse av erythropoietiner for preparering av farmasøytiske sammensetninger for de tidligere nevnte formål hvor cellulær funksjon er opprettholdt, fremmet, styrket, regenerert eller på en hvilken som helst annen måte som kan være fordelaktig. Også anvendelse for å opprettholde, styrke, fremme eller regenerere cellulær funksjon ved tilførsel til pattedyr en effektiv mengde av et erythropoietin som beskrevet her kan benyttes. Videre er det mulig og opprettholde, styrke, fremme eller regenerere cellulær funksjon *ex vivo* ved eksponering av celler, vev eller organ for et erythropoietin .

Perfusatsammensetning omfattende et erythropoietin for anvendelse for organ- eller vevsoppbevaring er mulig.

De ulike f anvendelser benytter en farmasøytisk sammensetning som minst inkluderer et erythropoietin i en effektiv mengde for den bestemte rute og varighet av eksponering for utøvelse av positive effekter eller fordeler på erythropoietinresponsive celler i eller fjernet fra en pattedyrkropp hvor den målrettede celle, vev eller organer for den påtenkte terapien har

behov for erythropoietin for å krysse en endotel cellebarriere, inkluderer den farmasøytiske sammensetning en erythropoietinkonsentrasjon som er i stand til å utøve den ønskete effekt på de erythropoietinresponsive cellene etter å ha krysset endotelcellebarrieren. Molekyler som kan interagere med erythropoietinreseptoren og modulere reseptoraktiviteten, her referert til som erythropoietin eller erythropoietinreseptoraktivitetsmodulatorer, er nyttige i sammenhengen for den foreliggende oppfinnelse. Disse molekylene kan for eksempel være naturlig forekommende syntetiske eller rekombinante former av erythropoietinmolekylene, som beskrevet ovenfor, eller andre molekyler som kanskje nødvendigvis ikke likner erythropoietin på noen måte, med unntak av å modulere erythropoietinresponsiv celleaktivitet som beskrevet her.

Erythropoietin er et glykoprotein hormon som i mennesker har en molekylvekt på omkring 34 kDa. Det modne protein omfatter 165 aminosyrer, og glykosylrestene omfatter omkring 40% av molekylvekten. Formene av erythropoietin som er nyttige og utførelsen av den foreliggende oppfinnelse omfatter naturlig forekommende, syntetisk og rekombinante former av de følgende humane og andre pattedyr erythropoietin-relaterte molekyler: erythropoietin, asialoerythropoietin, deglykosylert erythropoietin, erythropoietinanaloger, erythropoietinetterliknere, erythropoietinfragmenter, hybriderythropoietinmolekyler, erythropoietinreseptorbindende molekyler, erythropoietinagonister, renalt erythropoietin, hjerne-erythropoietin, oligomerer og multimerer derav, muteiner derav og beslektete derav, i tillegg inkluderer erythropoietinforme, nyttige i fremgangsmåtene av proteiner som representerer funksjonelt ekvivalente genprodukter. Et slikt ekvivalent erythropoietingenprodukt inkluderer mutante erythropoietiner som kan inneholde delesjoner, som inkluderer indre delesjoner, tilføyelser som inkluderer tilføyelser som gir fusjonsproteiner eller konservative substitusjoner av aminosyrerester i og/eller nærliggende til aminosyresekvensen, men som resulterer i en "stille" endring, ved at endringen produserer et funksjonelt, ekvivalent erythropoietin. Slike aminosyresubstitusjoner kan gjøres på basis av polaritetslikhet, ladning, oppløselighet, hydrofobisitet, hydrofilisitet og/eller den amfipatiske natur av restene involvert. Ikkepolare (hydrofobe) aminosyrer inkluderer for eksempel alanin, leusin, isoleusin, valin, prolin, fenylalanin, tryptofan og metionin; polare, nøytrale aminosyrer inkluderer glysin, serin, treonin, cystein, tyrosin, asparagin og glutamin; positivt ladete (basiske) aminosyrer inkluderer arginin, lysin, og histidin; og negativt ladete (sure) aminosyrer inkluderer asparginsyre og glutaminsyre. Alternativt kan ikke-konservative aminosyreendringer og større innsettinger og delesjoner benyttes for å skape funksjonelt endrete erythropoietinmutanter. Slike mutanter benyttes for å endre erythropoietinegenskaper på ønsket måte. I en utførelsesform kan for eksempel et erythropoietin nyttig for foreliggende oppfinnelses utførelse være et mutert erythropoietin, endret i en eller flere aminosyrer innenfor de fire funksjonelle doméner av erythropoietin som påvirker reseptorbinding: VLQRY og/eller TKVNFYAW

og/eller SGLRSLTTL og/eller SNFLRG. I en annen utførelsesform kan det anvendes erytropoietiner inneholdende mutasjoner i nærliggende områder av molekylet som påvirker kinetikk eller reseptorbindingsegenskaper av molekylet.

Betegnelsen "erytropoietin", så vel som "et erytropoietin" anvendes vekslende eller nær forbundet, og de ulike analoger, fragmenter, hybridmolekyler, agonister, muteiner og andre former, som beskrevet ovenfor, omfatter variantene i utstrekningene av og setene av glykosylering av erytropoietin, som inkluderer naturlig, deglykosylert, asialylert og andre delvis glykosylerte former av erytropoietin. Slike varianter er beskrevet i Tsuda *et al.*, 1990, *Eur. J. Biochem.*, 188:405-411. Bakterier, gjær, insekt, plante, pattedyr, inkludert menneske. I tillegg kan et stort utvalg av vertssystemer anvendes for ekspresjon og produksjon av rekombinant erytropoietin, som inkluderer, men ikke begrenset til, bakterier, gjær, insekt, planter og pattedyr, som inkluderer humane celledsystemer. Rekombinant erytropoietin produsert i bakterier, som ikke glykosylerer eller sialerer produktet, kan for eksempel kan anvendes for produksjon av ikke-glykosylerte former av erytropoietin. Alternativt kan rekombinant erytropoietin produseres i andre systemer som glykosylerer, for eksempel planter inkludert humane celler.

Som nevnt ovenfor kan hvilke som helst og alle erytropoietinreseptoraktivitetsmodulatormolekyler i stand til å utøve positiv aktivitet på erytropoietinresponsive celler, uansett molekylets strukturelle slektskap med erytropoietin anvendes.

I tillegg kan erytropoietin i seg selv modifiseres for å skreddersy dets aktiviteter for et spesifikt- eller spesifikke vev. Flere strategier som kan utføres for oppnåelse av den ønskete vevsspesifisitet, inkluderer modifikasjoner som forkorter sirkulasjonshalveringstiden og dermed reduserer tiden erytropoietinet kan interagere med erytroidforløpere eller modifikasjon av primærstrukturen av erytropoietinmolekylet. En måte å redusere sirkulasjonshalveringstiden på, er å fjerne eller modifisere glykosyleringshalvdelene der erytropoietin har tre N-forbundne og O-forbundet. Slike varianter av glykosylert erytropoietin kan produseres mange måter. For eksempel kan sialinsyrene som avslutter sukkerkjedene fjernes ved spesifikke sialidaser avhengig av den kjemiske binding som forbinder sialinsyren til sukkerkjeden. Alternativt kan den glykosylerte strukturen brytes ned på ulike måter ved anvendelse av andre enzymer som kløyver ved spesifikke bindinger. Teknikker som modifiserer primærstrukturen er mangfoldige og inkluderer substitusjon av spesifikke aminosyrer, kjemisk modifikasjon av aminosyrer eller tilførsel av andre strukturer som interfererer med interaksjonen av erytropoietin med enhver av dens reseptorer. Anvendelse av slike former av erytropoietin er fullstendig omfattet heri. I en foretrukket utførelsesform er

halveringstiden for det ikke-erytropoietiske erytropoietin av oppfinnelsen redusert med omkring 90% fra det naturlige erytropoietin.

Noen av disse molekylene vil ikke desto mindre etterlikne virkningene av erytropoietin i seg selv i andre vev eller organer. For eksempel er en 17-mer som inneholder aminosyresekvensen av 31-47 til naturlig erytropoietin inaktiv for erytropoiese, men fullstendig aktiv for neurale celler *in vitro* (Campana & O'Brien, 1998: Int. J. Mol. Med. 1:235-41).

Dessuten kan deriverte erytropoietinmolekyler som er ønskelig for anvendelsene beskrevet her, genereres ved guanidinerings, amidinerings, karbamylering (karbamylering), trinitrofenylering, acetylering, suksinilering, nitrering eller modifikasjon av arginin, lysin, tyrosin, tryptofan eller cysteinrester eller karboksylgrupper, blant andre prosedyrer, slik som begrenset proteolyse, fjerning av aminogruupper og/eller mutasjonssubstitusjon av arginin, lysin, tyrosin, tryptofan eller cysteinrester ved molekylærbiologiske teknikker for produksjon av erytropoietiner som opprettholder et tilstrekkelig nivå av aktiviteter for spesifikke organer og vev, men ikke for andre, slik som erytrocytter (for eksempel (Satake *et al.*; 1990, *Biochim. Biophys. Acta* 1038:125-9;). Et ikke-begrensende eksempel som beskrevet nedenfor, er modifikasjonen av erytropoietin argininrester ved reaksjon med et glyksal slik som fenyglyksal (i henhold til protokollen av Takahashi, 1977, *J. Biochem.* 81:395-402). Som det sees nedenfor beholder et erytropoietinmolekyl sin neurotrofiske effekt fullstendig. Slike erytropoietinmolekyler er fullstendig omfattet for de ulike anvendelsene og sammensetningene beskrevet heri.

Syntetiske og rekombinante molekyler, slik som hjerneerytropoietin og renalt erytropoietin, rekombinante pattedyrsformer av erytropoietin, så vel som de naturlig forekommende tumorderiverte og rekombinante isoformer, slik som rekombinant uttrykte molekyler, og de preparert ved homolog rekombinasjon, er tilveiebrakt heri. Dessuten kan molekyler som inkluderer peptider som binder til erytropoietinreseptoren, så vel som rekombinante konstruksjoner eller andre molekyler som har delvis eller alle av de strukturelle og/eller biologiske egenskapene av erytropoietin, som inkluderer fragmenter og multimerer av erytropoietin eller dets fragmenter anvendes. Erytropoietin omfatter her molekyler med endrete erytropoietinreseptorbindingsaktiviteter, fortrinnsvis med øket reseptoraffinitet, nærmere bestemt som angår forsterket transport over endotelcellebarrierene. Muteiner som omfatter molekyler som har ytterligere eller redusert antall av glykosylerings seter er inkludert heri. Som beskrevet ovenfor er betegnelsene "erytropoietin" og "etterliknere" så vel som andre betegnelser vekslende benyttet heri for å referere til de erytropoietinresponsive cellebeskyttende og styrkende molekyler relatert til erytropoietin så vel som de molekylene i

stand til å krysse endotelcellebarrierer. Molekyler produsert ved transgene dyr er dessuten også omfattet heri. Det bør bemerkes at erythropoietinmolekyler som er omfattet heri, ikke nødvendigvis likner erythropoietin strukturelt eller på annen måte, med unntak av evnen til å interagere med erythropoietinreseptoren, modulere erythropoietinreseptoraktivitet eller aktivere erythropoietinaktiverende signaliseringskaskader, slik det er beskrevet heri.

Eksempler inkluderer former av erythropoietin, nyttige for praktisering av den foreliggende oppfinnelse, erythropoietiner slik som dem med endrete aminosyrer ved den karboksyterminale ende, beskrevet i U.S. patentene 5 457 089 og 4 835 260; asialoerythropoietin og erythropoietinisoformer med ulike antall av sialinsyrerester pr. molekyl, som beskrevet i U.S. patent 5 856 298; polypeptider beskrevet i U.S. patent 4 703 008; agonister beskrevet i U.S. patent 5 767 078; peptider som binder til erythropoietinreseptoren som beskrevet i U.S. patenter 5 773 569 og 5 830 851; små molekyletterliknere som aktiverer erythropoietinreseptoren som beskrevet i U.S. patent 5 835 382; og erythropoietinanaloger beskrevet i WO 95/05465, WO 97/18318 og WO 98/181926.

Erythropoietin kan oppnås kommersielt, for eksempel under varemerkene "PROCRT", tilgjengelig fra Ortho Biotech Inc., Raritan, NJ, og "EPOGEN", tilgjengelig fra Amgen, Inc., Thousand Oaks, CA.

Aktiviteten (i enheter) av erythropoietin (erythropoietin) og erythropoietinliknende molekyler er tradisjonelt definert basert på dets effektivitet i stimulering av rød blodcelleproduksjon i gnagermodeller (og som derivert ved internasjonale standarder av erythropoietin). En enhet (U) av alminnelig erythropoietin (MW av ~ 34000) er ~ 8 ng protein (1 mg protein er omtrentlig 125 000 U). Ettersom effekten av erythropoiese er tilfeldig for de ønskete aktivitetene heri og ikke nødvendigvis er en påvisbar egenskap for enkelte av erythropoietinene, er imidlertid definisjonen av aktivitet basert på erythropoietisk aktivitet ikke hensiktsmessig. Som anvendt heri er derfor aktivitetsenheten av erythropoietin eller erythropoietinrelaterte molekyler definert som mengden protein nødvendig for å fremkalle den samme aktivitet i neuronale eller andre erythropoietinresponsive cellulære systemer som er fremkalt ved WHO internasjonal standard erythropoietin i det samme systemet. Den øvete forskeren vil enkelt bestemme enhetene av et ikke-erythropoietisk erythropoietin eller relatert molekyl ved å følge veiledningen heri.

I fortsettelsen av de ovenfor nevnte erythropoietinmodifikasjonene som er nyttige her, går den etterfølgende diskusjonen inn på de ulike erythropoietiner.

Et erythropoietin ifølge oppfinnelsen, kan ha minst ingen sialinsyrerester, referert til som asialoerythropoietin. Fortrinnsvis er et erythropoietin ifølge oppfinnelsen humant asialoerythropoietin. I alternative utførelsesformer kan erythropoietinet ifølge oppfinnelsen ha minst 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 eller 13 sialinsyrerester. Det kan prepareres ved desialylering av erythropoietin ved anvendelse av en sialidase, slik som beskrevet i produsentens innpakning for Sialydase A fra ProZyme Inc., San Leandro, California. Vanligvis er "PROZYME" "GLYCOPRO" sekvenseringsgrad "SIALYDASE A" (N-acetylneuraminat glycohydrolase, E. coli 3.2.1.18) anvendt for spalting av alle ikke-reduserende terminale sialinsyrerester fra komplekse karbohydrater og glykoproteiner slik som erythropoietin. Det vil så spalte forgrenete sialinsyrer (forbundet til en intern rest). Sialydase A er isolert fra en klon av *Arthrobacter ureafaciens*.

Et erythropoietin kan ha minst et redusert antall av N-forbundne karbohydrater. For å fjerne N-forbundne karbohydrater kan erythropoietin behandles med hydrazin, i overensstemmelse med for eksempel fremgangsmåtene beskrevet av Hermentin et al., 1996, Glycobiology 6(2):217-30. Som beskrevet ovenfor har erythropoietin tre N-forbundne karbohydrater; den foreliggende oppfinnelsen omfatter de erythropoietinene med to, en eller ingen N-forbundne karbohydrater.

Et erythropoietin kan ha minst et redusert karbohydratinnhold i kraft av behandling av naturlig erythropoietin med minst én glykosidase. For eksempel kan prosedyren til Chen og Evangelista, 1998, Electrophoresis 19(15):2639-44 følges. Videre kan fjerning av O-forbundne karbohydratet utføres ved å følge fremgangsmåtene beskrevet i Hokke *et al.*, 1995, Eur. J. Biochem. 228(3):981-1008.

Karbohydratdelen av et erythropoietinmolekyl kan ha minst et ikke-mammalsk glykosyleringsmønster i kraft av ekspresjonen av et rekombinant erythropoietin i ikke-mammalske celler. Fortrinnsvis er erythropoietinene uttrykt i insekt- eller planteceller. Ved et eksempel kan ekspresjon av erythropoietin i insektceller ved anvendelse av et baculovirus-ekspresjonssystem, utføres i henhold til Quelle *et al.*, 1989, Blood 74(2):652-657. En annen fremgangsmåte er beskrevet i U.S. patent 5 637 477. Ekspresjon i et plantesystem kan utføres i henhold til fremgangsmåten til Matsumoto *et al.*, 1993, Biosci. Biotech. Biochem. 57(8):1249-1252. Alternativt vil ekspresjon i bakterier resultere i ikke-glykosylerte former av erythropoietin. Disse er bare eksempler på fremgangsmåter som er nyttig for produksjon av et erythropoietin ifølge oppfinnelsen.

Et erythropoietin ifølge oppfinnelsen kan ha minst ett eller flere oksiderte karbohydrater som også kan være reduserte. For eksempel kan erythropoietinet være periodat-oksidert

erythropoietin; det periodat-oksiderte erythropoietin kan også reduseres kjemisk med et borhydridsalt, slik som natriumborhydrid eller natriumcyanoborhydrid. Periodatoksidering av erythropoietin kan utføres ved for eksempel fremgangsmåtene beskrevet av Linsley *et al.*, 1994, *Anal. Biochem.* 219(2):207-17. Kjemisk reduksjon etterfølgende periodatoksidering kan utføres ved å følge fremgangsmåtene til Tonelli og Meints, 1978, *J. Supramol. Struct.* 8(1):67-78.

Et erythropoietin for de tidligere nevnte anvendelser kan ha minst én eller flere modifiserte argininrester. For eksempel kan det modifiserte erythropoietin omfatte en R-glyoksalsammensetning på det ene eller flere argininrester, hvor R kan være en aryl, heteroaryl, lavere alkyl, lavere alkoksy eller sykloalkylgruppe, eller en alfa-deoksyglycidylgruppe. Som benyttet heri, betyr betegnelsen lavere "alkyl" en rett eller forgrenet kjede, mettet alifatisk hydrokarbongruppe som fortrinnsvis inneholder 1-6 karbonatomer. Representative for slike grupper er metyl, etyl, isopropyl, isobutyl, butyl, pentyl, heksyl og liknende. Betegnelsen "alkoksy" betyr en lavere alkylgruppe som definert ovenfor, festet til resten av molekylet ved oksygen. Eksempler på alkoksy inkluderer metoksy, etoksy, propoksy, isopropoksy og liknende. Betegnelsen "sykloalkyl" refererer til sykliske alkylgrupper med 3 opptil omkring 8 karbonatomer, som inkluderer for eksempel syklopropyl, syklobutyl, sykloheksyl og liknende. Betegnelsen aryl referer til fenyl- og naftylgrupper. Betegnelsen heteroaryl referer til heterosykliske grupper som inneholder 4-10 ringmedlemmer og 1-3 heteroatomer valgt fra gruppen bestående av oksygen, nitrogen og svovel. Eksempler omfatter isoksaly, fenylisoksazoly, furyl, pyrimidinyl, kinolyl, tetrahydrokinolyl, pyridyl, imidazolyl, pyrrolidinyl, 1,2,4-triazolyl, tiazolyl, tienyl og liknende. R-gruppen kan være substituert, som for eksempel 4-trihydroksybutylgruppen av 3-deoksyglukoson. Typiske eksempler på R-glyoksalsammensetninger er glyoksal, metylglyoksal, 3-deoksyglukoson og fenylglyoksal. Foretrukne R-glyoksalsammensetninger er metylglyoksal eller fenylglyoksal. En eksemplarisk fremgangsmåte for slik modifikasjon kan finnes i Werber *et al.*, 1975, *Isr. J. Med. Sci.* 11(11):1169-70, ved anvendelse av fenylglyoksal.

I et ytterligere eksempel kan minst én argininrest modifiseres ved reaksjon med et tilstøtende diketon, slik som 2,3-butandion eller sykloheksandion, fortrinnsvis i omkring 50 millimolar boratbuffer med pH 8-9. En prosedyre for den sistnevnte modifikasjon med 2,3-butandion kan utføres i henhold til Riordan, 1973, *Biochemistry* 12(20):3915-3923; og den med sykloheksanon i henhold til Pathy *et al.*, 1975, *J. Biol. Chem.* 250(2):565-9.

Et erythropoietin . kan omfatte minst én eller flere modifiserte lysinrester eller en modifikasjon av den N-terminale aminogruppen av erythropoietinmolekylet, slike modifikasjoner er de som resulterer fra reaksjon av lysinresten med et aminogruppemodifiserende middel. I en annen utførelsesform kan lysinrester modifiseres ved reaksjon med glyoksalderivater, slik som

reaksjon med glyoksal, metylglyoksal og 3-deoksyglukoson for å danne alfa-karboksyalkylderivater. Eksempler er reaksjon med glyoksal for å danne karboksymetyllysin som i Glomb og Monnier. 1995, J. Biol. Chem. 270(17):10017-26, eller med metylglyoksal for å danne (1-karboksyetyl)lysin som i Degenhart *et al.*, 1998, Cell. Mol. Biol. (Noisy-le-grand) 44(7):1139-45. Den modifiserte lysinresten kan ytterligere reduseres kjemisk. For eksempel kan erythropoietin biotinyleres via lysingrunder, slik som i henhold til fremgangsmåten beskrevet i eksempel 5, hvor D-biotinyl-ε-aminokaproinsyre-N-hydroksysuksinimidester ble reagert med erythropoietin, etterfulgt av fjerning av ureagert biotin ved gelfiltrering på en Centricon-10-kolonne, som beskrevet i Wojchowski og Caslake, 1989, Blood 74(3):952-8. I denne presentasjonen benytter forfatterne tre ulike fremgangsmåter for å biotinylere erythropoietin, der enhver av dem kan benyttes for preparering av erythropoietinene for anvendelse heri. Biotin kan tilsettes til (1) sialinsyrehalvdelen (2) karboksylatgruppene eller (3) aminogruppene.

Lysinet kan reagere med et aldehyd eller et reduserende sukker for dannelsen av et imin, som kan stabiliseres ved reaksjon som med natrium cyanoborhydrid for å danne et N-alkylert lysin, slik som glukitolyllysin, eller som i tilfelle av reduserende sukker kan stabiliseres ved Amadori eller Heyns omgruppering for å danne et alfa-deoksy-alfa-aminosukker slik som alfa-deoksy-alfa-fruktosyllysin. Som et eksempel er preparering av et fruktosyllysinmodifisert protein ved inkubasjon med 0,5 M glukose i natriumfosfatbuffer med pH 7,4 i 60 dager beskrevet av Makita *et al.*, 1992, J. Biol. Chem. 267:5133-5138. I et annet eksempel kan lysingruppen karbamyleres, slik som i kraft av reaksjon med cyanat-ion eller alkyl- eller arylkarbamylert eller -tiokarbamylert med et alkyl- eller aryl-isocyanat eller -isotiocyanat eller den kan acyleres ved et reaktivt alkyl- eller arylkarboksylsyrederivat, slik som ved reaksjon med eddiksyreanhydrid eller ravsyreanhydrid eller ftalsyreanhydrid. Modifikasjon av lysingrunder med 4-sulfofenylisotiocyanat eller med eddiksyreanhydrid er eksemplariske, begge er beskrevet i Gao *et al.*, 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 91(25):12027-30. Lysingrunder kan også trinitrofenylmodifiseres ved reaksjon med trinitrobenzensulfonsyre eller fortrinnsvis med dets salter. Slike fremgangsmåter er beskrevet nedenfor i eksempel 5.

Minst én tyrosinrest av erythropoietin kan modifiseres i en aromatisk posisjon ved en elektrofil reagens, slik som ved nitrering eller jodering. Ved anvendelse av ikke-begrensede eksempler, kan erythropoietin reageres med tetranitrometan (Nestler *et al.*, 1985, J. Biol. Chem. 260(12):7316-21); eller jodert som beskrevet i eksempel 5.

Minst en asparginsyre- eller en glutaminsyrerest av et erythropoietin kan modifiseres, slik som ved reaksjon med karbodiimid fulgt av reaksjon med et amin slik som, men ikke begrenset til glysinamid. Eksempler på slike modifiseringer beskrives i eksempel 5.

I et annet eksempel kan en tryptofanrest av et erythropoietin modifiseres, slik som ved reaksjon med N-bromsuksinimid eller N-klorosuksinimid ved å følge fremgangsmåten slik som beskrevet i Josse *et al.*, Chem. Biol. Interact., 1999 Mai 14; 119-120.

I enda et annet eksempel kan et erythropoietinmolekyl prepareres ved fjerning av minst én aminogruppe, som kan oppnås ved reaksjon med ninhydrid fulgt av reduksjon av den påfølgende karbonylgruppe ved reaksjon med borhydrid.

I enda et ytterligere eksempel er et erythropoietin tilveiebrakt som har minst en åpning av én cysteinforbindelse i erythropoietinmolekylet ved reaksjon med et reduserende middel, slik som ditiotreitol, fulgt av reaksjon av de påfølgende sulfhydrylene med jodacetamin, jodeddiksyre eller en annen elektrofil for å hindre gjendannelse av disulfidbindingene.

Et erythropoietin er tilveiebrakt som har minst én substitusjon av hvilke som helst av et antall aminosyrer, slik som leusin med minst én av lysin-, arginin-, tryptofan-, tyrosin- eller cysteinrester av erythropoietin ved anvendelse av molekylærbiologiske teknikker.

Et modifisert erythropoietin prepareres ved å utsette et erythropoietin for en begrenset kjemisk proteolyse som er målrettet mot spesifikke rester, for eksempel ved å kløve etter tryptofanrester. Slike resulterende erythropoietinfragmenter er omfattet heri.

Som bemerket ovenfor kan et erythropoietin nyttig for formålet heri, ha minst én av de tidligere nevnte modifiseringene, men kan ha mer enn én av modifikasjonene ovenfor. Ved eksempel av et modifisert erythropoietin med en modifikasjon ved karbohydratdelen av molekylet og en modifikasjon ved aminosyredelen, kan et modifisert erythropoietin være asialoerythropoietin og ha sine lysinrester biotinylert eller karbamylert.

Ulike erythropoietinmolekyler og farmasøytiske sammensetninger som inneholder dem for anvendelsene beskrevet heri er således mulig. Slike erythropoietinmolekyler inkluderer, men er ikke begrenset til asialoerythropoietin, N-deglykosylert erythropoietin, O-deglykosylert erythropoietin, erythropoietin med redusert karbohydratinnhold, erythropoietin med endrete glykosyleringsmønstre, erythropoietin med karbohydrater oksidert, så redusert, arylglyoksalmønstre modifisert erythropoietin, alkylglyoksalmønstre modifisert erythropoietin, 2,3-butandionmodifisert erythropoietin, sykloheksandionmodifisert erythropoietin, biotinylert erythropoietin, N-alkylert lysyl-erythropoietin, glusitolyllysine-erythropoietin, alfa-deoksy-alfa-

fruktosyllysin-erythropoietin, karbamylert erythropoietin, acetylert erythropoietin, suksinylert erythropoietin, alfa-karboksy-alkyl erythropoietin, nitrert erythropoietin, jodert erythropoietin, for å nevne noen representative, dog ikke-begrensede eksempler basert på lærdommen heri. Best egnet er de ovenfor nevnte modifiserte former basert på humant erythropoietin.

Enkelte av de tidligere nevnte erythropoietinene er dessuten nye, og oppfinnelsen er rettet mot slike forbindelser, så vel som anvendelse for fremstilling av farmasøytiske sammensetninger som disse omfattes av. Ved å benytte ikke-begrensede eksempler inkluderer slike nye erythropoietiner periodatoksidert erythropoietin, glusitollyllysine erythropoietin, fruktosyllysin erythropoietin, 3-deoksyglukoson erythropoietin og karbamylert asialoerythropoietin.

Et utvalg av vertekspresjonsvektorsystemer kan benyttes for produksjon av erythropoietinene og de erythropoietinrelaterte molekylene .. Slike vertekspresjonssystemer representerer hjelpemidler der erythropoietinene av interesse kan produseres og deretter renses, men representerer også celler som kan, når de er transformert eller transfektert med de hensiktsmessige nukleotidkodende sekvensene, oppnå det modifiserte erythropoietinproduktet *in situ*. Disse inkluderer, men er ikke begrenset til, bakterier, insekt, plante, pattedyr, inkludert humane vertssystemer, slik som, men ikke begrenset til, insektcellesystemer infisert med rekombinante virusekspresjonsvektorer (for eksempel bakulovirus) inneholdende de modifiserte erythropoietinproduktene som koder sekvensene; plantecellesystemer infisert med rekombinante virusekspresjonsvektorer (for eksempel blomkålmosaikkvirus, CaMV; tobakkmosaikkvirus, TMV) eller transformert med rekombinante plasmidekspresjonsvektorer (for eksempel Ti-plasmid) inneholdende erythropoietinrelaterte molekyilkodende sekvenser; eller pattedyrcellesystemer som inkluderer humane cellesystemer (for eksempel HT1080, COS, CHO, BHK, 293, 3T3) inneholdende rekombinante ekspresjonskonstruksjoner inneholdende promotere utledet fra pattedyrgenomets celler (for eksempel metallotionein promotor) eller fra pattedyrvirus (for eksempel adenovirus sen promotor; vacciniavirus 7.5K-promotor).

I tillegg kan en vertscellestamme velges som modulerer ekspresjonen av de innsatte sekvenser, eller modifiserer og prosesserer genproduktet på den spesifikke måten ønsket. Slike modifikasjoner (for eksempel glykocylering) og prosessering (for eksempel kløyving) av proteinprodukter kan være viktig for proteinets funksjon. Mulige vertsceller har karakteristika og spesifikke mekanismer for den post-translasjonelle prosessering og modifikasjon av proteiner og genprodukter. Hensiktsmessige cellelinjer eller vertssystemer kan velges for å sikre den korrekte modifikasjonen og prosesseringen av det fremmede proteinet som er uttrykt. I dette henseende kan eukaryote vertsceller med det cellulære maskineri for korrekt prosessering av det primære transkript, glykocylering og fosforylering

av genproduktet bli benyttet. Slike pattedyrvertsceller som inkluderer humane vertsceller, inkluderer, men er ikke begrenset til, HT1080, CHO, VERO, BHK, HeLa, COS, MDCK, 293, 3T3 og WI38.

For langtids høyutbytteproduksjon av rekombinante proteiner er stabil ekspresjon foretrukket. For eksempel kan cellelinjer som stabilt uttrykker det erytropoietinrelaterte molekyngenproduktet konstrueres. I stedet for anvendelse av ekspresjonsvektorer inneholdende viral opprinnelse for replikasjon, kan celler transformeres med DNA, kontrollert ved hensiktsmessige ekspresjonskontrollelementer (for eksempel promoter, enhancer, sekvenser, transkripsjonsterminatorer, polyadenyleringsseter, osv.) og en valgbar markør. Etter infeksjon av det fremmede DNA, kan konstruerte celler tillates å vokse i 1-2 dager i et anrikt medium, og skiftes så til et selektivt medium. Den selekterbare markøren i det rekombinante plasmid konfererer resistens for utvelgelsen og tillater celler stabilt å integrere plasmidet i deres kromosomer og vokser for å danne foci som videre kan klones og ekspandere inn i cellelinjer. Denne fremgangsmåte kan fordelaktig benyttes for konstruksjon av cellelinjer som uttrykker det erytropoietinrelaterte molekyngenproduktet. Slike konstruerte cellelinjer er spesielt nyttige i screening og evaluering av forbindelser som påvirker den endogene aktivitet av det erytropoietinrelaterte molekyngenproduktet.

Alternativt kan ekspresjonskarakteristikken av et endogent erytropoietin-gen i en cellelinje eller mikroorganisme modifiseres ved innsetting av et heterologt DNA-regulerende element i en stabil cellelinjes genom eller en klonet mikroorganisme slik at det innsatte regulatoriske elementet er operativt forbundet med det endogene erytropoietin-genet. For eksempel kan et endogent erytropoietin-gen som normalt er "transkripsjonelt stille", dvs. et erytropoietin-gen som normalt ikke er uttrykt, eller som bare uttrykkes i svært lave nivå i en cellelinje, aktiveres ved innsetting av et regulatorisk element i stand til å fremme ekspresjon av et normalt uttrykt genprodukt i den cellelinjen eller mikroorganismen. Alternativt kan et transkripsjonelt stille, endogent erytropoietin aktiveres ved innsetting av et promiskuøst regulatorisk element som fungerer på tvers av celletyper.

Et heterologt, regulatorisk element kan innsettes i en stabil cellelinje eller i en klonet mikroorganisme, slik at det er operativt forbundet med et endogent erytropoietin-gen ved anvendelse av teknikker slik som målrettet, homolog rekombinasjon, som er velkjent for dem med dyktighet innen faget, og beskrevet for eksempel i fransk patent 2 646 438 til Pasteurinstituttet; U.S. patent 4 215 051 til Chappel; U.S. patent 5 578 461 til Sherwin *et al.*; Internasjonal søknad PCT/US92/09627 (WO 93/09222) ved Selden *et al.*; og Internasjonal søknad PCT/US90/06436 (WO 91/06667) ved Skoultchi *et al.*.

Erythropoietinrelatert molekyl som delvis mangler sialrester, eller fullstendig mangler sialrester kan produseres i pattedyrceller, inkludert en human celle. Slike celler kan konstrueres som mangelfulle i, eller mangle enzymene som tilfører sialinsyre, dvs. β -galaktosidase α 2,3 sialyltransferase (" α 2,3 sialyltransferase") og β -galaktosidase α 2,6 sialyltransferase (" α 2,6 sialyltransferase") aktivitet. En pattedyrcelle som kan anvendes er et av eller begge α 2,3 sialyltransferasegenet og/eller α 2,6 sialyltransferasegenet er fjernet. Slike delesjoner kan konstrueres ved anvendelse av gen-knockout-teknikker velkjent innen fagfeltet. I en annen utførelsesform er dihydrofolatreduktase (DHFR) mangelfulle Chinese Hamster Ovary (CHO)-celler anvendt som vertscellen for produksjon av rekombinante erythropoietinrelaterte molekyler. CHO-celler uttrykker ikke α -2,6-enzymet sialyltransferase og tilfører derfor ikke sialinsyre i 2,6 forbindelsen til N-forbundne oligosakkarider av glykoproteiner produsert i disse cellene. Som et resultat mangler rekombinante proteiner produsert i CHO-celler sialinsyre i 2,6 forbindelsen til galaktose (Sasaki *et al.* (1987; Takeuchi *et al.* supra; Mutsaer *et al.* Eur. J. Biochem. 156, 651 (1986); Takeuchi *et al.* J. Chromatogr. 400, 207 (1987)). I en utførelsesform for produksjon av en vertscelle for produksjon av asialoerythropoietin, er genet som koder for α -2,3-sialyltransferase i CHO-celler fjernet. Slike α -2,3-sialyltransferase knockout-CHO-celler mangler fullstendig sialyltransferaseaktivitet, og som et resultat er de nyttige for den rekombinante ekspresjonen og produksjonen av asialoerythropoietin.

I en annen utførelsesform kan asialoerythropoietinet produseres ved interferering med sialinsyretransport til golgi-apparatet for eksempel, (Eckhart *et al.*, 1998, J. Biol. Chem. 273:20189-95). Ved anvendelse av fremgangsmåter velkjent for dem øvet innen fagfeltet (for eksempel Oelmann *et al.*, J. Biol. Chem. 276:26291-300), kan mutagenese av nukleotidsukkeret CMP-sialinsyre transportøren gjennomføres for produksjon av mutanter av Chinese Hamster Ovarie-celler. Disse cellene kan ikke tilføre sialinsyrerester til glykoproteiner slik som erythropoietin, og produserer bare asialoerythropoietin. Transfekterte pattedyrceller som produserer erythropoietin produserer også cytosolisk sialidase som om den lekker ut i dyrkingsmediet degraderer asialoerythropoietin med høy effektivitet (for eksempel Gramer *et al.*, 1995, Biotechnology 13:692-698). Ved anvendelse av fremgangsmåter velkjent for dem kunnskap innen fagfeltet (for eksempel fra informasjon tilveiebrakt i Ferrari *et al.*, 1994, Glycobiology 4:367-373), kan cellelinjer transfekteres, muteres eller på annen måte drives til konstitutiv produksjon av sialidase. På denne måte kan asialoerythropoietin produseres under fremstilling av asialoerythropoietin.

En farmasøytisk sammensetning, som beskrevet ovenfor inneholdende et erythropoietin, administreres til et pattedyr på en hvilken som helst måte, som tilveiebringer et tilstrekkelig nivå av et erythropoietin i vaskulaturen for å tillate translokasjon over en endotelcellebarriere

og ha gunstige effekter på erythropoietinresponsive celler. Når den benyttes for formålet å perfusere et vev eller et organ, er liknende resultater ønskelige. I tilfellet hvor erythropoietinet er benyttet for *ex vivo* perfusjon, kan erythropoietinet være enhver form av erythropoietin, slik som de tidligere nevnte erythropoietinene, men ikke begrenset til disse, og kan inkludere naturlige erythropoietiner som inkluderer humant erythropoietin. I tilfellet hvor cellene eller vevet er ikke-vaskularisert og/eller administrasjonen er ved bading av cellene eller vevet med sammensetningen av oppfinnelsen, tilveiebringer den farmasøytiske sammensetningen en effektiv erythropoietinresponsiv cellefordelaktig mengde av et erythropoietin.

Endotelcellebarrierene som et erythropoietin kan translokere over, inkluderer tette forbindelser, perforerte forbindelser, forbindelser med små vinduer og hvilke som helst andre typer av endotelbarrierer tilstede i et pattedyr. En barriere kan være en endotelcelletett forbindelse. De tidligere nevnte erythropoietinene er nyttige generelt for den terapeutiske eller profylaktiske behandlingen av humane sykdommer i sentralnervesystemet eller det perifere nervesystemet som primært har nevrologiske eller psykiatriske symptomer, øyesykdommer, kardiovaskulære sykdommer, kardiopulmonare sykdommer, respiratoriske sykdommer, nyre, urinveis- og reproduktive sykdommer, gastrointestinale sykdommer og endokrine og metabolske abnormiteter. Nærmere bestemt inkluderer slike tilstander og sykdommer hypoksiske tilstander, som ugunstig påvirker excitable vev, slik som excitable vev i sentralnervesystemvev, perifert nervesystemvev, hjertevev eller retinalt vev slik som for eksempel hjerne, hjerte eller retina/øye. Derfor kan oppfinnelsen benyttes for behandling av eller hindre skade på excitable vev som resulterer fra hypoksiske tilstander i et utvalg av tilstander og omstendigheter. Ikke-begrensede eksempler på slike tilstander og omstendigheter er tilveiebrakt i tabellen nedenfor.

Eksemplet for beskyttelse av nervevevpatologier som kan behandles, inkluderer slike patologier, de som resulterer fra redusert oksygenering av nervevev. Enhver tilstand som reduserer tilgjengeligheten av oksygen til nervevev, som resulterer i stress, skade og tilslutt nervecelledød, kan behandles ved fremgangsmåtene som beskrevet heri. Generelt referert til som hypoksi og/eller ischæmi, oppstår disse tilstandene ifra eller inkluderer, men er ikke begrenset til, slag, vaskulær okklusjon, prenatalt eller postnatalt oksygentap, pustebesvær, kvelning, nær drukning, karbonmonoksidforgiftning, røykinhalasjon, traume som inkluderer kirurgi og radioterapi, asfyksi, epilepsi, hypoglykemi, kronisk obstruktiv pulmonar sykdom, emfysem, respiratorisk lidelsessyndrom hos voksne, hypotensivt sjokk, septisk sjokk, anafylaktisk sjokk, insulinsjokk, sigdcelleanemi, hjertestans, dysrytmi, nitrogennarkose og nevrologiske mangler forårsaket av hjerte-lunge-bypass-prosedyrer.

I en utførelsesform kan for eksempel de spesifikke EPO-sammensetningene administreres for å hindre skade eller vevsødeleggelse som resulterer fra risiko for skade eller vevsødeleggelse

under kirurgiske prosedyrer, slik som for eksempel tumorreseksjon eller aneurismereparasjon. Andre patologier forårsaket av eller som resulterer fra hypoglykemi som kan behandles ved fremgangsmåtene beskrevet heri, inkluderer insulinoverdose, også referert til som iatrogen hyperinsulinemi, insulinom, veksthormonmangler, hypokortisolisme, legemiddeloverdose og enkelte tumorer.

Andre patologier som resulterer fra eksitabel nervevevsskade, inkluderer anfallssykdommer, slik som epilepsi, krampetrekninger eller kroniske anfallssykdommer. Andre tilstander og sykdommer som kan behandles inkluderer sykdommer som slag, multippel sklerose, lavt blodtrykk, hjertestans, Alzheimers sykdom, Parkinson's sykdom, cerebral parese, hjerne- eller ryggmargstraume, AIDS-demens, aldersrelatert tap av kognitiv funksjon, hukommelsestap, amyotrofisk lateral sklerose, anfallssykdommer, alkoholisme, retinal ischemi, optisk nerveødeleggelse som resulterer fra glaukom og nervetap.

Det er mulig å behandle tilstander av, og ødeleggelse på retinalt vev. Slike forstyrrelser inkluderer, retinal ischemi, makulær degenerering, retinal avsondring, retinitis pigmentosa, aterosklerotisk retinopati, hypertensiv retinopati, retinal arterieblokkering, retinal veneblokkering, hypotensjon og diabetisk retinopati.

Videre er det mulig å beskytte eller behandle skade som er resultat fra strålingsødeleggelse på excitable vev. Eller behandling av neurotoksinforgiftning, slik som domoinsyre skalldyrforgiftning, neurolatyrisme og Guam sykdom, amyotrofisk lateral sklerose og Parkinson's sykdom.

Det er også mulig å styrke excitable vevsfunksjon i et pattedyr ved perifer administrasjon av et erythropoietin som beskrevet ovenfor.

Det er mulig å behandle tilstander og sykdommer rettet mot sentralnervesystemet, som for eksempel, humørforstyrrelser, angstforstyrrelser, depresjon, autisme, oppmerksomhetsmanglende hyperaktiv forstyrrelse og kognitiv dysfunksjon. Disse tilstander har som fordel at de styrker av neuronal funksjon. Andre forstyrrelser som kan behandles, inkluderer søvnforstyrrelse, for eksempel søvnapné og reiserelaterte forstyrrelser; sub arachnoid og aneurismale blødninger, hypotensivt sjokk, rystende skade, septisk sjokk, anafylaktisk sjokk og følgesykdom av ulike encefalitter og meningitter, for eksempel bindevevssykdomsrelaterte cerebriter slik som lupus. Andre anvendelser inkluderer hindring av eller beskyttelse mot forgiftning av neurotoksiner, slik som domoinsyre skalldyrforgiftning, neurolatyrisme og Guam sykdom, amyotrofisk lateral sklerose og

Parkinson's sykdom; postoperativ behandling for embolisk eller ischemisk skade; hel hjernestråling; sigdcellekrise; og eclampsi.

En ytterligere gruppe av tilstander som kan behandles inkluderer mitokondriell dysfunksjon av enten en arvelig eller av ervervet natur, som er årsak til et utvalg av neurologiske sykdommer representert ved neuronal skade og død. For eksempel er Leigh's sykdom (subakutt nekrotiserende encefalopati) karakterisert ved progressivt synstap og encefalopati, på grunn av neuronalt tap og myopati. I disse tilfeller svikter defekt mitokondriell metabolisme i å tilføre nødvendig høyt energisubstrat for å forsyne metabolismen hos excitable celler. En erythropoietinreseptoraktivitetsmodulator optimaliserer sviktende funksjon i et utvalg av mitokondrielle sykdommer. Som nevnt ovenfor har hypoksiske tilstander ugunstig innvirkning på excitable vev. De excitable vevene inkluderer, men er ikke begrenset til sentralnervesystemvev, perifert nervesystemvev og hjertevev. I tillegg til tilstandene beskrevet ovenfor er det også mulig å behandle inhaleringsforgiftning slik som av karbonmonooksid og røyk, alvorlig astma, respiratorisk lidelsessyndrom hos voksne, og kvelning og nær drukning. Ytterligere tilstander som skaper hypoksiske tilstander eller på andre måter induserer skader på excitabelt vev inkluderer hypoglykemi som kan forekomme ved uheldig dosering av insulin eller ved insulinproduserende neoplasma (insulinoma).

Ulike neurofysiologiske forstyrrelser som er antatt å stamme fra skade på excitabelt vev, kan behandles ved de umiddelbare fremgangsmåtene. Kroniske forstyrrelser hvor nerveskade er involvert og hvor behandling er tilveiebrakt, inkluderer forstyrrelser relatert til sentralnervesystemet og/eller det perifere nervesystemet som inkluderer aldersrelatert tap av kognitiv funksjon og senil demens, kroniske anfallsforstyrrelser, Alzheimers sykdom, Parkinson's sykdom, demens, hukommelsestap, amyotrofisk lateral sklerose, multippel sklerose, tuberøs sklerose, Wilson's sykdom cerebral og progressiv supranukleær palsy, Guams sykdom, Lewy body demens, prionsykdommer slik som spongiform encefalopati, for eksempel Creutzfeldt-Jakobs sykdom, Huntingtons sykdom, myotonisk dystrofi, Freidrich's ataksi og andre ataksier, så vel som Gilles de la Tourette's syndrom, anfallsforstyrrelser slik som epilepsi og kronisk anfallsforstyrrelse, slag, hjerne eller ryggmargstraume, AIDS demens, alkoholisme, autisme, retinal ischemi, glaukom, autonome funksjonsforstyrrelser, slik som høyt blodtrykk og søvnforstyrrelser og neuropsykiatriske forstyrrelser som inkluderer, men er ikke begrenset til schizofreni, schizoaffectiv forstyrrelse, oppmerksomhetsmanglende forstyrrelse, dystymisk forstyrrelse, hoveddepressiv forstyrrelse, mani, angstforstyrrelse, psykoaktiv substansbruksforstyrrelse, angst, panikk forstyrrelser så vel som unipolare og bipolare affektive forstyrrelser. Ytterligere neuropsykiatriske og neurodegenererende forstyrrelser inkluderer for eksempel de opplistet i American Psychiatric Association's Diagnostic and Statistical manual of Mental Disorders (DSM). De

rekombinante, kimære toksinmolekyler som omfatter erythropoietin kan benyttes for terapeutisk levering av toksiner for behandling av proliferative forstyrrelser, slik som cancer eller virale forstyrrelser, slik som subakutt forkalkende panencefalitt.

Den etterfølgende tabellen opplister ytterligere eksempler, ikke-begrensende indikasjoner med hensyn til de ulike tilstander og sykdommer, mottakelig for behandling ved de tidligere nevnte erythropoietinene.

Celle, vev eller organ	Dysfunksjon eller patologi	Tilstand eller sykdom	Type
Hjerte	Ischemi	Coronar arteriesykdom	Akutt, kronisk Stabil, ustabil
		Myokardialt infarkt	Dresslers syndrom
		Angina	
		Medfødt hjertesykdom	Klaffefeil Kardiomyopati
		Prinzmetal angina	
		Hjerteruptur	Aneurismatisk Septal perforering

Celle, vev eller organ	Dysfunksjon eller patologi	Tilstand eller sykdom	Type
Hjerte		Angitt	
	Arytmi	Tachy-, bradyarytmi. Supraventrikulær, ventrikulær Ledningsabnormiteter	Stabil, ustabil Hypersensitiv karotid sinus node
	Kongestiv hjertefeil	Venstre, høyre, biventrikulær	Kardiomyopater, slik som idiopatisk familiær, smittsom, metabolsk, lagringssykdom, mangler, bindevevsforstyrrelse, infiltrering og granulomer, neurovaskulær
		Myokarditt	Autoimmun, smittsom, idiopatisk
		Cor pulmonal	
	Butt og penetrerende traume		
	Toksiner	Kokain	
Vaskulært	Høyt blodtrykk	Primær, sekundær	
	Dykkersyke		
	Fibromuskulær hyperplasi		
	Aneurisme	Dissekerende, revnet,	

		forstørret	
Lunger	Obstruktiv	Astma Kronisk bronkitt Emfysem og luftveis- obstruksjon	
	Ischemisk lungetykdom	Pulmonar emboli Pulmonar trombose Fett emboli	
	Omgivelses- lungetykdom		
	Ischemisk lungetykdom	Pulmonar emboli Pulmonar trombose	
	Mellomroms- lungetykdom	Idiopatisk, pulmonar fibrose	
	Medfødt	Cystisk fibrose	

Celle, vev eller organ	Dysfunksjon eller patologi	Tilstand eller sykdom	Type
Lunger	Cor pulmonal		
	Traume		
	Pneumoni og pneumonitter	Smittsom, parasittisk, toksisk, traumatisk, forbrenning, aspirasjon	
	Sarkoidose		
Pancreas	Endokrin	Diabetes mellitus type I og type II	Betacellesvikt, dysfunksjon Diabetisk neuropati
		Annen endokrin celledvikt i pancreas	
	Eksokrin	Eksokrin pankreasvikt	Pankreatitt
Bein	Osteopeni	Primær, sekundær	Hypogonadisme immobilisering
			Postmenopause Aldersrelatert Hyperparatyroidisme Hypertyroidisme Kalsium, magnesium, fosfor og/eller vitamin D mangel
	Osteomyelitt		
	Avaskulær nekrose		
	Traume		
	Paget's sykdom		
Hud	Alopece	Areata totalis	Primær Sekundær Skallethet hos menn
	Vitiligo	Lokalisert generalisert	Primær

			Sekundær
	Diabetisk sår dannelse		
	Perifer vaskulær sykdom		
	Brannskader		

Celle, vev eller organ	Dysfunksjon eller patologi	Tilstand eller sykdom	Type
<i>Autoimmune forstyrrelse</i>	Lupus erytematøs, Sjøgren, Reumatoid artritt, Glomerulonefritt Angitt		
	Langerhans's histiocytose		
<i>Øye</i>	Optisk neuritt		
	Butte og penetrerende skader, infeksjoner, sarkoid, sigdcellesykdom, retinal avsondring, Temporal arteritt		
<i>Embryonale og føtale forstyrrelser</i>	Asfyksi		
	Ischemi		
<i>CNS</i>	Kronisk utmattelsessyndrom, akutte og kroniske hypoosmolare og hyperosmolare syndromer, AIDS demens, elektrisk avlivning		
	Encefalitt	Rabies, Herpes	
	Meningitt		
	Subdural hematom		
	Nikotinavhengighet		
	Legemiddelmisbruk og inndragning	Kokain, heroin, crack, marihuana, LSD, PCP, poly-legemiddelmisbruk, ecstasy, opioider, sedative hypnotika, amfetaminer, kaffein	
	Angstforstyrrelser		
	Spinal stenose, transvers myelitt, Guillian Barre, traume, nerverotkompresjon, tumoral kompresjon, hetslag		

Celle, vev eller organ	Dysfunksjon eller patologi	Tilstand eller sykdom	Type
ENT	Tinnitus, Meniere's syndrom, hørselstap		
ENT	Traumatisk skade, barotraume		
Nyre	Nyresvikt	Akutt, kronisk	Vaskulær/ischemisk, mellomliggende sykdom, diabetisk nyresykdom, nevrotiske syndromer, infeksjoner
	Henoch S. Purpura		
Stripet muskel	Autoimmune forstyrrelser	Myastenia gravis, Dermatomyositt Polymyositt	
	Myopatii	Arvelig metabolsk, endokrin og toksisk	
	Heteslag		
	Klemskade		
	Rabdomylose		
	Mitokondrial sykdom		
	Infeksjon	Nekrotiserende fascitt	
Seksuell dysfunksjon	Sentral og perifer	Impotens sekundært til medisiner	
Lever	Hepatitt	Viral, bakteriell, parasittisk	
	Ischemisk sykdom		
	Cirrhose, fettlever		
	Infiltrerende/metabolske sykdommer		
Gastrointestinal	Ischemisk tarmsykdom		
	Inflammatorisk tarmsykdom		
	Nekrotiserende enterokolitt		

Celle, vev eller organ	Dysfunksjon eller patologi	Tilstand eller sykdom	Type
Organtransplantasjon	Behandling av donor og mottaker		
Forplantningssystem	Infertilitet	Vaskulær Autoimmun Livmorabnormiteter Implantasjonsforstyrrelser	

Endokrin	Over- og underfunksjon av kjertel		
-----------------	-----------------------------------	--	--

Som nevnt ovenfor er disse sykdommene, forstyrrelsene eller tilstandene bare illustrative for rekkevidden og fordelene tilveiebrakt ved anvendelsen av erythropoietinene i følge oppfinnelse. Det kan tilveiebringes generell terapeutisk eller profylaktisk behandling av konsekvensene av mekanisk traume eller av humane sykdommer. Terapeutisk eller profylaktisk behandling for sykdommer, forstyrrelser eller tilstander av CNS og/eller det perifere nervesystem er foretrukket.

Terapeutisk eller profylaktisk behandling for sykdommer, forstyrrelser eller tilstander som har en psykiatrisk komponent er tilveiebrakt. Terapeutisk eller profylaktisk behandling for sykdommer, forstyrrelser eller tilstander som inkluderer, men ikke begrenset til de som har en oftalmisk-, kardiovaskulær-, kardiopulmonar-, respiratorisk-, nyre-, urinveis-, forplantnings-, gastrointestinal-, endokrin- eller metabolsk komponent er tilveiebrakt.

I en utførelsesform kan en slik farmasøytisk sammensetning av et erythropoietin administreres systemisk for beskyttelse eller styrking av de målrettede cellene, vevet eller organet. Slik administrasjon kan være parenteral via inhalering eller transmukosal, for eksempel oral, nasal, rektal, intravaginal, sublingual, submukosal eller transdermal. Fortrinnsvis er administrasjon parenteral, for eksempel via intravenøs eller intraperitoneal injeksjon, og inkluderer også, men er ikke begrenset til intraarteriell, intramuskulær, intradermal og subkutan administrasjon.

For andre måte for administrasjon, slik som ved anvendelse av et perfusat eller en injeksjon i et organ eller annet lokal administrasjon, vil en farmasøytisk sammensetning tilveiebringes som resulterer i liknende nivåer av et erythropoietin som beskrevet ovenfor. Et nivå på omkring 15 pM-30 nM er foretrukket.

De farmasøytiske sammensetningene kan omfatte en terapeutisk effektiv mengde av en forbindelse, og en farmasøytisk akseptert bærer. I en spesifikk utførelsesform betyr betegnelsen "farmasøytisk akseptabel" godkjent ved et tilsynsorgan for forbunds- eller statsregjeringen eller opplistet i U.S. Pharmacopeia eller annet generell gjenkjent, fremmed apotekerbok for anvendelse i dyr, og mer spesielt i mennesker. Betegnelsen "bærer" refererer til fortynningsmiddel, adjuvans, bindemiddel eller transportmiddel som terapeutikumet er administrert med. Slike farmasøytiske bærere kan være sterile væsker, slik som saltoppløsninger i vann og oljer, som inkluderer de av petroleum, animalsk, vegetabilsk eller syntetisk opprinnelse, slik som peanøttolje, soyabønneolje, mineralolje, sesamolje og liknende. En saltoppløsning er en foretrukket bærer når den farmasøytiske sammensetningen er administrert intravenøst. Saltoppløsninger og vandige dekstroser og glyserolløsninger kan

også benyttes som væskebærere, fortrinnsvis for injiserbare løsninger. Egnete farmasøytiske bindemidler inkluderer stivelse, glukose, laktose, sukrose, gelatin, malt, ris, mel, kalk, silicagel, natriumstearat, glyserolmonostearat, talkum, natriumklorid, tørket skummet melk, glyserol, propylen, glykol, vann, metanol og liknende. Sammensetningen kan om ønskelig også inneholde mindre mengder av fuktemidler eller emulgerende midler, eller pH-buffrende midler. Disse sammensetningene kan ha form av løsninger, suspensjoner, emulsjoner, tabletter, piller, kapsler, pulvere, formuleringer med vedvarende frigivning og liknende. Sammensetningen kan være formulert som en stikkpille med tradisjonelle bindere og bærere, slik som triglyserider. Forbindelsene ifølge oppfinnelsen kan være formulert nøytral eller som saltformer. Farmasøytisk akseptable salter inkluderer de som er formet med frie aminogrupper, slik som de avledet fra hydroklor, fosfor, eddik, oksal, tartarsyrer osv., og de i form av frie karboksylgrupper, slik som de avledet fra natrium, kalium, ammonium, kalsium, jernhydroksider, isopropylamin, trietylamin, 2-etylaminoetanol, histidin, prokain osv. Eksempler på egnete farmasøytiske bærere er beskrevet i "Remington's Pharmaceutical Sciences", ved E. W. Martin. Slike sammensetninger vil inneholde en terapeutisk effektiv mengde av forbindelsen, fortrinnsvis i rensert form, sammen med en passende mengde av en bærer for å tilveiebringe formen for passende administrasjon til pasienten. Formuleringen skal passe administrasjonsmåten. Farmasøytiske sammensetninger tilpasset for oral tilførsel, kan tilveiebringes som kapsler eller tabletter; pulvere eller granuler; løsninger, siruper eller suspensjoner (i vandige eller ikke-vandige væsker); spiselig skum eller kremer; eller som emulsjoner. Tabletter eller harde gelatinkapsler kan omfatte laktose, stivelse eller derivater derav, magnesiumstearat, natriumsakkarin, cellulose, magnesiumkarbonat, stearinsyre eller salter derav. Bløte gelatinkapsler kan omfatte vegetabiliske oljer, voks, fett, halvmassive stoffer eller væskepolyoler osv. Løsninger og siruper kan omfatte vann, polyoler og sukkere.

Et aktivt middel ment for oral tilførsel kan belegges med eller blandes med et materiale som forsinker oppløsningen og/eller absorpsjonen av det aktive middel i fordøyelseskanalen (for eksempel kan glyserylmonostearat eller glyseryldestearat benyttes). Derved kan den vedvarende frigjøringen av et aktivt middel oppnås over mange timer, og om nødvendig kan det aktive middelet beskyttes fra degradering i magesekken. Farmasøytiske sammensetninger for oral tilførsel kan formuleres for å fremme frigjøring av et aktivt middel ved en bestemt gastrointestinal lokalisering pga. spesifikk pH eller av enzymatiske forhold.

Farmasøytiske sammensetninger tilpasset transdermal tilførsel, kan tilveiebringes i atskilte porsjoner, for å bli værende i nærkontakt med mottakerens epidermis over en lengre tidsperiode. Farmasøytiske sammensetninger tilpasset topikal tilførsel, kan tilveiebringes som salve, krem, suspensjon, hudkrem, pulver, løsning, pasta, gele, spray, aerosol eller olje. For topikal tilførsel til hud, munn, øye eller andre utvendige vev benyttes fortrinnsvis en topikal

salve eller krem. Når den formuleres i en salve kan den aktive ingrediensen benyttes med enten en parafin eller en vann-blandbar salvebase. Alternativt kan den aktive ingrediens formuleres i en krem med en olje-i-vann base eller en vann-i-olje base. Farmasøytiske sammensetninger tilpasset topikal tilførsel til øye inkluderer øyedråper. I disse sammensetningene kan den aktive ingrediensen oppløses i eller suspenderes i en egnet bærer, for eksempel i et vandig løsningsmiddel. Farmasøytiske sammensetninger tilpasset topikal tilførsel i munnen inkluderer drops, pastiller og skyllemiddel for munnen.

Farmasøytiske sammensetninger tilpasset nasal og pulmonar tilførsel, kan omfatte faste bærere slik som pulvere (fortrinnsvis med partikkelstørrelse i området 20 til 500 mikron). Pulveret kan tilføres på samme måte som snus, dvs. ved rask inhalering gjennom nesen fra en beholder med pulver holdt tett inntil nesen. Sammensetninger tilpasset nasal tilførsel kan alternativt omfatte væskebærere, for eksempel nesespray eller nesedråper. Inhalering direkte til lungene kan alternativt utføres ved dyp inhalering eller anbringelse gjennom et munnstykke inn i orofarynx. Disse sammensetningene kan omfatte vandige- eller oljeløsninger av den aktive ingrediens. Sammensetninger for tilførsel ved inhalering kan leveres i spesielt tilpassete anordninger som inkluderer, men ikke begrenset til aerosol på trykkboks, forstøvere eller pusteanordninger, som konstrueres for å tilveiebringe forhåndsbestemte doseringer av den aktive ingrediens. I en foretrukket utførelsesform tilføres farmasøytiske sammensetninger ifølge oppfinnelsen til neseborene direkte eller til lungene via nesebor eller orofarynx.

Farmasøytiske sammensetninger tilpasset rektal tilførsel tilveiebringes som stikkpiller eller klystér. Farmasøytiske sammensetninger tilpasset vaginal tilførsel tilveiebringes som pessar, tamponger, kremer, geléer, pasta, skum eller sprayformuleringer.

Farmasøytiske sammensetninger tilpasset parenteral tilførsel inkluderer vandige og ikke-vandige sterile, injiserbare løsninger eller suspensjoner, som kan inneholde antioksidanter, buffere, bakteriostater og løsningsmidler som gjør sammensetningene hovedsakelig isotone med mottakerens blod. Andre komponenter som kan være tilstede i slike sammensetninger, inkluderer for eksempel vann, alkoholer, polyoler, glyserin og vegetabilske oljer. Sammensetninger tilpasset parenteral tilførsel kan presenteres i enhetsdose- eller multidosebeholdere, for eksempel forseglete ampuller og rør, og kan lagres i en frysetørket (lyofilisert) tilstand som kun krever tilsetning av en steril væskebærer, for eksempel steril saltoppløsning for injeksjoner umiddelbart før anvendelse. Ekstemporete injeksjonsløsninger og suspensjoner kan prepareres fra sterile pulvere, granuler og tabletter. I en utførelsesform kan en autoinjektor omfattende en injiserbar løsning av et erythropoietin tilveiebringes for anvendelse ved nødssituasjon i ambulanse, skadestue og slagmarkssituasjoner, og til og med for selv-tilførsel i en hjemlig situasjon, spesielt når muligheten for traumatisk amputasjon kan

forekomme, slik som ved uforsiktig bruk av gressklipper. Sannsynligheten for at celler og vev i en skadet fot eller tå vil overleve etter reforbindelse kan øke ved å tilføre et erytropoietin til multiple steder i den skadete delen så rask som mulig, selv før ankomst av medisinsk personale til stedet, eller ankomst av det rammete individ med skadet tå til skadestuen. Sammensetningene kan være formulert i samsvar med rutineprosedyrer som en farmasøytisk sammensetning tilpasset intravenøs tilførsel til mennesker. Vanligvis er sammensetninger for intravenøs tilførsel løsninger i steril, isoton, vandig buffer. Når det er nødvendig kan sammensetningen også inkludere et oppløsende middel og et lokalt anestetikum, slik som lidokain for å redusere smerte på stedet for injeksjon. Generelt er ingrediensene levert separat eller sammenblandet i enhetsdoseringsform, for eksempel som et tørt, lyofilisert pulver eller vannfritt konsentrat i en hermetisk forseglet beholder, slik som en ampulle eller pose som indikerer kvantiteten av aktivt middel. Når sammensetningen skal tilføres ved infusjon, kan den utleveres med en infusjonsflaske inneholdende sterilt, farmasøytisk gradert vann, eller saltoppløsning. Der sammensetningen skal tilføres ved injeksjon, kan en ampulle med steril saltoppløsning bringes tilveie, slik at ingrediensene kan blandes før tilførsel.

Stikkpiller inneholder generelt aktiv ingrediens i området fra 0,5 til 10 vektprosent; orale formuleringer inneholder fortrinnsvis 10% til 95% aktiv ingrediens.

En perfusat sammensetning kan tilveiebringes for anbringelse i transplanterte organbad for *in situ* perfusjon, eller for tilførsel til en organdonors vaskulatur før organhøstingen. Slike farmasøytiske sammensetninger kan omfatte nivåer av et erytropoietin eller en form av et erytropoietin som ikke er egnet for akutt eller kronisk, lokal eller systemisk tilførsel til et individ, men vil tilføre funksjonene tilsiktet her i et kadaver, organbad, organperfusat eller *in situ* perfusat før fjerning eller redusering av nivåene av erytropoietinet som de inneholder før eksponering eller returnering av det behandlede organ eller vev til alminnelig sirkulasjon. Erytropoietinet for dette aspekt , kan være ethvert erytropoietin, slik som naturlig forekommende former, slik som humant erytropoietin, eller ethvert av erytropoietinene beskrevet ovenfor, slik som asialoerytropoietin og fenyglyksal-erytropoietiner, som ikke-begrensede eksempler.

En farmasøytisk pakke eller et sett kan frembringes, omfattende en eller flere beholdere fylt med en eller flere av ingrediensene av de farmasøytiske sammensetningene til oppfinnelsen. Eventuelt assosiert med slike beholder(e) kan være en melding i foreskrevet form av et statskontor som regulerer fremstilling, anvendelse eller salg av farmasøytiske eller biologiske produkter, hvor meldingen reflekterer godkjenning fra kontoret for fremstilling, anvendelse eller salg for human tilførsel.

Erythropoietin kan for eksempel leveres i et kontrollert frigjøringsystem. Polypeptidet kan for eksempel administreres ved anvendelse av intravenøs infusjon, en implanterbar, osmotisk pumpe, en transdermal del, liposomer eller andre måter for administrasjon. I en utførelsesform kan en pumpe benyttes (se Langer, *supra*; Sefton, 1987, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14:201; Buchwald *et al.*, 1980, Surgery 88:507; Saudek *et al.*, 1989, N. Engl. J. Med. 321:574). Forbindelsen kan også leveres i en vesikkel, nærmere bestemt et liposom (se Langer, *Science* 249:1527-1533 (1990); Treat *et al.*, in *Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer*, Lopez-Berestein og Fidler (red.), Liss, New York, s. 353-365 (1989); WO 91/04014; U.S. patent 4 704 355; Lopez-Berestein, *ibid.*, s. 317-327; se generelt *ibid.*). I en annen utførelsesform kan polymere materialer benyttes [se *Medical Applications of Controlled Release*, Langer og Wise (red.), CRC Press: Boca Raton, Florida, 1974; *Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance*, Smolen og Ball (red.), Wiley: New York (1984); Ranger og Peppas, J. Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem. 23:61, 1953; se også Levy *et al.*, 1985, *Science* 228:190; During *et al.*, 1989, *Ann. Neurol.* 25:351; Howard *et al.*, 1989, *J. Neurosurg.* 71:105).

Et kontrollert frigivelsessystem kan plasseres i nærheten av det terapeutiske målet, dvs. de målrettede cellene, vev eller organ, som derfor krever kun en fraksjon av den systemiske dose (se for eksempel Goodson, s. 115-138 i *Medical Applications of Controlled Release*, vol. 2, *supra*, 1984). Andre kontrollerte frigjøringsystemer er diskutert i gjennomgåelsen til Langer (1990, *Science* 249:1527-1533).

Erythropoietin, som er passende formulert, kan tilføres ved nasal, oral, rektal eller vaginal tilførsel eller ved tilførsel under tungen.

Det kan være ønskelig å tilføre erythropoietinsammensetningene ifølge oppfinnelsen lokalt til områder med behov for behandling; dette kan oppnås ved for eksempel, uten begrensning, lokal infusjon under kirurgi, topikal påføring, for eksempel i konjunksjon med en sårbandasje etter kirurgi, ved injeksjon, ved midler av et kateter, en stikkpille, et implantat, der nevnte implantat kan være av porøst, ikke-porøst eller gelatinholdig materiale, som inkluderer membraner slik som silastiske membraner eller fibere.

Valg av den foretrukne effektive dose bestemmes av en øvet i faget, basert på betraktning av flere faktorer, som er kjente for dem med ordinær dyktighet innen faget. Slike faktorer inkluderer den bestemte formen av erythropoietin, og dets farmakokinetiske parametre, slik som biotilgjengelighet, metabolisme, halveringstid osv., som etableres under de vanlige utviklingsprosedyrene, vanligvis benyttet for oppnåelse av myndighetens godkjenning for en farmasøytisk sammensetning. ytterligere faktorer, med hensyn til dosen, inkluderer tilstanden

eller sykdommen som skal behandles eller fordelene som skal oppnås i et normalt individ, pasientens kroppsmasse, tilførselsrute, hvorvidt tilførsel er akutt eller kronisk, ledsagende medisineringer og andre faktorer, velkjent for å påvirke effektiviteten av tilførte farmasøytiske midler. Derfor skal den presise doseringen bestemmes i henhold til legens vurdering og hver pasients omstendighet, for eksempel avhengig av tilstanden og immunstatus til den enkelte pasient, i henhold til standard kliniske teknikker.

Et perfusat eller en perfusjonsløsning som bringes tilveie for perfusjon og lagring av organer for transplantasjon, perfusjonsløsningen inkluderer en mengde av et erytropoietin, effektiv til å beskytte erytropoietinresponsive celler og assosierte celler, vev eller organer.

Transplantasjon inkluderer, men er ikke begrenset til xenotransplantasjon, der et organ (som inkluderer celler, vev eller andre kroppsdeler) er høstet fra en donor og transplantert til en ulik mottaker; og autotransplantasjon, hvor et organ er tatt fra en del av en kropp og satt tilbake ved en annen del av kroppen, inkluderer kirurgiske prosedyrer hvor et organ kan fjernes, og mens *ex vivo* operert bort, reparert eller på annen måte manipulert, slik som ved tumorfjerning, og deretter returnert til det opprinnelige sted. I en utførelsesform er perfusjonsløsningen The University of Wisconsin (UW)-løsning (U.S. patent 4 798 824) som inneholder fra omkring 1 til omkring 25 U/ml erytropoietin, 5% hydroksyetylstivelse (med molekylvekt fra omkring 200 000 til om lag 300 000 og hovedsakelig fri for etylenglykol, etylenklorhydrin, natriumklorid og aceton); 25 mM KH_2PO_4 ; 3 mM glutation; 5 mM adenosin; 10 mM glukose; 10 mM HEPES-buffer; 5 mM magnesiumglukonat; 1,5 mM CaCl_2 ; 105 mM natriumglukonat; 200 000 enheter penicillin; 40 enheter insulin; 16 mg deksametason; 12 mg fenolrødt; og har en pH på 7,4-7,5 og en osmolalitet på omkring 320 mOSm/l. Løsningen er benyttet for opprettholdelse av kadavernyrer og pankreas før transplantasjon. Ved anvendelse av denne løsningen kan oppbevaring forlenges utover den 30 timers begrensningen anbefalt for kadavernyreoppbevaring. Dette bestemte perfusatet er bare illustrativt for et antall av slike løsninger som kan tilpasses for den foreliggende anvendelse ved inklusjon av en effektiv mengde av et erytropoietin. Perfusatløsningen kan inneholde fra omkring 5 til omkring 35 U/ml erytropoietin, eller fra omkring 10 til omkring U/ml erytropoietin. Som nevnt ovenfor kan enhver form av erytropoietin benyttes i dette aspektet av oppfinnelsen.

Mens den foretrukne mottaker av et erytropoietin for formålene heri, er et menneske, kan anvendelsen heri anvendes i samme grad på andre pattedyr, spesielt på husdyr, buskap, kjæledyr og dyr i dyrehage. .

I ytterligere områder for *ex vivo* anvendelsen er ethvert erytropoietin, slik som, men ikke begrenset til erytropoietinet beskrevet ovenfor, så vel som naturlige erytropoietiner, så vel som en analog derav, en erytropoietinetterlikner, og erytropoietinfragment, et hybrid

erythropoietinmolekyl, et erythropoietinreseptorbindende molekyl, en erythropoietinagonist, et renalt erythropoietin, et hjerneerythropoietin og oligomer derav, en multimer derav, et mutein derav, en beslektet derav, en naturlig forekommende form derav, en syntetisk form derav, en rekombinant form derav, en glykosyleringsvariant derav, en deglykosylert variant derav eller en kombinasjon derav.

Det er mulig å styrke viabiliteten til celler, vev eller organer som ikke er isolert fra vaskulaturen, ved en endotelcellebarriere tilveiebrakt ved å eksponere cellene, vevet eller organene direkte for en farmasøytisk sammensetning omfattende et erythropoietin. . Styret aktivitet av erythropoietinresponsive celler i behandlet vev eller organ, er ansvarlig for de positive effekter som utfolder seg.

Som beskrevet ovenfor, er oppfinnelsen delvis basert på oppdagelsen om at erythropoietinmolekyler kan transporteres fra den luminale overflate til basalmembranoverflaten hos endotelceller i kapillærene til organer med endotelcelletette forbindelser, som for eksempel inkluderer hjernen, retina og testikkel. Dermed er erythropoietinresponsive celler på den andre siden av barrieren mottakelige mål for de fordelaktige effekter av erythropoietin, og andre celletyper eller vev eller organer, som inneholder og avhenger totalt eller delvis av erythropoietinresponsive celler, er mål for anvendelsene av oppfinnelsen. Selv om det ikke er ønskelig å være bundet til noen bestemt teori, kan erythropoietin etter transcytose skape interaksjoner med en erythropoietinreseptor på en erythropoietinresponsiv celle, for eksempel neuronal, retinal, muskel, hjerte, lunge, lever, nyre, tynntarm, binyrebark, binyremarg, kapillær endotel, testikkel, ovarie eller endometriumcelle, og reseptorbinding kan starte en signaltransduksjonskaskade som resulterer i aktivering av et genekspresjonsprogram i den erythropoietinresponsive celle eller vev, som resulterer i beskyttelse av cellen, vevet eller organet fra ødeleggelse, slik som ved toksiner, kjemoterapeutiske midler, strålingsterapi, hypoksi osv. På denne måte er fremgangsmåter for beskyttelse av erythropoietinresponsiv celle-inneholdende vev fra skade eller hypoksisk stress, og styrking av funksjonen av slikt vev, beskrevet i detalj nedenfor.

For å reparere en hjerteklaff, krevde en kirurgisk prosedyre midlertidig cardioplegi og arterieokklusjon. Før kirurgi ble pasienten infusert med 500 U erythropoietin/kg kroppsvekt. Slik behandling hindret cellulær skade fra hypoksisk ischemi, spesielt etter reperfusjon.

I enhver kirurgisk prosedyre, slik som ved kardiopulmonar bypass-kirurgi, kan et naturlig forekommende erythropoietin eller ethvert erythropoietin benyttes. Administrasjon av en farmasøytisk sammensetning omfattende et erythropoietin, som beskrevet ovenfor, kan utføres

før, under og/eller etter bypassprosedyren, for å beskytte funksjonen til hjerne, hjerte og andre organer.

I de foregående eksemplene hvor anvendelsen av erythropoietin inkluderer naturlig forekommende erythropoietin, er benyttet for *ex vivo* anvendelser, eller for behandling av erythropoietinresponsive celler, slik som nervevev, retinalvev, hjerte, lunge, lever, nyre, tynntarm, binyrebark, binyremarg, kapillære endotel, testikkel, ovarie eller endometriumceller eller -vev, kan det tilveiebringes en farmasøytisk sammensetning i doseringens form tilpasset for beskyttelse eller styrking av erythropoietinresponsive celler, vev eller organer, distalt for vaskulaturen som omfatter pr. doseringsenhet en effektiv, ikke-toksisk mengde innenfor området fra omkring 50 000 til 500 000 enheter, 60 000 til 500 000 enheter, 70 000 til 500 000 enheter, 80 000 til 500 000 enheter, 90 000 til 500 000 enheter, 100 000 til 500 000 enheter, 150 000 til 500 000 enheter, 200 000 til 500 000 enheter, 250 000 til 500 000 enheter, 300 000 til 500 000 enheter, 350 000 til 500 000 enheter, 400 000 til 500 000 enheter eller 450 000 til 500 000 enheter av erythropoietin, en erythropoietinreseptoraktivitetsmodulator eller en erythropoietinaktivert reseptormodulator og en farmasøytisk akseptert bærer. Den effektive ikke-toksiske mengde av erythropoietin innenfor området fra omkring 50 000 til 500 000 enheter er mulig. Erythropoietinet i den tidligere nevnte sammensetningen kan være ikke-erythropoietisk.

Erythropoietinadministrasjon er funnet å gjenoppbygge kognitiv funksjon hos dyr som hadde gjennomgått hjernetraume. Etter en forsinkelse på enten 5 dager eller 30 dager var tilførsel av erythropoietin fortsatt i stand til å gjenoppbygge funksjon sammenliknet med proforma-behandlede dyr, som indikerer evne av erythropoietin til å regenerere eller gjenoppbygge hjerneaktivitet. På denne måte er oppfinnelsen også rettet mot anvendelsen av et erythropoietin for preparering av en farmasøytisk sammensetning for behandling av hjernetraume og andre kognitive dysfunksjoner, som inkluderer behandling i lengre tid etter skade (for eksempel 3 dager, 5 dager, en uke, en måned eller lengre). Det er mulig å behandle kognitiv dysfunksjon etter skade ved tilførsel av en effektiv mengde av et erythropoietin.

Videre er dette styrkende aspekt ifølge oppfinnelsen rettet mot anvendelsen av et hvert av erythropoietinene heri for preparering av en farmasøytisk sammensetning for gjenoppbygging av cellulær, vev- eller organdysfunksjon, der behandling har startet etter, og lenge etter den opprinnelige hendelsen som er ansvarlig for dysfunksjonen. Behandling ved å benytte erythropoietiner ifølge oppfinnelsen, kan videre strekke seg over forløpet av sykdommen eller tilstanden ved den akutte fase, så vel som ved en kronisk fase.

I en foretrukket utførelsesform hvor et erythropoietin erythropoietisk aktivitet, kan erythropoietin tilføres systemisk ved en dosering mellom omkring 300 og omkring 10 000 enheter/kg

kroppsvekt, fortrinnsvis omkring 500-5000 enheter/kg kroppsvekt, mest foretrukket er omkring 1 000 enheter/kg kroppsvekt/tilførsel. Denne effektive dose burde være tilstrekkelig for å oppnå serumnivåer av erythropoietin større enn omkring 10 000, 15 000 eller 20 000 mU/ml serum etter erythropoietintilførsel. Slike serumnivåer kan oppnås ved omkring 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 eller 10 timer etter tilførsel. Slike doseringer kan repeteres om nødvendig. For eksempel kan tilførsel repeteres daglig, så lenge som klinisk nødvendig eller etter et passende intervall, for eksempel hver 1. til 12. uke, fortrinnsvis hver 1. til 3. uke. Den effektive mengde av erythropoietin og en farmasøytisk akseptert bærer pakkes i en enkeldoseampulle eller annen beholder. I en annen utførelsesform er et erythropoietin som er ikke-erythropoietisk, dvs. det er i stand til å utøve aktiviteten beskrevet heri, men forårsaker ikke en økning i hemoglobinkonsentrasjon eller hematokrit mulig å anvende. Det er mulig å gi erythropoietin ved en dose større enn den nødvendig for maksimalt å stimulere erythropoiese. Som nevnt ovenfor har et erythropoietin ikke nødvendigvis erythropoietisk aktivitet, og derfor er doseringene ovenfor uttrykt i hematopoietiske enheter bare eksempler på erythropoietiner som er erythropoietiske; ovenfor er molare ekvivalenter for doseringer tilveiebrakt som er gjeldende for ethvert erythropoietin.

Fremgangsmåte rettet mot å forenkle transporten av et molekyl over en endotelcellebarriere i et pattedyr ved tilførsel av en sammensetning som omfatter det bestemte molekylet i assosiasjon med erythropoietin, som beskrevet ovenfor er mulig. Som beskrevet ovenfor danner tette forbindelser mellom endotelceller i enkelte kroppsorganer en barriere for innføring av enkelte molekyler. For behandling av ulike tilstander innenfor lukkede organer er hjelpemidler for å fremme passasje av farmasøytiske midler ønskelig. Et erythropoietin er nyttig som en bærer for levering av andre molekyler over blod-hjerne barrieren og andre liknende barrierer. En sammensetning som omfatter et molekyl som er ivrig etter å krysse barrieren med erythropoietin er preparert, og perifer tilførsel av sammensetningen resulterer i transcytose av sammensetningen over barrieren. Assosiasjonen mellom molekylet som skal transporteres over barrieren og erythropoietin, kan være en labil kovalent binding, hvor i dette tilfellet molekylet er frigjort fra assosiasjon med erythropoietinet etter å ha krysset barrieren. Om den ønskete farmakologiske molekylaktiviteten er opprettholdt eller uberørt ved assosiasjon med erythropoietin, kan et slikt kompleks bli administrert.

Den øvete forskeren vil være klar over ulike hjelpemidler for assosiasjon av molekyler med et erythropoietin ifølge oppfinnelsen og det andre middelet beskrevet ovenfor, ved kovalent, ikke-kovalent, og andre hjelpemidler; videre kan evaluering av effektiviteten av sammensetningen enkelt bestemmes i et eksperimentelt system. Assosiasjon av molekyler med erythropoietin kan utføres ved et antall midler, som inkluderer labil, kovalent binding, kryssbinding osv. Biotin/avidin interaksjoner kan benyttes. Som nevnt ovenfor kan et hybridmolekyl prepareres

ved rekombinante eller syntetiske midler, for eksempel som inkluderer både doméne av molekylet med ønsket farmakologisk aktivitet og doméne ansvarlig for erythropoietinreseptoraktivitetsmodulering.

Et molekyl kan konjugeres til et erythropoietin gjennom et polyfunksjonelt molekyl, dvs. en polyfunksjonell krysslinker. Som benyttet her omfatter betegnelsen "polyfunksjonelt molekyl" molekyler som har en funksjonell gruppe som kan reagere mer enn en gang etter hverandre, slik som formaldehyd, så vel som molekyler med mer enn en reaktiv gruppe. Som benyttet her refererer betegnelsen "reaktiv gruppe" til en funksjonell gruppe på krysslinkeren som reagerer med en funksjonell gruppe på et molekyl (for eksempel peptid, protein, karbohydrat, nukleinsyre, spesielt et hormon, antibiotika eller anti-cancermedikamenter som skal leveres over en endotelcellebarriere) for å danne en kovalent binding mellom krysslinkeren og det molekylet. Betegnelsen "funksjonell gruppe" beholder sin standard betydning i organisk kjemi. De polyfunksjonelle som benyttes her er fortrinnsvis biokompatible linkere, dvs. de er ikke-karsinogene, ikke-toksiske og hovedsakelig ikke-immunogene *in vivo*. Polyfunksjonelle krysslinkere slik som de som er kjent innen faget og beskrevet heri, kan enkelt testes i dyremodeller for bestemmelse av deres biokompatibilitet. Det polyfunksjonelle molekylet er fortrinnsvis bifunksjonelt. Som benyttet heri refererer betegnelsen "bifunksjonelt molekyl" til et molekyl med to reaktive grupper. Det bifunksjonelle molekylet kan være heterobifunksjonelt eller homobifunksjonelt. En heterobifunksjonell krysslinker tillater vektoriell konjugering. Det polyfunksjonelle molekyl er tilstrekkelig løselig i vann til at kryssbindingsreaksjonene skal kunne foregå i vandige løsninger, slik som i vandige løsninger bufret ved pH 6 til 8, og for at konjugatresultatet forblir vannløselig for mer effektiv biodistribusjon. Vanligvis binder det polyfunksjonelle molekylet kovalent med en amino- eller en sulfidylfunksjonell gruppe. Polyfunksjonelle molekyler er imidlertid reaktive med andre funksjonelle grupper, slik som karboksylsyrer eller hydroksylgrupper.

De homobifunksjonelle molekylerne har minst to like, reaktive funksjonelle grupper. De reaktive funksjonelle gruppene på et homobifunksjonelt molekyl inkluderer for eksempel aldehydgrupper og aktive estergrupper. Homobifunksjonelle molekyler som har aldehydgrupper inkluderer for eksempel glutaraldehyd og subaraldehyd. Anvendelsen av glutaraldehyd som et kryssbindende middel, ble angitt av Poznansky et al., *Science* 223, 1304-1306 (1984). Homobifunksjonelle molekyler som har minst to aktive esterenheter inkluderer estere av dikarboksylsyrer og N-hydroksysuksinimid. Noen eksempler på slike N-suksinimidylestere inkluderer disuksinimidylsuberat og ditio-bis-(suksinimidylpropionat), og deres vannløselige bis-sulfonsyre og bis-sulfonatsalter, slik som deres natrium- og kalsiumsalter. Disse homobifunksjonelle reagenser er tilgjengelige fra Pierce, Rockford, Illinois.

De heterobifunksjonelle molekyler har minst to ulike reaktive grupper. De reaktive gruppene reagerer med ulike funksjonelle grupper, for eksempel til stede på erytropoietinet og molekylet. Disse to ulike funksjonelle gruppene som reagerer med den reaktive gruppen på den heterobifunksjonelle krysslinkeren, er vanligvis en aminogruppe, for eksempel epsilon-aminogruppen hos lysin; en sulfidylgruppe, for eksempel tiolgruppen hos cystein; en karboksylsyre, for eksempel karboksylat hos asparbinsyre; eller en hydroksylgruppe, for eksempel hydroksylgruppen hos serin.

De ulike erytropoietinmolekylene kan selvfølgelig kanskje ikke ha passende reaktive grupper tilgjengelig for anvendelse med enkelte kryssbindende midler; en med dyktighet innen faget vil imidlertid være klar over valget av kryssbindende midler basert på de tilgjengelige grupper for kryssbinding i et erytropoietin.

Når en reaktiv gruppe på et heterobifunksjonelt molekyl danner en kovalent binding med en aminogruppe, vil den kovalente bindingen vanligvis være en amid- eller imid-binding. Den reaktive gruppen som danner en kovalent binding med en aminogruppe, kan for eksempel være en aktivert karboksylgruppe, en halokarbonylgruppe, eller en estergruppe. Den foretrukne halokarbonylgruppen er en klorkarbonylgruppe. Estergruppene er fortrinnsvis reaktive estergrupper slik som for eksempel en N-hydroksysuksinimidestergruppe.

Den andre funksjonelle gruppen er vanligvis enten en tiolgruppe, en gruppe som kan konverteres til en tiolgruppe, eller en gruppe som danner en kovalent binding med en tiolgruppe. Den kovalente bindingen vil vanligvis være en tioeterbinding eller en disulfid. Den reaktive gruppe som danner en kovalent binding med en tiolgruppe kan for eksempel være en dobbeltbinding som reagerer med tiolgrupper eller en aktivert disulfid. En reaktiv gruppe inneholdende en dobbeltbinding som er i stand til å reagere med en tiolgruppe, er maleimidgruppen, selv om andre, slik som akrylnitril også er mulig. En reaktiv disulfidgruppe kan for eksempel være en 2-pyridylditiogruppe eller en 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzosyre)gruppe. Noen eksempler på heterobifunksjonelle reagenser inneholdende reaktive disulfidbindinger inkluderer N-suksinimidyl 3-(2-pyridyl-ditio)propionat (Carlsson, et al., 1978, Biochem J., 173:723-737), natrium S-4-suksinimidylloksykarbonyl-alfa-metylbenzyltiosulfat, og 4-suksinimidylloksykarbonyl-alfa-metyl-(2-pyridylditio)toluen. N-suksinimidyl 3-(2-pyridylditio)propionat er foretrukket. Noen eksempler på heterobifunksjonelle reagenser som omfatter reaktive grupper med en dobbeltbinding som reagerer med en tiolgruppe inkluderer suksinimidyl 4-(N-maleimidometyl)sykloheksan-1-karboksylat og suksinimidyl m-maleimidobenzoat. Andre heterobifunksjonelle molekyler inkluderer suksinimidyl 3-(maleimid)propionat, sulfosuksinimidyl 4-(p-maleimid-fenyl)butyrat, sulfosuksinimidyl 4-(N-maleimidmetylsykloheksan)-1-karboksylat,

maleimidobenzoyl-N-hydrokxy-suksinimidester. Natriumsulfonatsaltet av suksinimidyl m-maleimidobenzoat er foretrukket. Mange av de ovenfor nevnte heterobifunksjonelle reagensene og deres sulfonatsalter er tilgjengelige fra Pierce Chemical Co., Rockford, Illinois, USA.

Behovet for konjugatet ovenfor beskrevet til å være reversibelt eller labilt, kan enkelt bestemmes av den øvete forskeren. Et konjugat kan testes *in vitro* for både erythropoietinet og for den ønskelig farmakologiske aktivitet. Om konjugatet beholder begge egenskaper kan dets velegnethet videre testes *in vivo*. Om konjugatmolekylet krever separasjon fra erythropoietinet for aktivitet, vil en labil binding eller reversibel assosiasjon med erythropoietin være ønskelig. Labilitetsegenskapene kan også testes ved anvendelse av standard *in vitro* prosedyrer før *in vivo* testing.

Ytterligere informasjon angående tillaging og anvendelse av disse, så vel som andre polyfunksjonelle reagenser, kan oppnås fra de følgende publikasjoner eller andre tilgjengelige i faget:

- Carlsson, J. et al., 1978, Biochem. J. 173:723-737.
 Cumber, J. A. et al., 1985, Methods in Enzymology 112:207-224.
 Jue, R. et al., 1978, Biochem 17:5399-5405.
 Sun, T. T. et al., 1974, Biochem. 13:2334-2340.
 Blattler, W. A. et al., 1985, Biochem. 24:1517-152.
 Liu, F. T. et al., 1979, Biochem. 18:690-697.
 Youle, R. J. og Neville, D. M. Jr., 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 77:5483-5486.
 Lerner, R. A. et al., 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78:3403-3407.
 Jung, S. M. og Moroi, M., 1983, Biochem. Biophys. Acta 761:162.
 Caulfield, M. P. et al., 1984, Biochem. 81:7772-7776.
 Staros, J. V., 1982, Biochem. 21:3950-3955.
 Yoshitake, S. et al., 1979, Eur. J. Biochem. 101:395-399.
 Yoshitake, S. et al., 1982, J. Biochem. 92:1413-1424.
 Pilch, P. F. og Czech, M. P., 1979, J. Biol. Chem. 254:3375-3381.
 Novick, D. et al., 1987, J. Biol. Chem. 262:8483-8487.
 Lomant, A. J. og Fairbanks, G., 1976, J. Mol. Biol. 104:243-261.
 Hamada, H. og Tsuruo, T., 1987, Anal. Biochem. 160:483-488.
 Hashida, S. et al., 1984, J. Applied Biochem. 6:56-63.

Fremgangsmåter for kryssbinding er i tillegg gjennomgått av Means og Feeney, 1990, Bioconjugate Chem.1:2-12.

Barrierer som er kryssset ved de ovenfor beskrevne fremgangsmåter og sammensetninger, inkluderer, men er ikke begrenset til blod-hjerne barrieren, blod-øye barrieren, blod-testikkel barrieren, blod-ovarie barrieren og blod-livmor barrieren.

Kandidatmolekyler for transport over en endotelcellebarriere inkluderer for eksempel hormoner, slik som veksthormoner, neurotrofiske faktorer, antibiotika eller antisoppmidler slik som de normalt er ekskludert fra hjerne og andre innelukkete organer, peptid radiofarmasøytika, antisensmidler, antistoffer mot biologisk aktive midler, legemidler og anticancermedler. Eksempler på slike molekyler inkluderer veksthormon, nervevekstfaktor (NGF), hjerne-avledet neurotrofisk faktor (BDNF), siliær neurotrofisk faktor (CNTF), basal fibroblast vekstfaktor (bFGF), transformerende vekstfaktor $\beta 1$ (TGF $\beta 1$), transformerende vekstfaktor $\beta 2$ (TGF $\beta 2$), transformerende vekstfaktor $\beta 3$ (TGF $\beta 3$), interleukin 1, interleukin 2, interleukin 3 og interleukin 6, AZT, antistoffer mot tumornekrose faktor og immunundertrykkende midler slik som syklosporin.

Sammensetning omfattende et molekyl som skal transporteres via transcytose over en endotelcelletett forbindelsesbarriere og et erythropoietin som beskrevet ovenfor kan anvendes. Oppfinnelsen er videre rettet mot anvendelsen av et konjugat mellom et molekyl og erythropoietin, beskrevet ovenfor for fremstilling av en farmasøytisk sammensetning for levering av molekylet over en barriere som beskrevet ovenfor.

Den foreliggende oppfinnelsen kan bedre forstås ved referanse til de følgende eksempler. De følgende eksemplene er presentert for en mer fullstendig illustrasjon av de foretrukne utførelsesformene ifølge foreliggende oppfinnelse.

Eksempel 1

ERYTHROPOIETIN KRYSSER BLOD-CEREBROSPINAL VÆSKETETT BARRIERE

Voksne Sprague-Dawley hannrotter ble anestesert og tilført rekombinant humant erythropoietin intraperitonealt. Cerebrospinalvæske ble samlet fra cisterna magna med 30 minutters intervall opptil 4 timer og erythropoietinkonsentrasjonen ble bestemt ved anvendelse av en følsom og spesifikk enzymforbundet immuntest. Som illustrert i figur 1, er basallinje-erythropoietinkonsentrasjonen i CSF 8 mU/ml. Etter et opphold på flere timer begynner nivåene av erythropoietin målt i CSF å øke, og ved 2,5 timer og senere er de signifikant forskjellige fra basallinjekonsentrasjonen ved $p < 0,01$ nivået. Toppnivået på ca 100 mU/ml er innenfor området som er kjent for å utøve beskyttende effekter *in vitro* (0,1 til 100 mU/ml). Tidspunktet for å nå toppen finner sted etter omkring 3,5 timer, som er signifikant forsinket

fra toppnivåene i serum (mindre enn 1 time). Resultatene av dette eksperimentet illustrerer signifikante nivåer av erytropoietin oppnå over en tett, cellulær forbindelse ved bolus parenteral tilførsel av erytropoietin ved hensiktsmessige konsentrasjoner.

Eksempel 2

OPPRETTHOLDELSE AV FUNKSJON I HJERTE KLARGJORT FOR TRANSPLANTASJON

Wistar hannrotter med vekt 300 til 330 g ble tilført erytropoietin (5000 U/kg kroppsvekt) eller befordringsmiddel 24 timer før fjerning av hjertet for *ex vivo* studier, i samsvar med protokollen til Delcayre et al., 1992, *Amer. J. Physiol.* **263**:H1537-45. Dyrene ble avlivet med pentobarbital (0,3 ml), og intravenøst heparin (0,2 ml). Hjertene ble til å begynne med tillatt å ekvillibrere i 15 minutter. Den venstre ventrikulære ballongen ble så blåst opp til et volum som ga et diastolisk trykk på 8 mm Hg. Den venstre ventrikulære trykk-volumkurven er konstruert ved økende innblåsning av ballongvolumet ved 0,02 ml alikvoter. Null-volumet er definert som det punktet der det venstre, ventrikulære sluttdiastoliske trykk er null. Ved komplettering av trykk/volum-kurven er den venstre, ventrikulære ballongen redusert for å sette det sluttdiastoliske trykket tilbake til 8 mm Hg, og kontrollperioden ble fulgt i 15 minutter etter kontroll av coronærstrømning. Deretter ble hjertet stanset med 50 ml Celsior⁺ molekylløsning for å hvile ved 4 °C ved et trykk på 60 cm H₂O. Hjertet ble deretter fjernet og lagret i 5 timer ved 4 °C i en plastbeholder fylt med den samme løsningen og omkranset med knust is.

Etter avsluttet lagring ble hjertet overført til et Langendorff-apparat. Ballongkateteret ble igjen innsatt i venstre ventrikel og igjen blåst opp til det samme volum som under pre-ischemiske periode. Hjertet reperfuseres i minst 2 timer ved 37 °C. Reperfusjonstrykket er satt til 50 cm H₂O i 15 minutter tilbakestrømning og så tilbake til 100 cm H₂O i de neste 2 timene. Hjerterytme (320 slag/minutt) gjenopprettes. Isovolumetriske målinger av kontraktile indekser og diastolisk trykk er gjort i triplikat ved 25, 45, 60 og 120 minutter av re-perfusjon. Ved dette tidspunkt utføres trykkvolumkurver, og koronar utstrømning i løpet av den 45 mn reperfusjonen samles for måling av keratinkinase-lekkasje. De to behandlingsgruppene sammenliknes ved anvendelse av en uparet t-test, og en lineær regresjon ved anvendelse av de sluttdiastoliske trykkdata benyttes for å konstruere samsvarende kurver. Som vist i figur 2 forekommer signifikant forbedring av venstre, ventrikulære trykk, utviklet etter behandling med erytropoietin, så vel som forbedret volum/trykk-kurve, reduksjon av venstre diastoliske, ventrikulære trykk og reduksjon av keratinkinase-lekkasje.

Eksempel 3

ERYTROPOIETIN BESKYTTER MYOKARDIUM FRA ISCHEMISK SKADE

Voksne hannrotter ble tilført rekombinant, humant erythropoietin (5000 U/kg kroppsvekt) 24 timer tidligere, ble anestesert og klargjort for koronar arterieokklusjon. En ytterligere dose av erythropoietin ble gitt ved starten på prosedyren og den venstre store koronararterie tilstoppet i 30 minutter og deretter frigjort. Den samme dose erythropoietin ble gitt daglig i en uke etter behandling. Dyrene ble så studert for hjertefunksjon. Som illustrert i figur 3 demonstrerte dyr som mottok en proforma injeksjon (saltoppløsning) en større økning i det venstre sluttdiastoliske trykk, som indikerer et dilatert, stivt hjerte til myokardialt infarkt. I motsetning, dyrene som mottok erythropoietin led ikke av nedgang i hjertefunksjon, sammenliknet med proformaopererte kontroller (forskjell signifikant ved $p < 0,01$ nivået).

Eksempel 4

ERYTHROPOIETINMOLEKYLER

Naturlig erythropoietin kan modifiseres for å skreddersy dets aktiviteter for et spesifikt vev eller spesifikke vev. Flere ikke-begrensende strategier kan utføres for oppnåelse av denne ønskelige vevsspesifisiteten som inkluderer modifikasjoner som fjerner eller modifiserer glykosyleringshalvdelene, hvor erythropoietin har tre N-forbundne og en O-forbundet. Slike varianter av glykosylert erythropoietin kan produseres på mange måter. Sialinsyrene som avslutter enden av sukkerkjedene kan for eksempel fjernes ved spesifikke sialidaser, avhengig av den kjemiske bindingen som kobler sialinsyren til sukkerkjeden. Alternativt kan den glykosylerte strukturen demonteres på flere måter ved anvendelse av andre enzymer som kløver ved spesifikke bindinger. For bekreftelse av disse prinsippene ble rekombinant, humant erythropoietin desialisert ved anvendelse av Sialidase A (Prozyme Inc.) i samsvar til produsentens protokoll. Vellykket kjemisk modifikasjon ble bekreftet ved å kjøre reaksjonsproduktet på en SDS-polyakrylamidgel og farge de resulterende båndene som viste at det kjemisk modifiserte erythropoietin hadde en tydelig molekylær vekt på ~31 kD som forventet, sammenliknet med umodifisert erythropoietin som var ~34 kD og ved måling av de resterende sialinsyrerester ved kjemiske midler til å være $< 0,1$ mol/mol av erythropoietin.

I en annen modifikasjon der aminosyrerestene til erythropoietin er modifisert, ble argininrester modifisert ved anvendelse av fenylglyoksal i henhold til protokollen til Takahashi (1977, *J. Biochem.* **81**:395-402) utført ved varierende lengder av tid i området fra 0,5 til 3 timer ved romtemperatur. Reaksjonen ble avsluttet ved dialyse av reaksjonsblandingen mot vann. Anvendelse av slike modifiserte former av erythropoietin er fullstendig omfattet heri.

Asialoerythropoietin og fenylglyoksalerythropoietin var like effektive som naturlig erythropoietin for nerveceller *in vitro*, som vist figurene 4-6. *In vitro* testing ble utført ved anvendelse av nerve-liknende embryonale karsinomceller (P19) som gjennomgår apoptose ved fjerning av serum. 24 timer før fjerning av serum ble 1-1000 ng/ml erythropoietin eller et modifisert

erythropoietin tilsatt til kulturene. Påfølgende dag ble mediet fjernet, cellene vasket med friskt, ikke-serumholdig medium, og medium inneholdende testsubstansen (intet serum) tilbakeført til kulturene for ytterligere 48 timer. For å bestemme antall levedyktige celler ble en tetrazolium reduksjonstest utført (CellTiter 96; Promega, Inc.). Som illustrert i figur 4-5, viser asialoerythropoietin å være like effektivt som erythropoietin i å hindre celledød. Det fenyglyksalmodifiserte erythropoietinet ble testet ved anvendelse av den nerve-liknende P19-celletesten beskrevet ovenfor. Som illustrert i figur 6 beholder dette kjemisk modifiserte erythropoietinet fullstendig sine neurobeskyttende effekter.

Retensjon av neurobeskyttende aktivitet *in vivo* ble bekreftet ved anvendelse av en rottetofokal ischemimodell der en reversibel lesjon i territoriet av den midtre, cerebrale arteri er utført som beskrevet tidligere (Brines et al., 2000, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **97**:10526-31). Voksne Sprague-Dawley hannrotter ble tilført asialoerythropoietin eller erythropoietin (5000 U/kg kroppsvekt intraperitonealt) eller befordringsmiddel ved starten av den arterielle okklusjonen. 24 timer senere ble dyrene avlivet og hjernene fjernet for studie. Seriesnitt ble kuttet og farget med tetrazoliumsalter for identifisering av levende hjerneregioner. Som vist i figur 7 var asialoerythropoietin like effektivt som naturlig erythropoietin i å oppvise neurobeskyttelse fra 1 time av ischemi. Figur 8 viser resultatene av en annen fokal ischemimodell der en komparativ doserespons ble utført med erythropoietin og asialoerythropoietin. Ved den laveste dose på 250 U/kg, ga asialoerythropoietin beskyttelse, mens umodifisert erythropoietin ikke ga beskyttelse.

Eksempel 5

MODIFIKASJON AV PRIMÆRSTRUKTUR AV ERYTHROPOIETIN OG EFFEKTIVITET VED NEURONAL BESKYTTELSE

Et antall av mutante erythropoietinmolekyler som ikke binder til erytrocytt-erythropoietinreseptoren er beskrevet, og som derved ikke støtter erythropoiese *in vivo* eller *in vitro*. Noen av disse molekyler vil ikke desto mindre etterlikne virkningene av erythropoietin i andre vev eller organer. For eksempel er en 17-mer inneholdende aminosyresekvensen fra 31-47 av naturlig erythropoietin inaktivt for erythropoiese, men fullstendig aktiv for nerveceller *in vitro* (Campana & O'Brien, 1998: *Int. J. Mol. Med.* **1**:235-41).

Deriverte erythropoietiner som er ønskelig for anvendelsene beskrevet heri, kan produseres ved guanidinerings, amidinerings, trinitrofenylerings, acetylerings, suksinilerings, nitrerings eller modifikasjon av argininrester eller karboksylgrupper blant andre prosedyrer som nevnt ovenfor, for produksjon av erythropoietiner som opprettholder sine aktiviteter for spesifikke organer og vev, men ikke for andre, slik som erytrocytter. Når erythropoietin er utsatt for reaksjonene ovenfor, har det generelt vært funnet at det resulterende molekylet mangler både *in vivo* og *in vitro* erythropoietisk aktivitet (for eksempel Satake et al., 1990, *Biochim. Biophys.*

Acta **1038**:125-9). Noen eksempler på fremstilling av modifiserte erythropoietiner er beskrevet nedenfor.

Biotinylering av frie aminogruupper av erythropoietin.

0,2 mg D-biotinyl-e-aminokaproinsyre-N-hydroksysuksinimidester (Boehringer Mannheim nr. 1418165) ble oppløst i 100 µl DMSO. Denne løsningen ble kombinert med 400 µl PBS inneholdende ca 0,2 mg erythropoietin i et foliedekket rør. Etter inkubasjon i 4 timer ved romtemperatur ble det ureagerte biotinet separert ved gelfiltrering på en Centricon 10 kolonne. Som vist i figur 10, beskytter dette biotinylerte erythropoietinet P19-celler fra serumfjerning.

I ”Biotinylated recombinant human erythropoietins: Bioactivity and Utility as a receptor ligand” av Wojchowski et al., *Blood*, 1989, 74(3):952-8, anvender forfatterne tre ulike fremgangsmåter for å biotinylere erythropoietin. Biotin er tilsatt til (1) sialinsyrehalvdelene (2) karboksylatgruppene (3) aminogrupeene. Forfatterne benytter en musemiltcelleproliferasjonstest for å demonstrere at (1) tilsetningen av biotin til sialinsyrehalvdelene ikke inaktiverer den biologiske aktiviteten til erythropoietin (2) tilsetningen av biotin til karboksylatgruppene fører til vesentlig biologisk inaktivering av erythropoietin (3) tilsetningen av biotin til aminogrupeene resulterte i fullstendig biologisk inaktivering av erythropoietin. Disse fremgangsmåtene og modifikasjonene er fullstendig omfattet heri. Figur 9 viser aktiviteten av biotinylert erythropoietin og asialoerythropoietin i serumsultet P19-test.

Jodinering av erythropoietin.

Fremgangsmåte 1 - Jodkuler. En jodkule (Pierce, Rockford, IL) ble inkubert i 100 µl PBS (20 mM natriumfosfat, 0,15 M NaCl, pH 7,5) inneholdende 1 mCi fri Na^{125}I i 5 minutter. 100 µg erythropoietin i 100 µl PBS ble så tilsatt til blandingen. Etter 10 minutters inkubasjonsperiode ved romtemperatur ble reaksjonen stanset ved fjerning av 200 µl løsning fra reaksjonsrøret (jodkulene forble i røret). Jodoverskuddet ble fjernet ved gelfiltrering på en Centricon 10 kolonne. Som vist i figur 11 er jod-erythropoietin produsert på denne måte effektiv for beskyttelse av P19-celler fra serumfjerning.

Fremgangsmåte 2 - Kloramin T. 100 µg erythropoietin i 100 µl PBS ble tilsatt til 500 µCi Na^{125}I og blandet sammen i et eppendorfrør. 25 µl kloraminer T (2 mg/ml) ble så tilsatt og blandingen ble inkubert i ett minutt ved romtemperatur. 50 µl kloramin T stoppbuffer (2,4 mg/ml natriummetabisulfit, 10 mg/ml tyrosin, 10% glyserol, 0,1% xylene i PBS) ble så tilsatt. Jodtyrosinet og jodert erythropoietin ble så separert ved gelfiltrering på en Centricon 10 kolonne.

Lysinmodifikasjoner: Karbamylering: Erythropoietin (100 µg) ble modifisert med kaliumcyanat som beskrevet i Plapp et al., ("Activity of bovine pancreatic deoxyribonuclease A with modified amino groups" 1971, J. Biol. Chem. 246, 939-845).

Trinitrofenylering: Erythropoietin (100 µg) ble modifisert med 2,4,6-trinitrobenzensulfonat som beskrevet i Plapp et al., ("Activity of bovine pancreatic deoxyribonuclease A with modified amino groups" 1971, J. Biol. Chem. 246, 939-845).

Acetylering: Erythropoietin (100 µg) ble inkubert i 0,3 M fosfatbuffre (pH 7,2) inneholdende den samme mengde av eddiksyreanhydrid ved 0 °C i 1 time. Reaksjonen ble stoppet ved dialyse mot destillert vann.

Suksinylering: Erythropoietin (100 µg) i 0,15 M NaHCO₃ (pH 8,0) ble inkubert et 15 molar overskudd av ravsyreanhydrid ved 15 °C i 1 time. Reaksjonen ble stoppet ved dialyse mot destillert vann.

Argininmodifikasjoner: Erythropoietin ble modifisert med 2,3-butandion som beskrevet i Riordan ("Functional arginyl residues in carboxypeptidase A. Modification with butanedione" Riordan J. F., Biochemistry 1973, 12(20):3915-3923).

Erythropoietin ble modifisert med sykloheksanon som i Patthy et al., ("Identification of functional arginin residues in ribonuclease A and lysozyme" Patthy, L, Smith E. L. J. Biol. Chem. 1975 250(2):565-9).

Erythropoietin ble modifisert med fenylglyoksal som beskrevet i Werber et al., ("Proceedings: Carboxypeptidase B: modification of functional arginyl residues" Werber, M. M., Sokolovsky M., Isr J Med Sci 1975 11(11):1169-70).

Tyrosin modifikasjoner: Erythropoietin (100 µg) ble inkubert med tetranitrometan som tidligere beskrevet i Nestler et al., "Stimulation of rat ovarian cell steroidogenesis by high density lipoproteins modified with tetranitromethane" Nestler J. E., Chacko G. K., Strauss J. F. 3rd. J Biol Chem 1985 Jun 25; 260(12):7316-21).

Glutaminsyre (og asparbinsyre) modifikasjoner: For å modifisere karboksylgrupper ble erythropoietin (100 µg) inkubert med 0,02 M EDC i 1 M glysinamid med pH 4,5 ved romtemperatur i 60 minutter som beskrevet i Carraway et al "Carboxyl group modification in

chymotrypsin and chymotrypsinogen." Carraway KL, Spoerl P, Koshland DE Jr. J Mol Biol 1969 May 28;42(1):133-7.

Tryptofan residumodifikasjoner: Erythropoietin (100 µg) ble inkubert med 20 µM n-bromosuksinimid i 20 mM kaliumfosfatbuffer (pH 6,5) ved romtemperatur som beskrevet i Ali et al., J Biol Chem. 1995 Mar 3; 270(9):4570-4. Antallet av oksiderte tryptofanrester ble bestemt ved fremgangsmåten beskrevet i Korotchkina (Korotchkina, LG et al Protein Expr Purif. 1995 Feb; 6(1):79-90).

Fjerning av aminogruupper: For å fjerne aminogruupper ble erythropoietin (100 µg) inkubert i PBS (pH 7,4) som inneholdt 20 mM ninhydrin (Pierce Chemical, Rockford, IL) ved 37 °C i 2 timer som beskrevet i Kokkini et al (Kokkini, G., et al "Modification of hemoglobin by ninhydrin" Blood, Vol. 556, No 4 1980: 701-705). Reduksjon av det resulterende aldehydet ble utført ved å reagere produktet med natriumborhydrid eller litiumaluminiumhydrid. Spesifikt ble erythropoietin (100 µg) inkubert med 0,1 M natriumborhydrid i PBS i 30 minutter ved romtemperatur. Reduksjonen ble stoppet ved avkjøling av prøvene på is i 10 minutter og ved dialyse mot PBS tre ganger over natten. (Kokkini, G., Blood, Vol. 556, No 4 1980: 701-705). Reduksjon ved anvendelse av litiumaluminiumhydrid ble utført ved å inkubere erythropoietin (100 µg) med 0,1 M litiumaluminiumhydrid i PBS i 30 minutter ved romtemperatur. Reduksjonen ble stoppet ved å avkjøle prøvene på is i 10 minutter og ved dialyse mot PBS tre ganger over natten.

Disulfidreduksjon og stabilisering: Erythropoietin (100 µg) ble inkubert med 500 mM DTT i 15 minutter ved 60 °C. 20 mM jodacetamid i vann ble så tilsatt til blandingen og inkubert i 25 minutter ved romtemperatur i mørke.

Begrenset proteolyse: Erythropoietin kan utsettes for en begrenset, kjemisk proteolyse som er målrettet til spesifikke rester. Erythropoietin ble reagert med 2-(2-nitrofenylsulfenyl)-3-metyl-3'-bromindolenin, som kløver spesifikt etter tryptofanrester i et 50 gangers overskudd i 50% eddiksyre ved 48 timer i mørke ved romtemperatur i rør satt under nitrogentrykk. Reaksjonen ble stoppet ved undertrykking med tryptofan og avsalting.

Eksempel 6

BESKYTTELSE AV RETINAL ISCHEMI VED PERIFERT ADMINISTRERT ERYTHROPOIETIN

Retinalceller er veldig følsomme for ischemi, slik at mange vil dø etter 30 minutter med ischemisk stress. Videre ligger subakutt eller kronisk ischemi bak forringelse av syn, som følger et antall av alminnelige humane sykdommer, slik som diabetes mellitus, glaukom og

makulær degenerering. På det nåværende tidspunktet er det ingen effektive terapier for å beskytte celler mot ischemi. En tett endotelbarriere eksisterer mellom blodet og retina som ekskluderer de fleste store molekyler. For å teste hvorvidt perifert administrert erythropoietin vil beskytte celler som er følsomme for ischemi, ble en akutt, reversibel glaukom rottemodell benyttet som beskrevet av Rosenbaum et al., (1997; *Vis. Res.* 37:3443-51). Spesifikt ble saltoppløsning injisert til det foranliggende kammeret i øyet på voksne hannrotter til et trykk over systemisk arterielt trykk og opprettholdt i 10 minutter. Dyrene ble tilført saltoppløsning eller 5000 U erythropoietin/kg kroppsvekt intraperitonealt 24 timer før induksjonen av ischemi, og fortsatte som en daglig dose i ytterligere 3 dager. Elektoretinografi ble utført på mørke-tilpassete rotter en uke etter behandling. Figur 11-12 illustrerer at administrasjonen av erythropoietin er assosiert med god konservering av elektoretinogrammet (ERG) (panel D), i motsetning til dyr behandlet med saltoppløsning alene (panel C), hvor veldig liten funksjon var igjen. Figur 11 sammenlikner elektoretinogram a- og b-bølge amplitudene for de erythropoietinbehandlede gruppene og de saltoppløsningsbehandlede gruppene, og viser signifikant beskyttelse tilveiebrakt ved erythropoietin.

Eksempel 7

GJENOPPBYGGENDE EFFEKTER AV ERYTHROPOIETIN PÅ REDUSERT KOGNITIV FUNKSJON SOM OPPSTÅR FRA HJERNESKADE

I en studie for demonstrasjon av erythropoietins evne til å gjenoppbygge redusert kognitiv funksjon hos mus etter at de har fått hjernetraume, ble Balb/C-hunnmus utsatt for dempet hjernetraume, som beskrevet i Brines et al., PNAS 2000, 97; 10295-10672, og 5 dager senere startet daglig intraperitoneal erythropoietinadministrasjon med 5000 U/kg kroppsvekt. 12 dager etter skade ble dyr testet for kognitiv funksjon i Morris vannlabyrint, med fire forsøk pr. dag. Mens både behandlede og ikke-behandlede dyr gjorde det dårlig i testen (med svømme tider på omkring 80 sekunder av 90 mulige), viser figur 13 at erythropoietinbehandlede dyr gjorde det bedre (i denne presentasjonen er en negativ verdi bedre). Selv om starten på erythropoietinbehandling er forsinket inntil 30 dager etter traume (figur 14), er gjenoppbygging av kognitiv funksjon også sett.

Eksempel 8

KAINAT MODELL

I kainat neurotoksisitetsmodellen ble asialoerythropoietin administrert i henhold til protokollen fra Brines et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2000, 97; 10295-10672 ved en dose på 5000 U/kg kroppsvekt tilført intraperitonealt 24 timer før tilførsel av 25 mg/kg kainat som viser seg å være like effektivt som erythropoietin, som vist ved tid til død (figur 15).

Oppfinnelsens område skal ikke begrenses ved de spesifikke utførelsesformene beskrevet, som er ment som enkle illustrasjoner av individuelle aspekter av oppfinnelsen, og funksjonelle, ekvivalente fremgangsmåter og komponenter er innefor oppfinnelsens rekkevidde. Selvfølgelig vil ulike modifikasjoner av oppfinnelsen, i tillegg til dem vist og beskrevet heri, være tydelige for dem øvet innen faget, fra den tidligere nevnte beskrivelsen og vedlagte figurer. Slike modifikasjoner er ment å ligge innenfor rammen av de vedlagte krav.

P a t e n t k r a v

1.

Anvendelse av et modifisert erythropoietin, for fremstilling av et medikament for å beskytte, opprettholde, forsterke eller gjenopprette funksjonen eller viabiliteten til en erythropoietinresponderende mammalsk celle, vev som omfatter erythropoietinresponderende celler, eller organer som omfatter erythropoietinresponderende celler, hvor nevnte medikament omfatter en modifisert

erythropoietin som har minst en av modifiseringene som er listet i (i) til (iii) under og en farmasøytisk akseptabel bærer, der nevnte modifiserte erythropoietin har (a) vevsbeskyttende aktivitet som bestemt *in vitro* ved P19 analysen eller *in vivo* ved midtre hjernearterie lesjonsanalysen og (b) et redusert nivå av erythropoietin aktivitet sammenlignet med nativt erythropoietin:

valgt fra gruppen bestående av

- i) 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 sialinsyre ("sialic acid") rester;
- ii) én eller flere modifiserte lysinrester eller
- iii) én modifikasjon av den N-terminale aminogruppe.

2.

Anvendelse ifølge krav 1, der nevnte modifiserte erythropoietin er asialoerythropoietin.

3.

Anvendelse ifølge krav 2, der nevnte asialoerythropoietin er humant asialoerythropoietin.

4.

Anvendelse ifølge krav 1, der at nevnte modifiserte erythropoietin er behandlet med minst én glykosidase.

5.

Anvendelse ifølge krav 1, der nevnte modifiserte erythropoietin er uttrykt i en insekt- eller plantecelle.

6.

Anvendelse ifølge krav 1, der nevnte modifiserte lysin er glukitolyl lysin eller fruktosyl lysin.

7.

Anvendelse ifølge krav 1, der nevnte lysinrest av nevnte modifiserte erythropoietin er karbamylert.

8.

Anvendelse ifølge krav 1, der nevnte modifiserte lysinrest er acylert.

9.

Anvendelse ifølge krav 8, der nevnte modifiserte lysinrest er acetylert.

10.

Anvendelse ifølge krav 8, der nevnte modifiserte lysinrest er sukkinylert.

11.

Anvendelse ifølge krav 1, der nevnte modifiserte lysinrest er modifisert ved 2,4,6-trinitrobenzensulfonatnatrium eller et annet salt derav.

12.

Anvendelse i følge krav 1 eller 7, hvor nevnte modifiserte erythropoietin er i stand til å behandle eller forebygge en sykdom eller forstyrrelse i sentralnervesystemet eller det perifere nervesystemet i et pattedyr.

13.

Anvendelse i følge krav 1 eller 7, hvor nevnte modifiserte erythropoietin er i stand til å behandle eller forebygge en sykdom eller sykdom i det kardiovaskulære system, kardiopulmonære system, respirasjonssystemet, nyre, urinsystemet, pankreas, ben, hud, immunsystem, øye, embryo eller foster, ENT, muskel, reproduksjonssystemet, lever, magetarm systemet, det endokrine system, eller en metabolsk abnormitet, mitokondriell sykdom eller surstoffmangel hos menneske.

14.

Anvendelse i følge krav 1 eller 7, hvor nevnte modifiserte erythropoietin er i stand til å behandle eller forebygge en sykdom eller en forstyrrelse i hjernen, øye eller retina hos et pattedyr.

15.

Anvendelse i følge krav 1 eller 7, hvor nevnte modifiserte erythropoietin er i stand til å behandle eller forebygge en sykdom eller en sykdom i hjerte, myocardium eller koronararterien hos et pattedyr.

16.

Anvendelse i følge krav 1 eller 7, hvor nevnte erythropoietinresponderende pattedyrscelle, vev omfatter erythropoietinresponderende celler eller organ som omfatter erythropoietinresponderende celler er en lunge, lever, nyre, tynntarm, adrenal cortex, adrenal medulla kapillær, endotel, testis, ovarie, bukspyttkjertel, ben, hud eller endometrielle celler, vev eller organ.

17.

Anvendelse i følge krav 1 eller 7, hvor nevnte erythropoietinresponderende pattedyrscelle, vev omfatter erythropoietinresponderende celler eller organ som omfatter erythropoietinresponderende celler i en hjerne, neural, neuronal eller retinal celle, vev eller organ.

18.

Anvendelse i følge krav 1 eller 7, hvor nevnte erythropoietinresponderende pattedyrscelle, vev omfatter erythropoietinresponderende celler, vev som omfatter erythropoietinresponderende celler eller organ som omfatter erythropoietinresponderende celler i en muskel, hjerte eller myocardial celle, vev eller organ.

19.

Anvendelse i følge krav 1 eller 7, hvor nevnte erythropoietin er effektiv for opprettholdelse, gjenoppbygging eller forsterking av kognitiv funksjon i et pattedyr som har eller har risiko for kognitiv dysfunksjon.

20.

Anvendelse i følge krav 19, hvor nevnte kognitive dysfunksjon er forårsaket av hjernetraume.

21.

Anvendelse i følge krav 19, hvor nevnte forsterking av kognitiv funksjon er forsterking av læring.

22.

Anvendelse i følge krav 1 eller 7, hvor nevnte medikament er for anvendelse i et pattedyr som har, har hatt, er i risiko for eller som gjennomgår, multipel sklerose, slag,

skade i sentralnervesystemet, neuronalt tap, iskemi, subarakonoide blødninger, aneurisme, aneurisme blødninger, inflammasjon, aldersrelatert tap av kognitiv funksjon, neurodegenererende sykdom eller forstyrrelse, Alzheimers sykdom, Parkinsons sykdom, Huntingtons sykdom, Tourettes syndrom, Leighs sykdom, Guillain Barre, demens, AIDS demens, senil demens, Lewy body demens, hukommelsestap, amyotrofisk lateral sklerose, alkoholisme, neuropsykiatrisk eller neuropsykologisk sykdom, humørsvingninger, uni-polar affekt lidelse, depresjon, alvorlig depressiv sykdom, dystymisk sykdom, mani, bi-polar affekt lidelse, angst sykdom, angst, schizofreni, scizoaffekt sykdom, tvangstanke lidelse, oppmerksomhetssvikt, oppmerksomhetssvikt hyperaktivitetslidelse, autisme, en prion sykdom slik som Creutzfeldt-Jakobs sykdom. Friedreich ataksi, Wilsons sykdom, traume, "concussive" skade, hjerne eller ryggmargsskade, post-operativ kognitiv dysfunksjon, post-operativ behandling for embolisk eller iskemisk skade, øyevevsskade, makulær degenerering, diabetisk neuropati, diabetisk retinopati, glaukom, retinal iskemi, retinal traume, retinitis pigmentosa, optisk nerve skade, retinal løsrivelse, arteriosklerotisk retinopati, retinopati som følge av høyt blodtrykk ("hypertensive retinopathy"), retinal arterie blokkering, retinal vene blokkering, tap av kognitiv funksjon, subduralt hematoma, muskulær dystrofi, myoton dystrofi, panikk sykdom.

23.

Anvendelse i følge krav 22, hvor pattedyret har, har hatt, er i risiko for, eller lider av cerebral iskemi.

24.

Anvendelse i følge krav 22, hvor pattedyret har, har hatt, er i risiko for, eller lider av slag.

25.

Anvendelse i følge krav 22, hvor pattedyret har, har hatt, er i risiko for, eller lider av Friedreichs ataksi.

26.

Anvendelse i følge krav 22, hvor pattedyret har, har hatt, er i risiko for, eller lider av multippel sklerose.

27.

Anvendelse i følge krav 22, hvor pattedyret har, har hatt, er i risiko for, eller lider av amyotrofisk lateral sklerose.

28.

Anvendelse i følge krav 22, hvor pattedyret har, har hatt, er i risiko for, eller lider av diabetisk neuropati.

29.

Anvendelse i følge krav 1 eller 7, hvor pattedyret har, har hatt, er i risiko for, eller lider av cerebral iskemi, retinal iskemi, fokal iskemi, makulær degenerering, hjerne skade, "blunt" traume, tap av kognitiv funksjon, neurotoksisitet eller sykdom ved slagtilfelle ("seizure disorder").

30.

Anvendelse i følge krav 1 eller 7, hvor nevnte medikament er til anvendelse i et pattedyr som har, har hatt, er i risiko for, eller gjennomgår sykdom ved slagtilfelle, kronisk slagtilfelle sykdom, epilepsi, anfall, nerverot kompresjon, hypotensjon, hjertestans ("cardiac arrest"), myokardialt infarkt, stråleskade, røntgenbehandling, bestråling av hele hjernen, kjemoterapi, cerebral parese, cerebral og progressive supranukleær lammelse, hjerte-lunge bypass, neurologiske defekter fra hjerte-lunge bypass, hypoxi, mitokondriell dysfunksjon, hjerte skade, skade i myocardium, hjerte traume, kronisk hjertefeil, hypotensjon, en tilstand knyttet hypoglykemi, diabetes mellitus akutt nyresvikt, hepatitt eller nefrotisk syndrom.

31.

Anvendelse i følge krav 1 eller 7, hvor pattedyret har, har hatt, er i risiko for, eller gjennomgår myokardialt infarkt, coronar eller cerebral arterie blokkering, diabetes mellitus, hjerte-lunge bypass, kronisk hjertesvikt eller glaukom.

32.

Anvendelse av et erythropoietin for fremstilling av et medikament for å beskytte, opprettholde, forsterke eller gjenoppbygge funksjonen eller viabiliteten til en erythropoietinresponderende pattedyrscelle, vev som omfatter erythropoietinresponderende celler eller organ som omfatter erythropoietinresponderende celler, hvor nevnte medikament omfatter et erythropoietin som har vevsbeskyttende aktivitet som bestemt *in vitro* ved P19 testen eller *in vivo* ved den midtre cerebral arterie lesjonstesten, hvor nevnte celle, vev eller organ ikke er en eksitabel celle, vev eller organ.

33.

Anvendelse i følge krav 1 eller 32, hvor nevnte erythropoietin er non-erythropoietisk.

34.

Anvendelse i følge krav 32 hvor nevnte erythropoietin har minst en av de følgende modifikasjoner:

- i) 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 eller 13 sialinsyrerester;
- ii) én eller flere modifiserte lysinrester eller
- iii) én modifikasjon av den N-terminale aminogruppe.

35.

Anvendelse i følge krav 34, hvor nevnte erythropoietin er karbamylert.

36.

Anvendelse i følge krav 34, hvor nevnte erythropoietin er asialoerythropoietin.

37.

Anvendelse i følge krav 36, hvor nevnte asialoerythropoietin er humant asialoerythropoietin .

38.

Anvendelse i følge krav 34, hvor nevnte erythropoietin behandles med minst én glycosidase.

39.

Anvendelse i følge krav 34, hvor nevnte erythropoietin uttrykkes i en insekt eller plante celle.

40.

Anvendelse i følge krav 34, hvor nevnte modifiserte lysin er glukitolyl lysin eller fruktosyl lysin.

41.

Anvendelse i følge krav 34, hvor nevnte modifiserte lysinrest er acylert.

42.

Anvendelse i følge krav 34, hvor nevnte modifiserte lysinrest er acetylert.

43.

Anvendelse i følge krav 34, hvor nevnte modifiserte lysinrest er sukkinylert.

44.

Anvendelse i følge krav 34, hvor nevnte modifiserte lysinrest er modifisert ved 2,4,6-trinitrobenzensulfonat natrium eller et annet salt derav.

45.

Anvendelse av krav 1, 7 eller 32, hvor nevnte medikament er formulert for administrering etter begynnelsen på en skade, sykdom eller tilstand.

46.

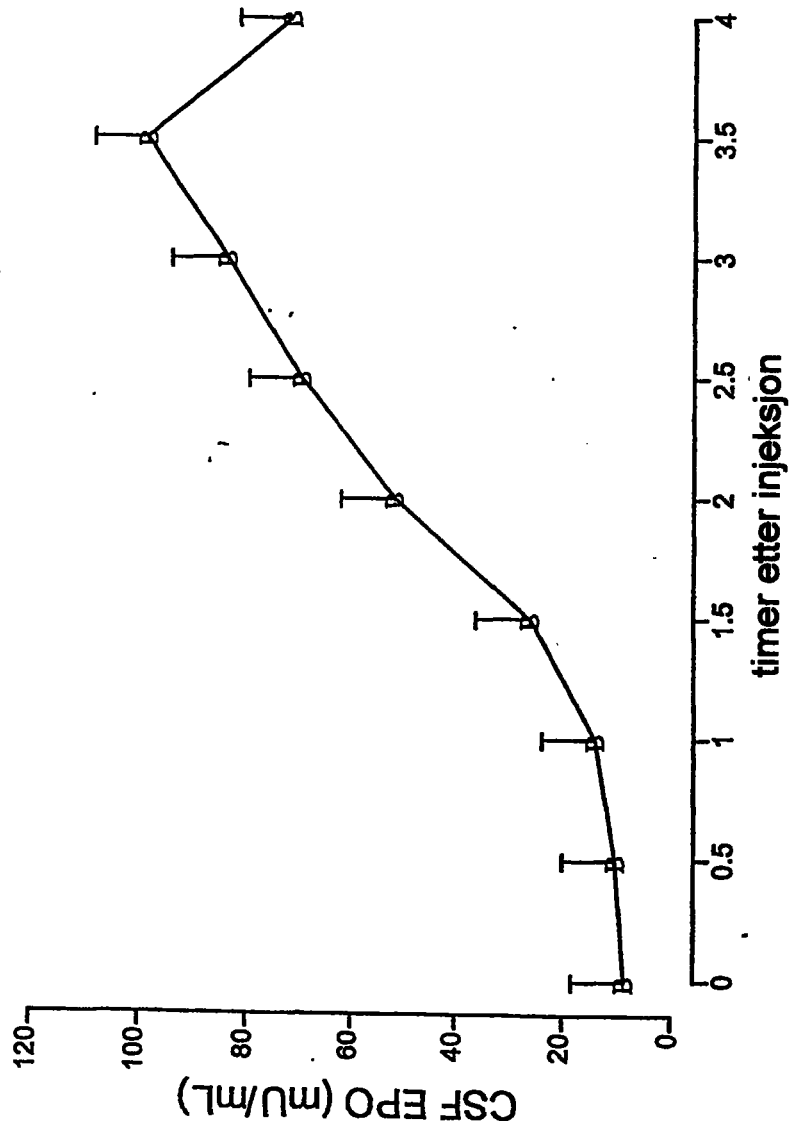
Anvendelse av krav 1, 7 eller 32, hvor nevnte medikament er formulert for administrering før begynnelsen på en skade, sykdom eller tilstand.

47.

Anvendelse av krav 1, 7 eller 32, hvor nevnte medikament er formulert for administrering under den akutte fasen og/eller den kroniske fasen av en skade, sykdom eller tilstand.

Figur 1

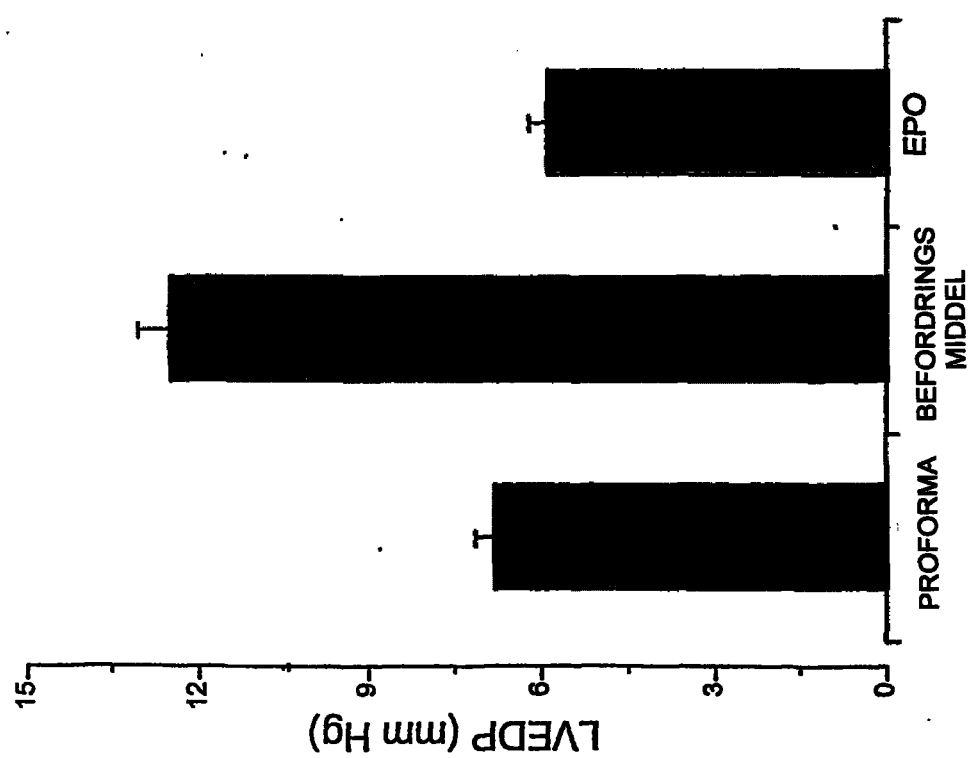
ROTTE CSF EPO KONSENTRASJON ETTER PARENTERAL rH-EPO
ADMINISTRASJON (5000 U/kg kroppsvekt I.P.)



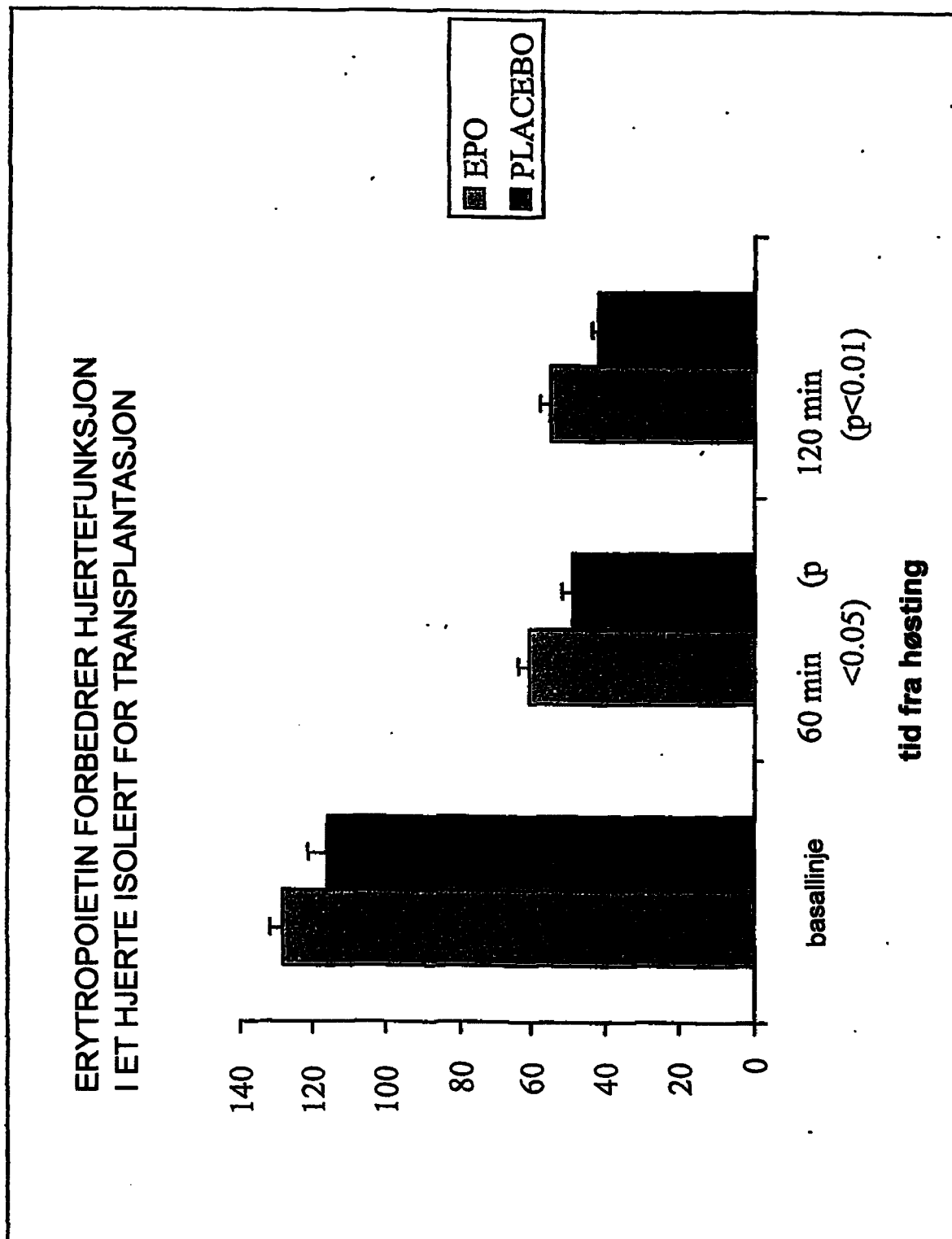
2,5 timer og lengre $p < 0,01$ sammenliknet med basallinje

Figur 2

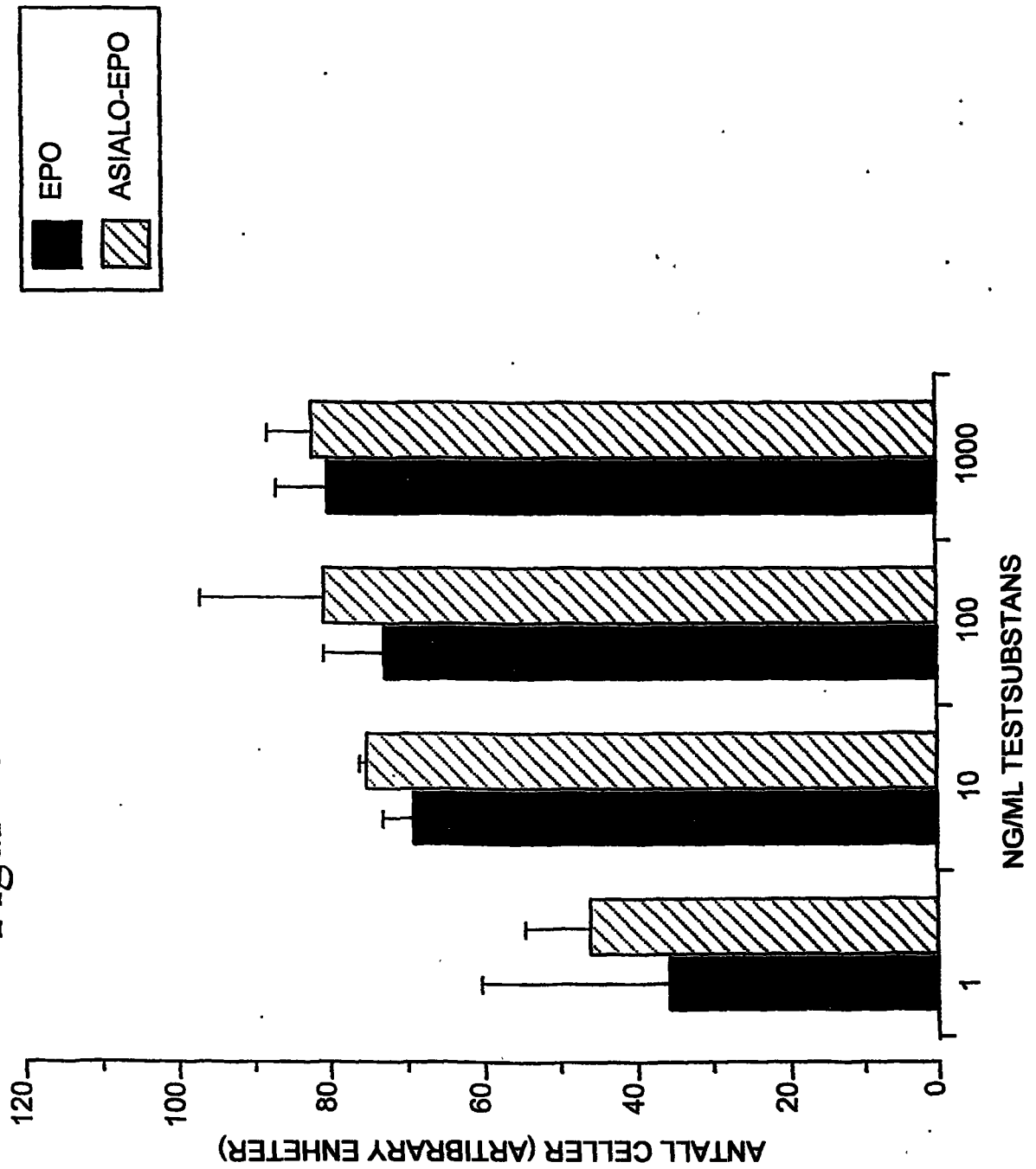
ROTTEHJERTE 7 DAGER ETTER 30 MINUTTER MED ISCHEMI



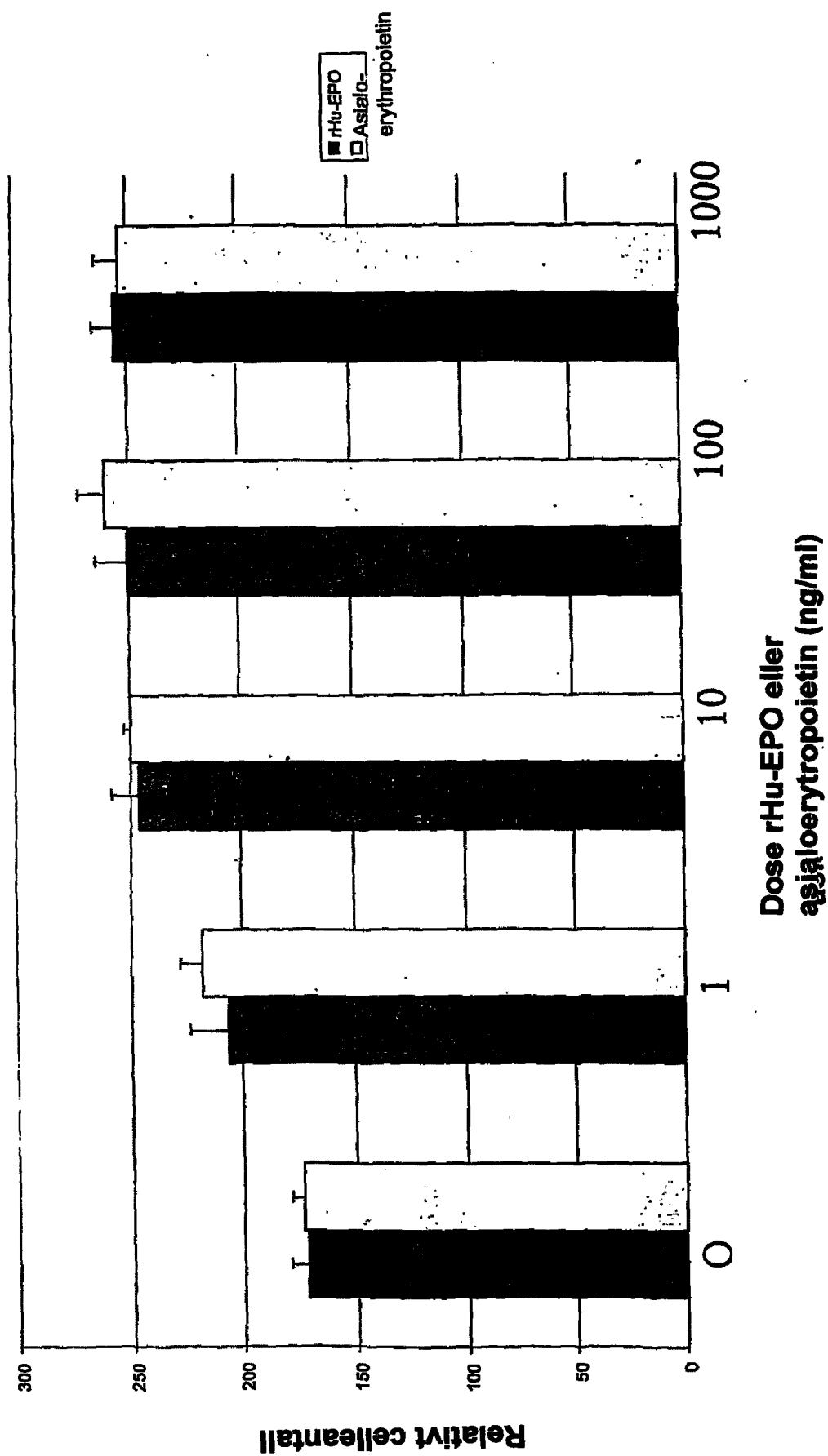
Figur 3



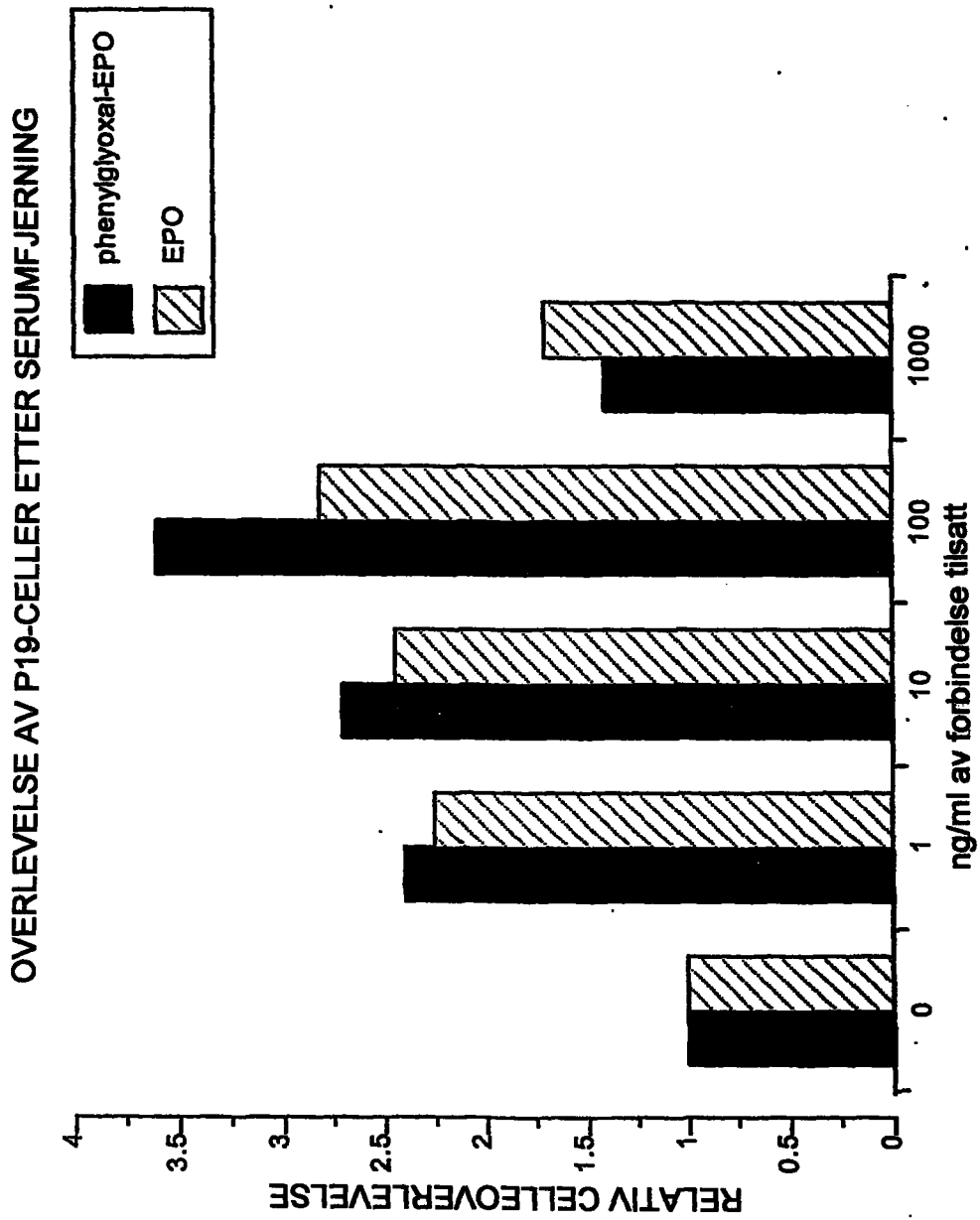
Figur 4



Figur 5

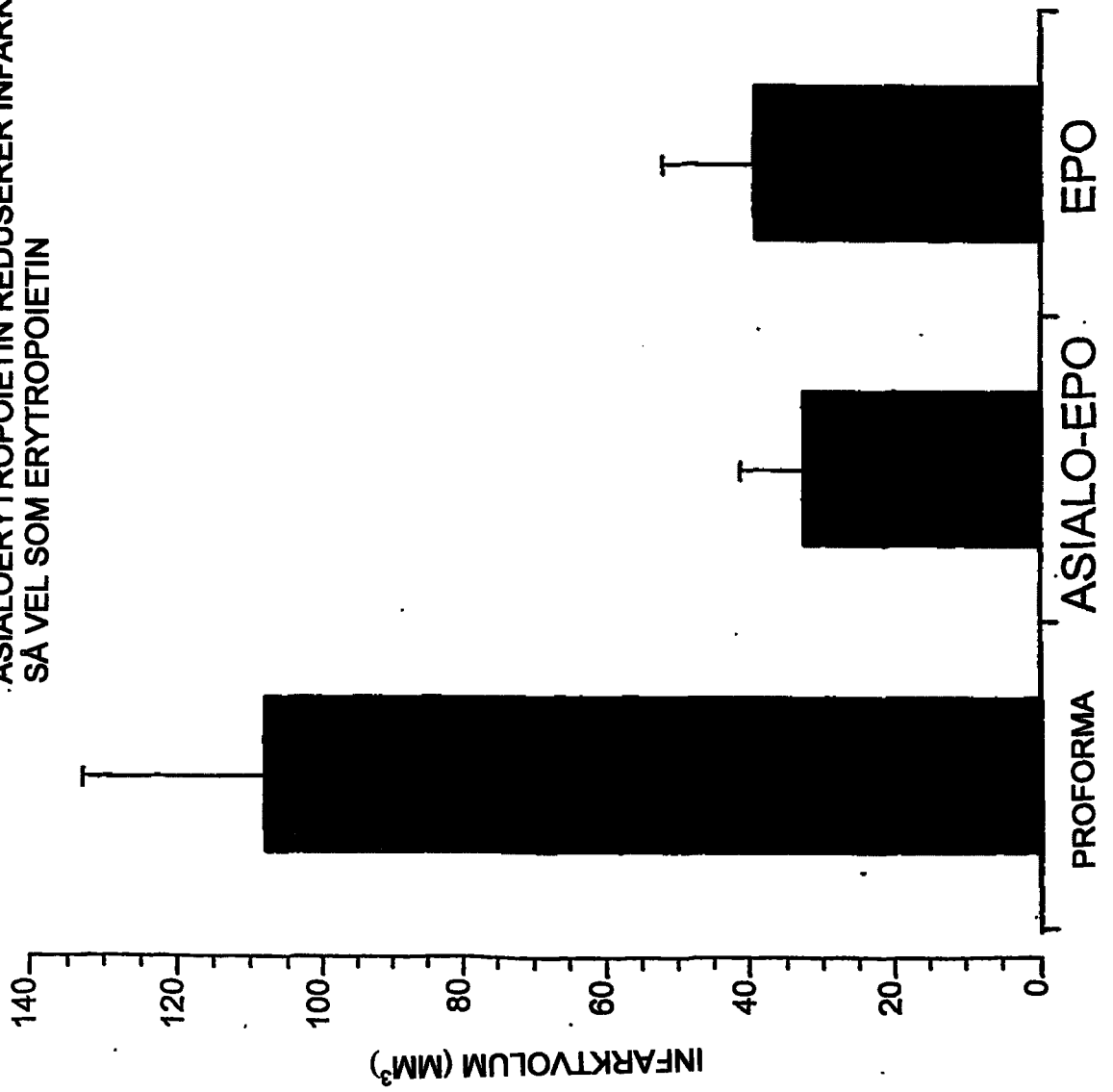


Figur 6

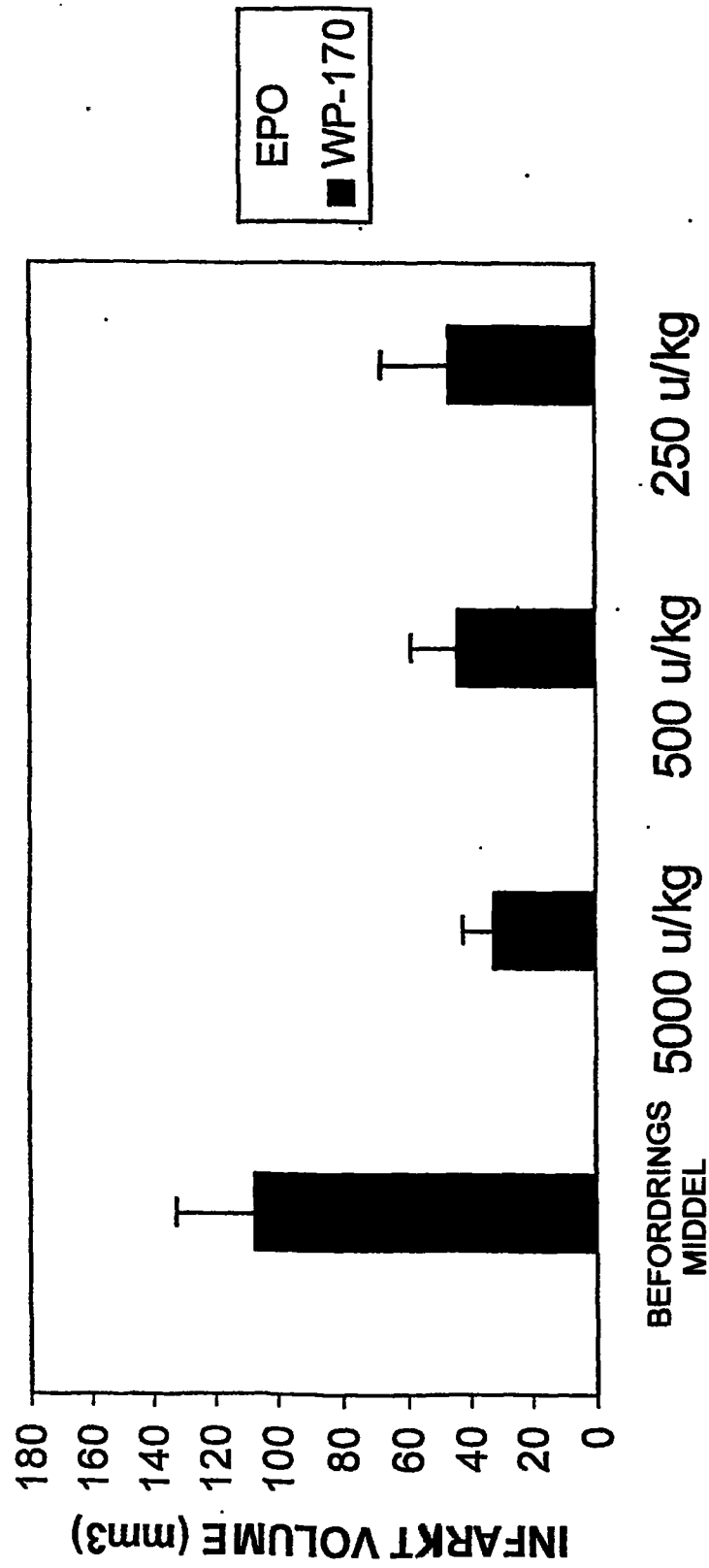


Figur 7

ASIALOERYTROPOIETIN REDUSERER INFARKTVOLUM
SÅ VEL SOM ERYTROPOIETIN

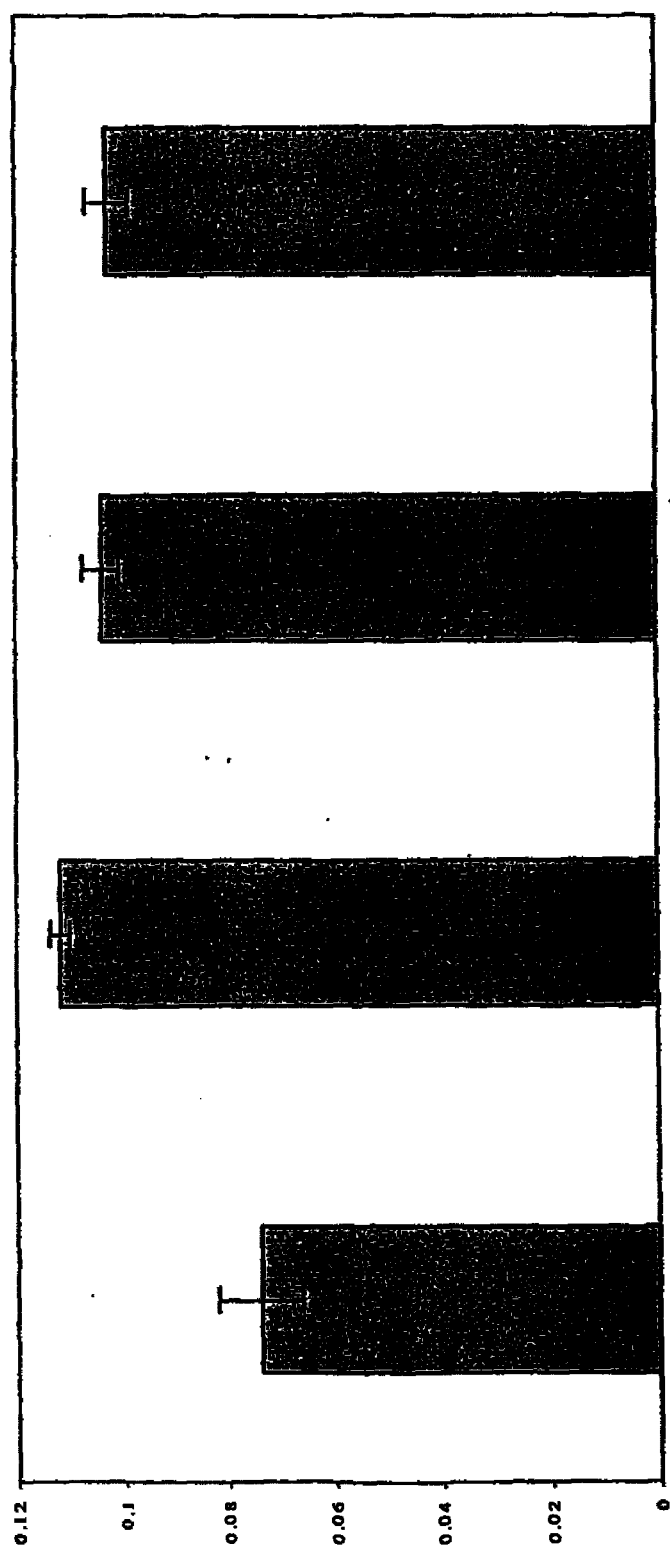


Figur 8
asialoerythropoietin
(dose respons)

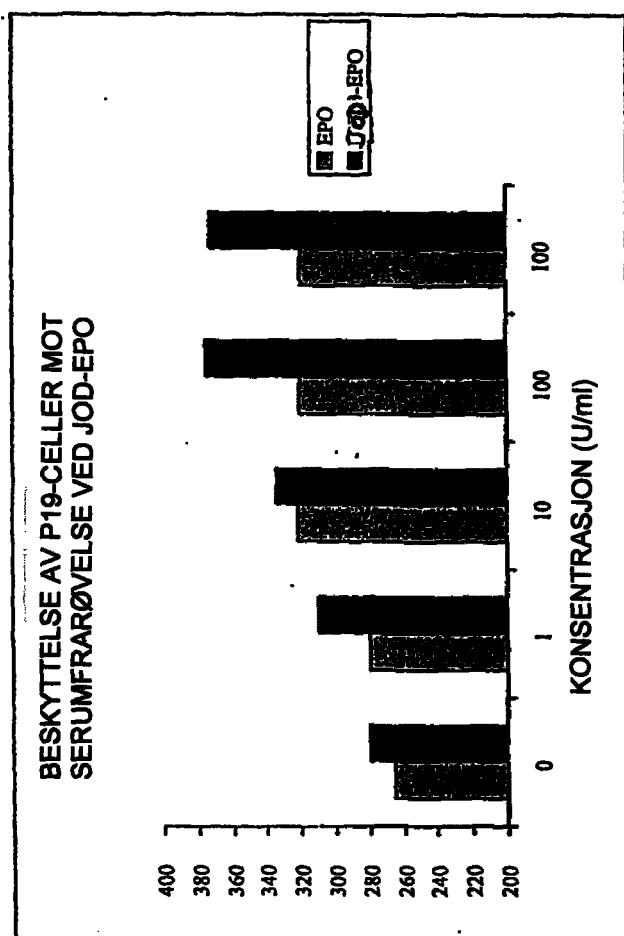


n for hver gruppe er
større enn eller lik 4

Figur 9
Biotinylert-EPO og asialo-EPO beholder
aktivitet i P19 test

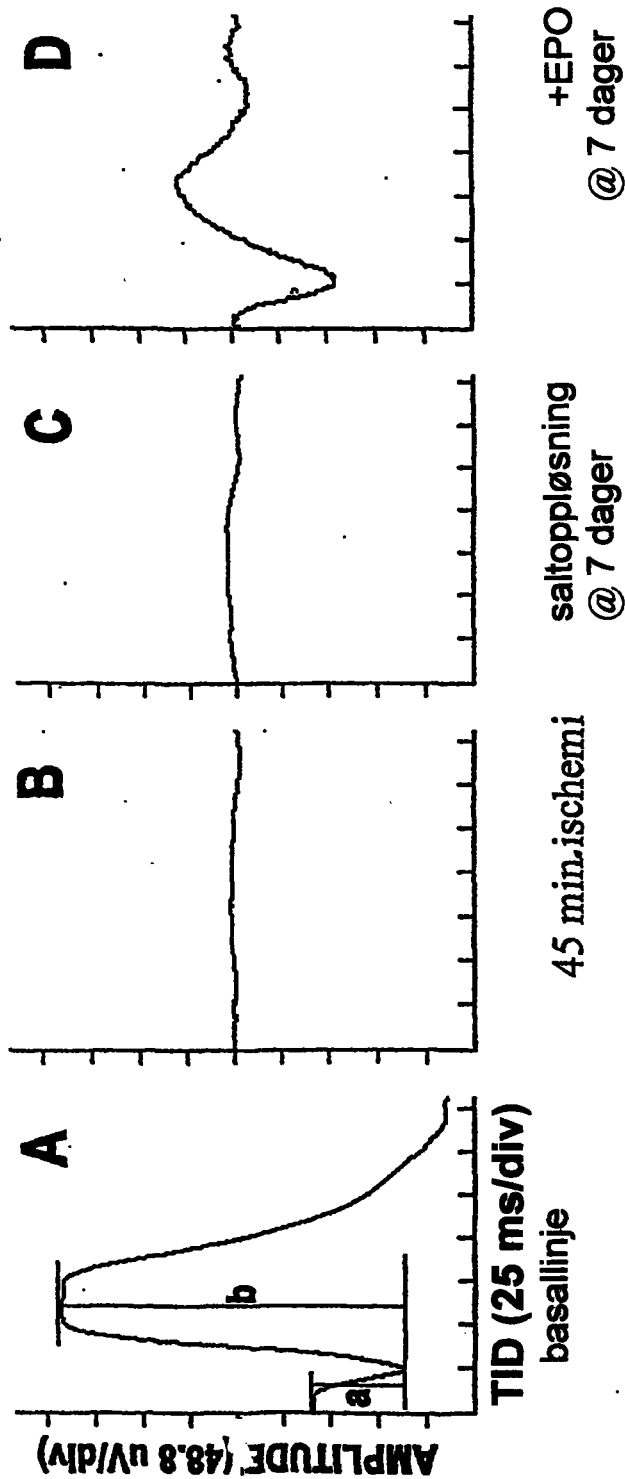


Figur 10



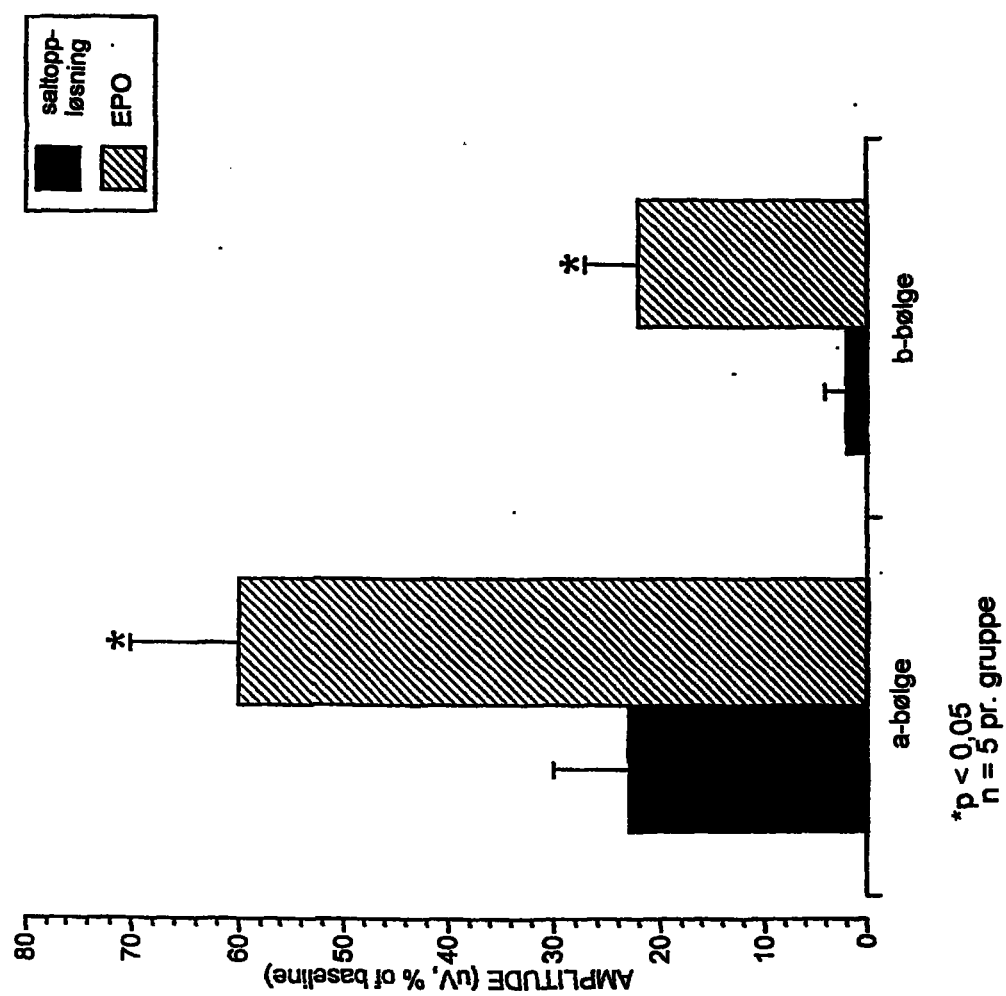
Figur 11

Elektroretinogrammer for rotter utsatt for ischemi i 60 minutter



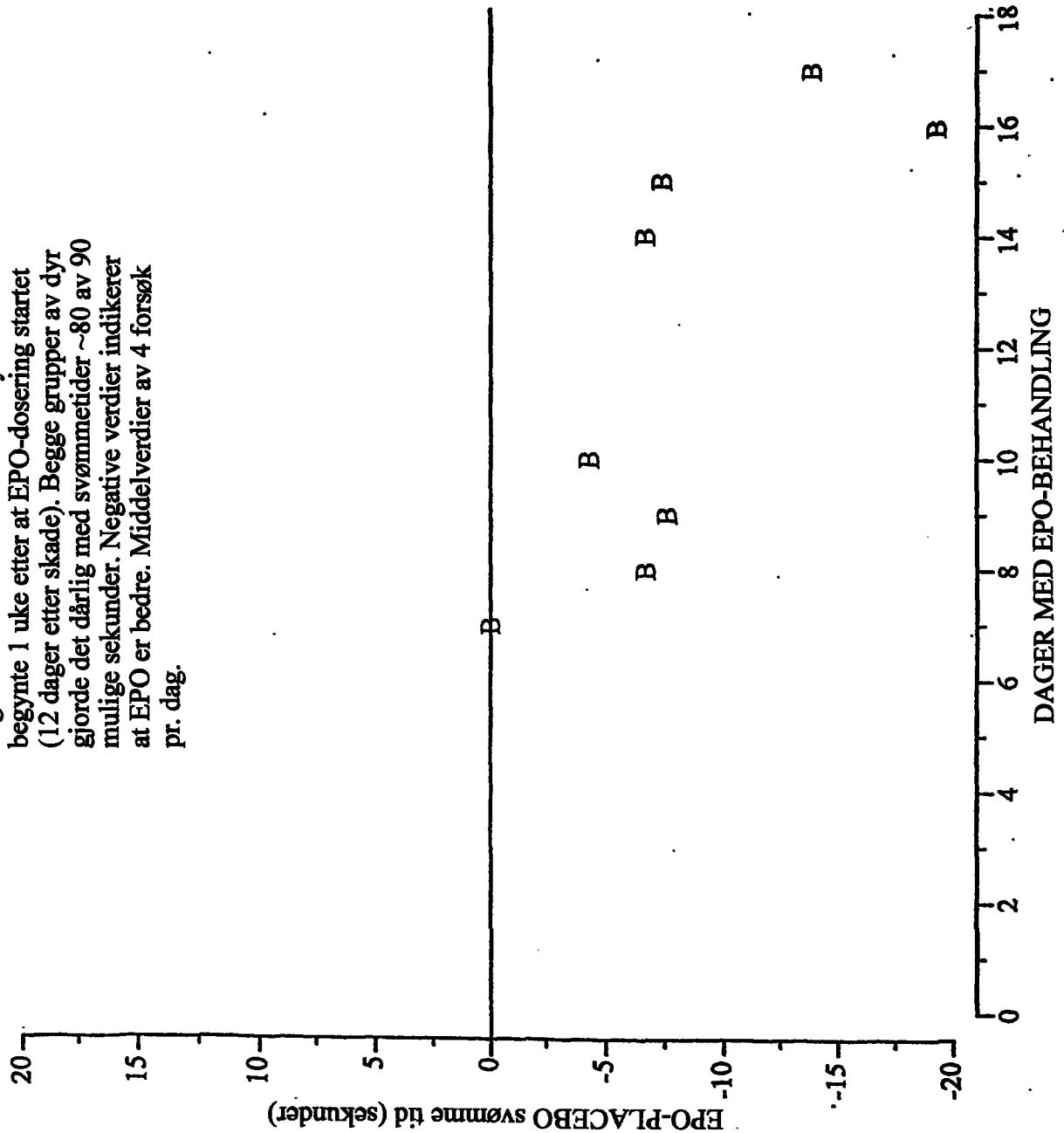
Figur 12

Retinogramamplitude etter 60 minutter ischemi



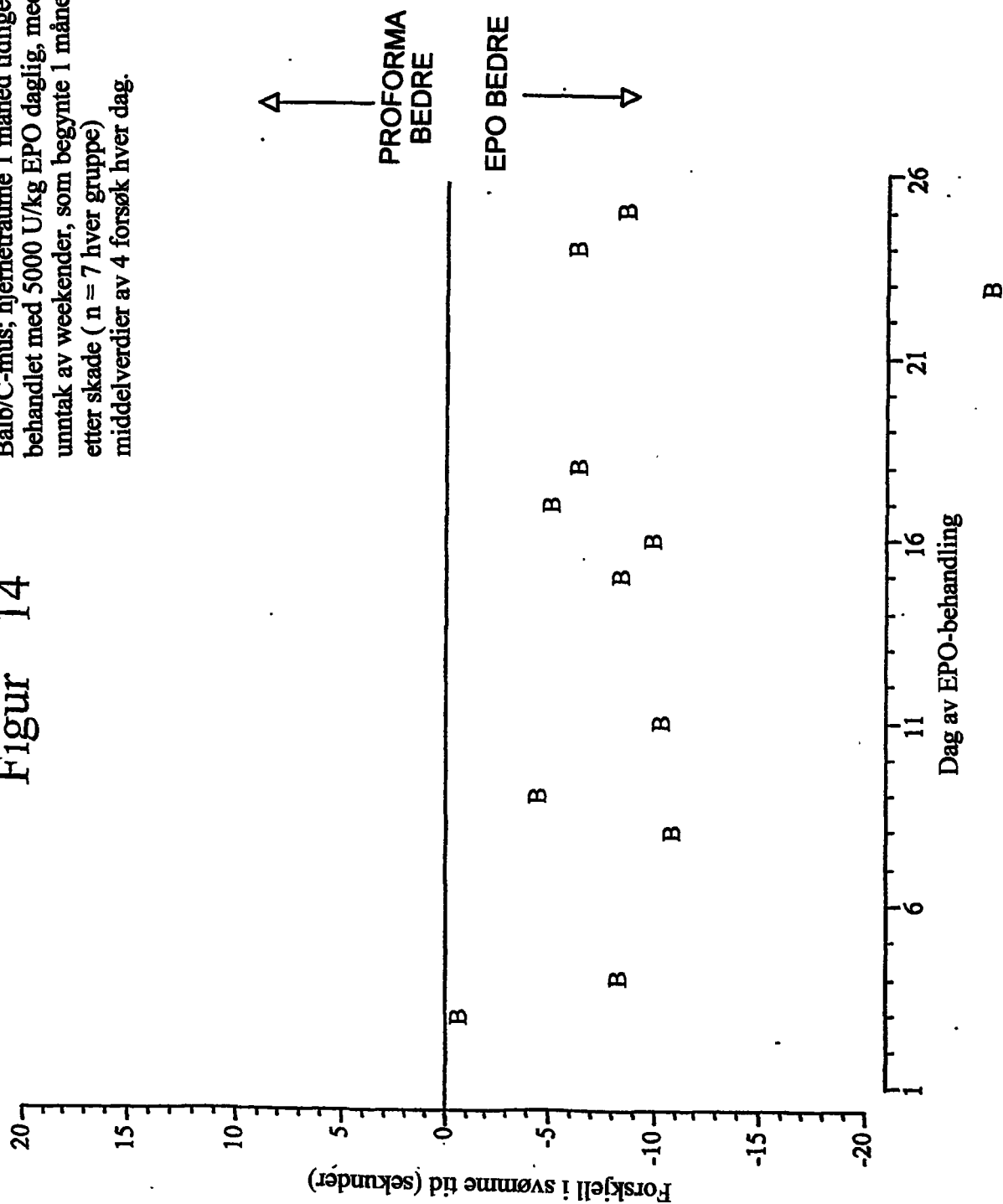
Figur 13

Morris vannlabyrint; Balb/C hunnmus n = 16.
 Dempet hjernetraume med EPO rx begynte på
 dag 5 etter skade. Første vannlabyrinttest
 begynte 1 uke etter at EPO-dosering startet
 (12 dager etter skade). Begge grupper av dyr
 gjorde det dårlig med svømmetider ~80 av 90
 mulige sekunder. Negative verdier indikerer
 at EPO er bedre. Middelerverdier av 4 forsøk
 pr. dag.



Figur 14

Forskjell i svømmetid til plattform i Morris vannlabyrint.
 Balb/C-mus; hjernetraume 1 måned tidligere, behandlet med 5000 U/kg EPO daglig, med unntak av weekender, som begynte 1 måned etter skade (n = 7 hver gruppe)
 middelverdier av 4 forsøk hver dag.



Figur 15
Kainat model

